

**UNIVERSITE DE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER II

Discipline : Biologie cellulaire (65)

Formation doctorale : Parasitologie

Ecole doctorale : Sciences chimiques et biologiques pour la santé (CBS2)

présentée et soutenue publiquement

par

Philippe HOLZMULLER

le 17 décembre 2002

**Etude des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans
l'activité microbicide des molécules de l'immunité protectrice
(monoxyde d'azote) et chimiothérapeutique (antimoine) chez
Leishmania.**

JURY :

M. le professeur G. LEFRANC,
M. le docteur J.-L. LEMESRE,
Mme le professeur M. DENIAU,
M. le professeur D. MOSSALAYI,
M. le professeur E. PRECIGOUT,
M. le professeur P. VINCENTEAU,

Université de Montpellier II,
Chargé de recherche IRD,
Université de Paris XII,
Université de Bordeaux II,
Université de Montpellier I,
Université de Bordeaux II,

Président
Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

A Marie...

Remerciements

La rédaction de ce manuscrit de thèse est une occasion que j'aimerais saisir pour remercier tous ceux qui m'ont accompagné durant ces années...

A monsieur le docteur Jean-Loup Lemesre, il y aurait beaucoup à dire, et je voudrais vous remercier simplement de m'avoir ouvert l'accès au métier de la recherche et de la confiance que vous m'avez témoignée durant ces années. . .

A monsieur le professeur Lefranc, vous m'avez accueilli en maîtrise de biochimie et vos encouragements m'ont conduit à réaliser cette thèse, recevez ici le témoignage de ma reconnaissance.

A madame le professeur Deniau, vous qui avez accepté de juger ce travail, recevez mes remerciements sincères.

A monsieur le professeur Mossalayi, vous qui avez accepté d'être rapporteur de ce travail, vos commentaires sur le NO viendront certainement enrichir mes connaissances. Recevez le témoignage de ma gratitude.

A monsieur le professeur Vincendeau, vous qui avez suivi toute l'évolution de ce travail, soyez chaleureusement remercié pour les nombreuses discussions sur le sujet et les conseils que vous m'avez prodigués.

A monsieur le professeur Precigout, un grand merci d'avoir spontanément accepté d'examiner ce travail.

A monsieur le docteur Ouaiissi, directeur de l'unité, merci de m'avoir donné les moyens de réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions.

A tous les membres du labo: Mireille (notre fourmi de l'extrême, merci pour tout), Baptiste le philosophe, Edwin et la salsa, Jérémy l'homme de la PCR, Laurent, Adeline, Rachel, Françoise, Eliane, Frédérique, Marie-France, . . .

Aux « drôles de dames » des plantes : Christelle, Hélène et Sandra, merci d'avoir égayé nos pauses café...

A Denis et Nilou, et leurs 2 héritiers, collègues, amis et maintenant voisins, merci pour votre soutien.

A ma petite Mallo, que dire ? Des bancs de la fac à « faux-témoin » de mariage, il n'y a qu'un pas, merci pour ton amitié, solide comme un roc et piquante comme un cactus. Bien sûr je n'oublie pas sa moitié, Fred, qui en veut toujours aux extra-terrestres. . .

A l'A.S. Poussan Rugby XV: Patricia (notre mère poule), Guy notre président, Christian et Josian qui nous font souffrir, Jacky qui nous remonte, et tous les copains: José, Steph, Cédric, Mathieu, Fred, Gilles, Patrice, Antoine, Saïd, Daniel, Olivier, Vincent, la bande de jeunes, les nouveaux venus et les dinosaures (Henri, Eric, Patrick.. .), merci à tous pour les premières, deuxième et troisième mi-temps.

A Sophie et Thierry, à leur petite princesse Charlotte, sans oublier l'héritier qui arrive, merci pour votre amitié et les inimitables crèmes catalanes.

Aux membres du Gougnaf Mouvement: Greg, Belette, Le Doc, madame Dahm-dam, Karine, Marylène,.. . , pour ces années de dur labeur à la fac.

A Stéphane et William, les « Gutenberg de l'impossible », merci pour votre disponibilité et votre amitié.

A ceux que j'aurai oubliés par manque de sommeil, pardon et merci. . .

A mon meilleur ami Olivier, surtout ne ressort pas ton petit dossier. . . merci. . . et. . .
MERCI

A mes cousins les doryphores: Tof et Ticia, Olivier, Eric et Valérie, Nicolas, les Freds. . . .

A ma belle-famille : joli papa et belle maman pour m'avoir accordé la main de leur fille, JB Isa et les petits. . . avec une pensée particulière pour grand-mère.

A mes grands-mères, dont les prières m'auront bien aidé.

A mes parents, qui par leur éducation et leur soutien inconditionnel, m'ont permis d'arriver où je suis. Recevez le témoignage de ma reconnaissance et de mon amour.

Enfin, à mon épouse Véronique, pour m'avoir supporté (dans tous les sens du terme) avec patience et amour, et pour tout le reste...

Sommaire

	Pages
Résumé-Abstract	1
GENERALITES ET DOMAINE D'ETUDE	
Introduction	2
I – Eléments de parasitologie	4
1 – Les leishmanies	4
1.1 – Position systématique du genre <i>Leishmania</i>	4
1.2 – Les hôtes	6
1.2.1 - Les insectes vecteurs : les phlébotomes	6
1.2.2 - Les hôtes définitifs réservoirs	7
1.3 - Cycle biologique	8
2 – Les leishmanioses	11
2.1 – Incidence	11
2.2 – Répartition géographique	12
2.3 – Manifestations cliniques et diagnostic	12
2.3.1 – La leishmaniose cutanée	16
2.3.2 – La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) ou <i>espundia</i>	16
2.3.3 – La leishmaniose viscérale (LV) ou kala-azar	18
2.3.4 – La leishmaniose canine	19
2.4 – Le traitement des leishmanioses	21
2.4.1 – Les traitements des leishmanioses humaines	21
2.4.1.1 – Les dérivés stibiés	21
2.4.1.2 – La pentamidine	23
2.4.1.3 – L'amphotéricine B	24
2.4.1.4 – Les nouvelles approches thérapeutiques	25
2.4.2 – Le traitement de la leishmaniose canine	26
2.4.3 – La vaccination anti-leishmanienne	26
II – Biologie des leishmanies	31
1 – Organisation cellulaire	31

2 – Organisation moléculaire	32
2.1 – Le génome de <i>Leishmania</i>	32
2.2 – L'ADN kinétoplastique	33
2.3 – Une particularité de la transcription des gènes chez <i>Leishmania</i> : le trans-épissage et la polyadénylation au cours de la maturation des ARNm	33
3 – Les antigènes de leishmanies	34
3.1 – Les antigènes constitutifs	35
3.1.1 – Les antigènes membranaires	35
3.1.1.1 – Le lipophosphoglycane (LPG)	35
3.1.1.2 – La leishmanolysine gp63	35
3.1.1.3 – Les Promastigote Surface Antigens (PSA)	36
3.1.2 – Les antigènes somatiques	37
3.1.2.1 – Les panantigènes	37
3.1.2.2 – Les protéases à cystéines	39
3.2 – Les antigènes excrétés-sécrétés (AES)	40
3.2.1 – Les AES des formes promastigotes	42
3.2.2 – Les AES des formes amastigotes	44
3.3 – Les antigènes utilisés pour diagnostiquer les leishmanioses	44
III – Interactions hôte-parasite	47
1 – L'infection par <i>Leishmania</i>	47
1.1 – La métacyclogénèse des promastigotes	47
1.2 – La reconnaissance et l'attachement des formes promastigotes aux macrophages	53
1.3 – La phagocytose des promastigotes et la formation de la vésicule parasitophore	56
1.4 – La différenciation des formes promastigotes en formes amastigotes	59
1.4.1 – La perturbation des fonctions macrophagiques	59
1.4.2 – L'adaptation des amastigotes aux conditions de vie intracellulaires : le pH et la température.	62
1.4.3 – Persistance et développement de l'infection chez l'hôte mammifère : la pathogénie du stade amastigote	64
2 – La réponse immune de l'hôte	65
2.1 – Le contrôle génétique de la sensibilité/résistance à l'infection leishmanienne	66

2.2 – La réponse immune à médiation humorale	69
2.3 – La réponse immune à médiation cellulaire	71
2.3.1 – Les premières étapes de l'invasion et l'immunité innée	71
2.3.2 – L'intervention et la migration des cellules dendritiques au cours de l'induction de l'immunité acquise	72
2.3.3 – La maturation et la migration des lymphocytes T	74
2.3.4 – La destruction des amastigotes : la voie du monoxyde d'azote (NO)	76
3 – Le NO, médiateur biologique ubiquitaire	78
3.1 – Généralités	78
3.2 – Les effets microbicides du NO sur les parasites	80
3.3 – La régulation de la production de NO	81
3.4 – Les mécanismes cellulaires de la cytotoxicité du NO	82
3.5 – Les cibles moléculaires du NO	84
3.6 – Les donneurs de NO utilisés en thérapeutique anti-leishmanienne	88
IV – Objectifs du travail	89

TRAVAUX PERSONNELS

Article 1 : Efficacité des médicaments de seconde intention sur des formes amastigotes de <i>Leishmania infantum</i> résistantes à l'antimoine (Accepté pour publication, <i>Acta Tropica</i>).	91
Article 2 : Etudes expérimentales sur l'évolution du phénotype de résistance à l'antimoine au cours du cycle de développement parasitaire <i>in vitro</i> de <i>Leishmania infantum</i> : implications dans la dissémination de la chimiorésistance en zone endémique (Accepté pour publication, <i>Acta Tropica</i>).	100
Article 3 : La croissance <i>in vitro</i> de formes promastigotes de <i>Leishmania amazonensis</i> est dépendante des interactions entre souches (Accepté pour publication, <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i>).	113
Article 4 : La perte de virulence des formes promastigotes de <i>Leishmania amazonensis</i> résistantes à la pentamidine est corrélée à une augmentation de la mort par apoptose lors de leur différenciation en formes amastigotes (En préparation).	117

Article 5 : Induction par l'antimoine de la fragmentation de l'ADN des formes amastigotes de <i>Leishmania infantum</i> (Accepté pour publication, <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i>).	148
Article 6 : L'effet cytotoxique de donneurs de NO sur les formes amastigotes de <i>Leishmania amazonensis</i> est corrélé avec la modulation des activités protéasiques des parasites (Soumis pour publication, <i>Parasitology</i>).	156
Article 7 : Induction par le monoxyde d'azote d'une fragmentation d'ADN en oligonucléosomes dépendante du protéasome chez les formes amastigotes de <i>Leishmania amazonensis</i> (Accepté pour publication, <i>Infection and Immunity</i>).	183
Article 8 : La réponse immune à médiation cellulaire de chiens immunisés avec des antigènes d'excrétion-sécrétion de formes promastigotes de <i>Leishmania infantum</i> induit l'apoptose des formes amastigotes intracellulaires par la voie du monoxyde d'azote (Soumis pour publication, <i>Infection and Immunity</i>).	194
Article 9 : Les formes amastigotes de <i>Leishmania infantum</i> résistantes aux antimoniés trivalents sont également résistantes à la mort cellulaire par apoptose induite par le NO (En préparation).	224
Article 10 : Caractérisation phénotypique de formes amastigotes de <i>Leishmania infantum</i> résistantes à l'effet cytotoxique du monoxyde d'azote (NO) (En préparation).	252

AUTRES RESULTATS

1. La complémentation du milieu de culture avec les produits de l'aconitase et de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase prévient l'apoptose induite par le NO chez les formes amastigotes de <i>L. amazonensis</i> .	286
2. L'effet leishmanicide de l'antimoine sur les formes amastigotes intramacrophagiques de <i>L. infantum</i> est atténué en présence d'inhibiteurs de la NO synthase inductible <i>in vitro</i> .	291

DISCUSSION-CONCLUSION-PERSPECTIVES

Discussion	296
Conclusion-Perspectives	309

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie	311

RESUME-ABSTRACT

RESUME en français

Les leishmanioses sont des anthroponoses parasitaires dues à un protozoaire du genre *Leishmania*. Elles causent un grand nombre d'affections humaines, allant des lésions cutanées simples à guérison spontanée aux infections viscérales dont l'issue est souvent fatale. Les leishmanies sont des protozoaires parasites ayant un cycle de développement digénétique, avec une forme promastigote flagellée chez l'insecte vecteur, et une forme amastigote intracellulaire sans flagelle émergent, colonisant les phagocytes mononucléés des hôtes vertébrés. La résistance aux infections leishmaniennes dépend de la destruction des parasites intracellulaires par les macrophages activés de l'hôte infecté, via la voie de biosynthèse du monoxyde d'azote (NO). Lorsque la pathologie est déclarée, le traitement basique de la leishmaniose consiste en l'administration de dérivés de l'antimoine (Glucantime®). Disposant au laboratoire d'un système alternatif à l'expérimentation animale consistant en la modélisation *in vitro*, en conditions axéniques et asériques, du cycle de développement parasitaire complet des leishmanies, il nous a été possible d'étudier les effets directs des deux molécules leishmanicides majeures sur le stade médicalement important, le stade amastigote. Ainsi, nous montrons pour la première fois, que ces deux molécules leishmanicides majeures (*i.e.* NO et antimoine) exercent leur activité cytotoxique par l'induction d'une mort cellulaire ayant les caractéristiques phénotypiques de l'apoptose.

D'autre part, la culture *in vitro* nous a permis de sélectionner par pression médicamenteuse des formes amastigotes chimiorésistantes à la pentamidine mais aussi à un dérivé trivalent (SbIII) de l'antimoine, l'antimonio tartrate de potassium. Nous montrons dans un premier temps que les amastigotes résistants au SbIII restaient sensibles aux médicaments anti-leishmaniens de seconde intention (*i.e.* pentamidine et amphotéricine B). Dans un deuxième temps, nous démontrons que le caractère chimiorésistant peut être transmis et que sa stabilité est dépendante du degré de chimiorésistance induite. L'adaptation des parasites à leur environnement ainsi que la compétition entre souches peuvent également intervenir dans les modalités de cette transmission.

Enfin, partant du modèle de chimiorésistance *in vitro* et des résultats d'induction d'une mort apoptotique tant par l'antimoine que par le NO, nous avons mis en évidence l'existence d'une résistance croisée entre ces deux molécules. Forts de ces résultats et utilisant un donneur de NO synthétique adéquat mimant la production de NO par des macrophages activés (DETA/NOOate), nous avons sélectionné *in vitro* des formes amastigotes de *Leishmania* mutantes capables de résister à l'effet leishmanicide du NO. L'analyse phénotypique des mutants, et notamment la surexpression de cibles moléculaires du NO, nous permettra de définir de nouvelles cibles thérapeutiques et nous ouvre des perspectives intéressantes d'études pharmacologiques sur de nouveaux principes actifs anti-leishmaniens.

TITRE en anglais

Study of cellular and molecular mechanisms involved in the protective immunity (nitric oxide) and chemotherapeutic (antimony) molecules' microbicidal activity in *Leishmania*.

RESUME en anglais

Leishmaniasis is a significant cause of morbidity and mortality in tropical and subtropical areas. *Leishmania* species are responsible for a wide range of human disease, from the self-healing cutaneous lesions to fatal visceral infections. These protozoan parasites have a digenetic life cycle, which includes a flagellate promastigote form in the sandfly vector, and a non-flagellate intracellular amastigote stage within the mononuclear phagocytes of vertebrate hosts. The antimicrobial effect of activated macrophages on parasites involves nitric oxide (NO) that induces intracellular parasite killing. Treatment of leishmaniasis basically consists in injection of antimony (Pentostam®). The recent development of axenically grown amastigotes of different *Leishmania* species in completely defined medium has opened new opportunities in the direct study of these two major leishmanicidal molecules' effects on the clinically relevant stage of the parasite, the amastigote stage. Thus, we demonstrated for the first time that both major leishmanicidal molecules exert their cytotoxicity by the induction of a DNA fragmentation characteristic of apoptosis.

Then, the *in vitro* culture of *Leishmania* amastigotes made possible an artificial induction of pentamidine and trivalent antimonials (SbIII) chemoresistance. We demonstrated in a first time that SbIII-resistant amastigotes were still sensitive to second line drugs (*i.e.* pentamidine et amphotericin B). In a second time, we shown that the chemoresistant property acquired was conserved during the *in vitro* parasite life cycle and depended on the level of resistance induced. Environmental conditions and competition between strains may also modulate the transmission of such chemoresistance.

Finally, starting from the results of apoptosis induction by both NO and antimony, and by the use of SbIII-resistant amastigotes, we highlighted a cross-resistance between the two major leishmanicidal molecules. Using a suitable nitric oxide donating compound (DETA/NOOate), we selected mutant amastigotes of *Leishmania* that were able to resist NO action. Phenotypic characterisation of these mutants, with a special interest in the NO molecular targets overexpressed, would define new therapeutic targets and open new pharmacological approaches in the research of anti-*Leishmania* drugs.

DISCIPLINE : 65.

MOTS CLES : *Leishmania*, amastigotes, monoxyde d'azote (NO), antimoine, apoptose, chimiorésistance.

LABORATOIRE : UR 008 Pathogénie des Trypanosomatidés, I.R.D. Montpellier.

GENERALITES ET DOMAINE D'ETUDE

Introduction

Les leishmanioses constituent un groupe complexe d'affections parasitaires. Elles font partie des six maladies parasitaires considérées comme majeures et sont, à ce titre, classées prioritaires par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.). Présentes actuellement sur quatre continents, elles sont endémiques dans 88 pays, parmi lesquels on compte 16 pays industrialisés, 72 en développement et 13 appartenant aux pays les plus pauvres de la planète.

Les différentes espèces de *Leishmania* sont responsables d'un vaste champ de pathologies humaines, allant des lésions cutanées simples à guérison spontanée, ou diffuses mutilantes, aux infections viscérales à l'issue fatale. Il y a vingt ans, la fréquence annuelle mondiale était estimée à 400 000 cas (300 000 cas de leishmanioses cutanées (LC) et 100 000 cas de leishmanioses viscérales (LV)), avec une incidence générale de 12 millions de cas cliniques, et une population à risque d'environ 350 millions d'individus. Actuellement, la fréquence annuelle globale est estimée à 1,5 à 2 millions de nouveaux cas par an, dont 1 à 1,5 millions de cas de LC et 500 000 cas de LV (Desjeux, 1993). D'autre part, les leishmanioses ont été classées comme une des maladies opportunistes du SIDA, et un rapport de l'O.M.S. notait que sur les 1700 premiers cas notifiés dans 33 pays du monde jusqu'en 1998, 1440 concernaient le sud-ouest de l'Europe (Aide mémoire O.M.S. N°116, mai 2000). En fait, toutes les causes d'immunodépression cellulaire comme les infections à VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), les transplantations, la malnutrition ou les traitements immunosuppresseurs, sont susceptibles de permettre la réactivation du parasite et le développement de la maladie sous une forme généralement sévère (Vilde *et al.*, 1990).

Le cycle évolutif des protozoaires du genre *Leishmania* se partage classiquement entre un hôte vecteur invertébré, le phlébotome, et de nombreux hôtes vertébrés mammifères dont l'homme. Le cycle de développement est digénétique et alterne 2 formes parasitaires principales : une forme promastigote flagellée extracellulaire mobile rencontrée principalement chez l'insecte vecteur et qui va rapidement infecter les phagocytes mononucléés des hôte vertébrés, et une forme amastigote intracellulaire conservant un flagelle rudimentaire et vivant exclusivement à l'intérieur des phagolysosomes des macrophages parasités de l'hôte vertébré.

La réponse immunitaire anti-leishmanienne protectrice, qui constitue la première barrière de l'hôte contre le parasite, repose sur l'induction d'une immunité à médiation cellulaire dont la molécule effectrice principale est le monoxyde d'azote (NO). Néanmoins,

lorsque la pathologie est diagnostiquée, des molécules chimiques viennent suppléer l'immunité naturelle. L'arsenal thérapeutique classique utilisé pour traiter les leishmanioses se compose en première intention exclusivement des dérivés pentavalents de l'antimoine (Glucantime® et Pentostam®), et dans les cas de non-réponse au traitement, de la pentamidine et de l'amphotéricine B. Les essais cliniques portant sur de nouvelles molécules sont nombreux mais aucun n'a encore abouti à une utilisation du principe actif en routine, ni à l'émergence de préparations vaccinales.

La mise au point depuis quelques années au laboratoire, d'un milieu de culture complètement défini supportant la croissance *in vitro* des formes amastigotes des principales espèces de leishmanies nous a permis de réaliser cette étude (Lemesre *et al.*, 1994 ; Lemesre J.-L., Brevet N° 6458581). L'utilisation de cultures axéniques et asériques du stade parasite médicalement important, le stade amastigote, dans des milieux de culture complètement définis, et ayant la particularité de ne contenir aucune macromolécule en tant que substituts sérique et cellulaire, nous a permis de reproduire *in vitro* les principales séquences qui se succèdent au cours du cycle complet de développement parasite. Cette nouvelle technologie visant à mieux cerner les différents paramètres de la culture *in vitro*, s'avère très avantageuse à plusieurs niveaux. Tout d'abord, elle favorise considérablement la reproductibilité des conditions expérimentales, et rend par conséquent possible la modélisation *in vitro* du cycle évolutif des leishmanies. D'autre part, elle nous a permis d'étudier les effets du NO et des médicaments directement sur le stade parasite médicalement important, qui présente normalement une position intracellulaire stricte. Disposant de cet outil de choix, nous avons donc commencé à caractériser au plan cellulaire et moléculaire le type de mort induit chez *Leishmania*, par les deux molécules leishmanicides majeures que sont le NO et l'antimoine. Parallèlement, nous nous sommes intéressés aux mécanismes cellulaires régissant les profils de résistance de ces parasites aux molécules leishmanicides. Les résultats de ces travaux pourraient conduire vers de nouvelles stratégies en terme de lutte antileishmanienne. Des approches pharmacologiques différentes pourraient peut-être définir de nouveaux principes actifs efficaces, mais surtout moins toxiques et moins coûteux.

I – Eléments de parasitologie.

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires très anciennes. Les premières descriptions cliniques de ces pathologies concernent les leishmanioses tégumentaires d'Amérique latine et datent de l'invasion espagnole du XVI^{ème} siècle. Il semble même que ces affections soient plus anciennes encore, comme en témoignent les représentations de mutilations faciales sur des céramiques précolombiennes Tiwanaku en Bolivie. La première description scientifique de l'agent étiologique de la leishmaniose cutanée de l'ancien monde, *Leishmania tropica*, a été faite par Borowsky en 1900. C'est en 1903 que Leishman et Donovan (Figure 1) décrivent *Leishmania donovani* responsable du terrible Kala-Azar (maladie noire) indien. En 1908, Charles Nicolle fut le premier à démontrer le caractère zoonotique de ces maladies. Ce n'est que dans les années 1920 que le rôle d'insecte vecteur du phlébotome fut démontré expérimentalement par Adler. Depuis ces premières découvertes, les connaissances sur les leishmanioses n'ont cessé de s'accroître. Pourtant, ces pathologies demeurent toujours aujourd'hui un grave problème de santé publique.

1 – Les leishmanies.

Les leishmanies sont des parasites protozoaires flagellés appartenant à l'ordre des Kinétoplastidés, à la famille des Trypanosomatidés et au genre *Leishmania* (Ross, 1903).

1.1 – Position systématique du genre *Leishmania*.

En 1980, Levine proposait la classification suivante (Levine *et al.*, 1980) :

Règne : *Protista*

Sous- règne : *Protozoa*

Phylum : *Sarcomastigophora*

Classe : *Zoomastigophorea*

Ordre : *Kinétoplastida*

Sous- ordre : *Trypanosomatina*

Famille : *Trypanosomatidae*

Genre : *Leishmania*



Early twentieth century – discovery of the parasite

Figure 1 : 1903, **William Leishman** et **Charles Donovan** découvrent des amastigotes à l'intérieur de macrophages d'une personne atteinte de Kala Azar (d'après <http://www.hhmi.ucla.edu>).

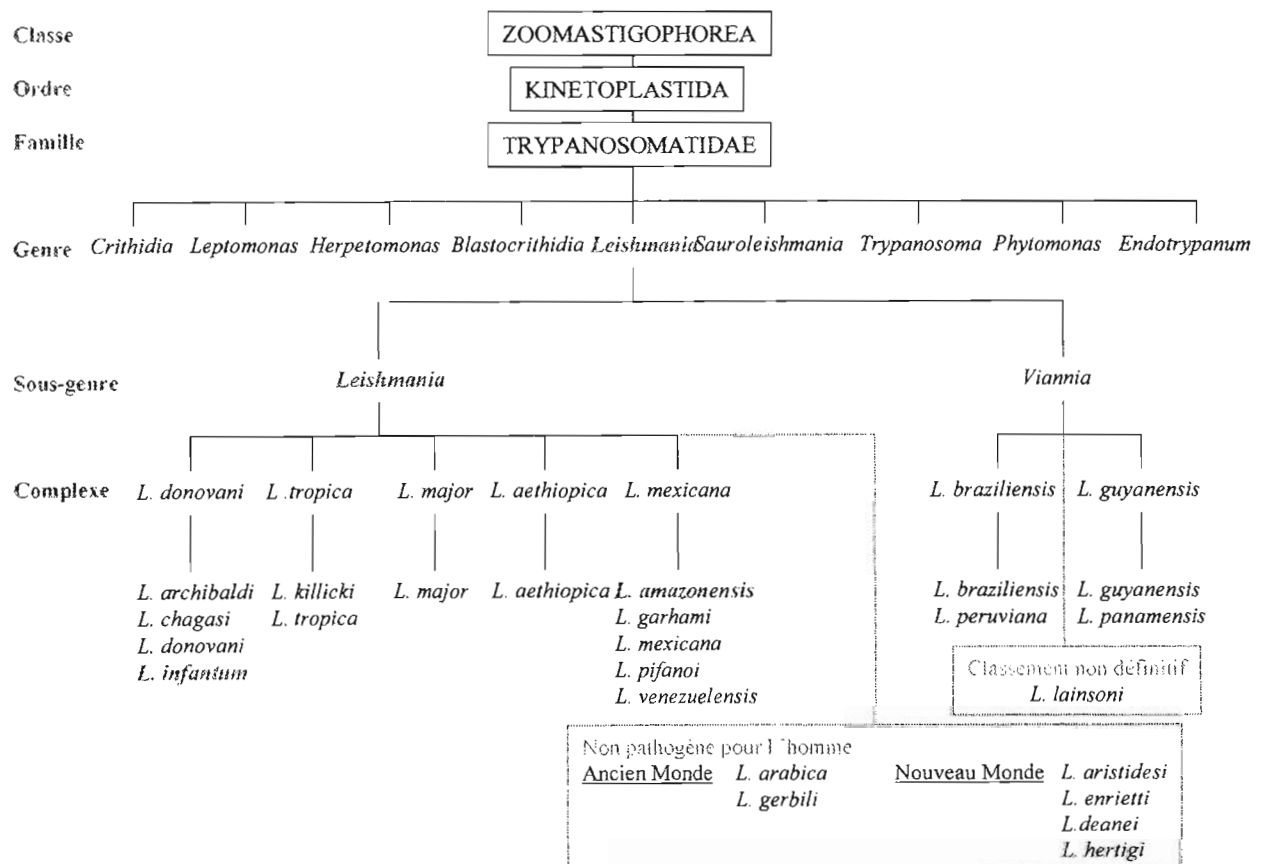


Figure 2 : Taxonomie des leishmanies (O.M.S, 1990).

Le mode de développement du parasite chez l'insecte vecteur a permis de diviser le genre *Leishmania* (Ross, 1903) en deux sous-genres (Figure 2). Le sous-genre *Leishmania* (Saf'janova, 1982) a un développement suprapylorique impliquant que les parasites se développent en amont de la jonction de l'intestin moyen et de l'intestin postérieur. Les espèces du sous-genre *Viannia* (Lainson et Show, 1987) ont une position péripylorique ; les parasites se développent indifféremment dans l'intestin moyen ou dans l'intestin postérieur.

La classification des leishmanies avait tout d'abord été établie exclusivement à partir des facteurs extrinsèques tels que les données cliniques et épidémiologiques, la répartition géographique ou encore le cycle biologique. Grâce à l'avènement de la biochimie (électrophorèse isoenzymatique) et de la biologie moléculaire (PCR (Polymerase Chain Reaction), RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism), PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)), une classification basée sur des critères intrinsèques a permis de diviser les leishmanies en complexes d'espèces (Pratlong et Lanotte, 1999).

D'autre part, un code international pour la désignation des différents isolats de *Leishmania* a été adopté depuis 1980 (UNDP/WHO meeting à Washington). Ce code se compose d'une série de quatre éléments :

- le premier élément est constitué de 4 lettres qui désignent l'hôte chez qui la souche a été isolée,
- le deuxième élément identifie en 2 lettres le pays d'origine de l'hôte,
- le troisième élément correspond à l'année d'isolement de la souche,
- le quatrième élément est laissé au libre choix des chercheurs qui ont isolé la souche.

1.2 – Les hôtes.

1.2.1 - Les insectes vecteurs : les phlébotomes.

Les phlébotomes (Figure 3) sont des insectes diptères nématocères de petite taille (2 à 5 mm de long), au corps et aux ailes velues. Ils constituent au sein de la famille des *Psychodidae*, la sous-famille des *Phlebotominae* qui compte actuellement 700 espèces décrites. Outre les leishmanioses, ces insectes sont également vecteurs de la bartonellose et de diverses arboviroses (Leger et Depaquit, 1999).

Ces insectes abondent toute l'année dans la zone inter- et sub-tropicale, mais ne sont actifs qu'au cours des mois d'été dans les régions tempérées, où la transmission de la maladie prend un caractère saisonnier. De mœurs crépusculaires et nocturnes, les phlébotomes

commencent à s'activer à la tombée du jour lorsque la température est suffisamment élevée (> 19-20°C) et qu'il n'y a pas de vent. La femelle, seule hémaphage, va chercher pour se nourrir un hôte à sang chaud, et le repas sanguin lui permettra d'effectuer son cycle de développement (œuf, 4 stades larvaires et nymphe) et de ponte. La piqûre est multiple et particulièrement douloureuse. Pendant la journée, les phlébotomes s'abritent dans les trous des murs, dans les anfractuosités des roches, voire même dans des terriers.

Les espèces de leishmanies de l'ancien monde sont transmises par les phlébotomes du genre *Phlebotomus* et celles du nouveau monde par le genre *Lutzomia*. Il existe en outre une relative spécificité entre l'espèce de vecteur et l'espèce de leishmanie qu'il transmet (Sacks, 2001).

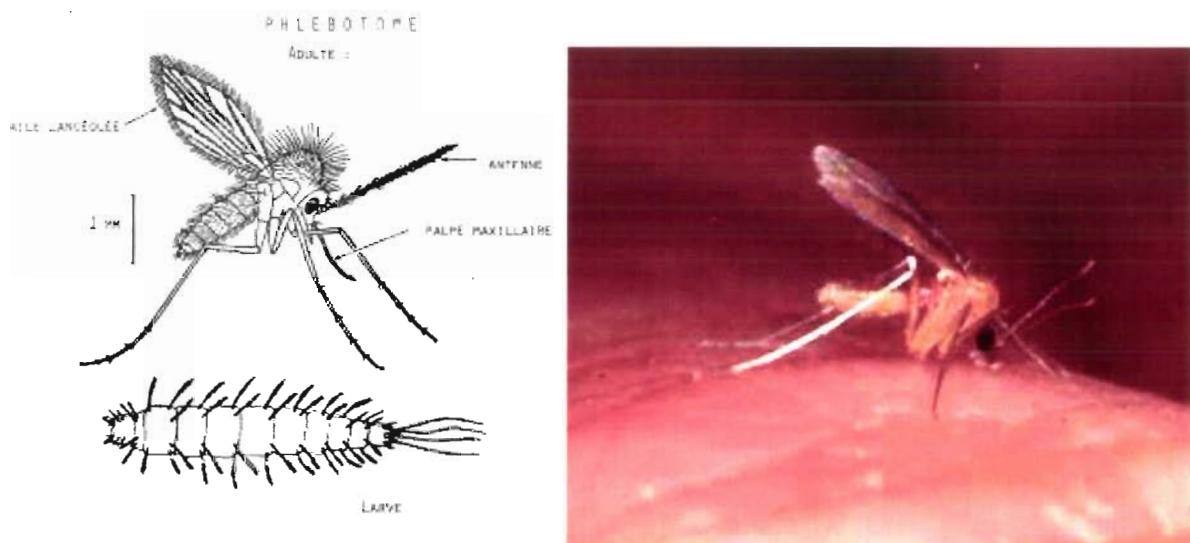


Figure 3 : Femelle phlébotome, adulte et stade larvaire, photo : *Phlebotomus perfiliewi* (schéma <http://www.lasante.be>, photo T.J. Naucke).

1.2.2 - Les hôtes définitifs réservoirs.

Les leishmanioses sont principalement des zoonoses, c'est à dire des maladies d'animaux sauvages, commensaux ou domestiques. La leishmaniose canine est d'ailleurs bien connue des vétérinaires du Sud de la France. L'homme n'est infecté que lors d'une intrusion accidentelle dans le cycle de développement naturel du parasite. Il existe cependant deux cas où la leishmaniose peut prendre un caractère anthroponotique, c'est à dire une affection intrahumaine : il s'agit des infections cutanée à *L. tropica* et viscérale à *L. donovani*.

Les principaux réservoirs sont :

- les rongeurs de différentes espèces pour les cas de leishmanioses cutanées (*L. major* et *L. amazonensis*),
- les perrissodactyles, les marsupiaux et les paresseux pour les leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses d'Amérique du Sud (complexe *L. braziliensis*),
- les canidés sauvages ou domestiques pour les leishmanioses viscérales dues à *L. infantum* ou *L. chagasi*.

1.3 - Cycle biologique.

Les leishmanies réalisent un cycle de développement parasitaire hétéroxène au cours duquel vont se succéder deux morphes distinctes : une forme promastigote, flagellée, extracellulaire, fusiforme (5 à 20 µm de long, 1 à 4 µm de diamètre), mobile, se multipliant dans le tube digestif du phlébotome vecteur, et une forme amastigote (2 à 6 µm de diamètre), ne présentant pas de flagelle émergent, intracellulaire obligatoire, ovoïde, se multipliant au sein des macrophages infectés de l'hôte vertébré infecté (Figure 4).

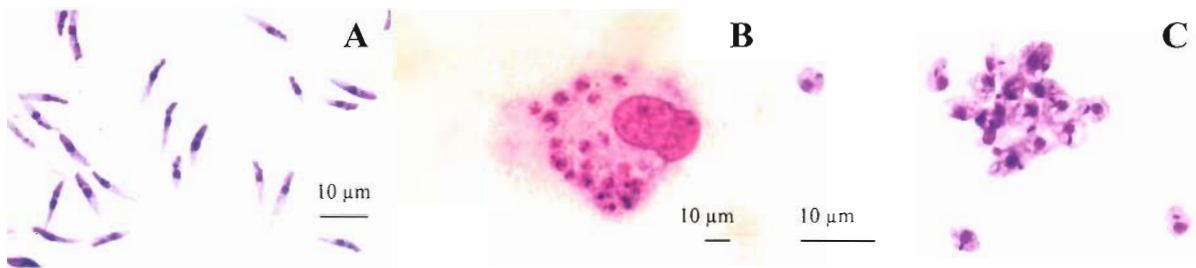


Figure 4 : Morphologie des leishmanies. A : formes promastigotes de *Leishmania amazonensis* en culture *in vitro*. B : formes amastigotes intramacrophagiques de *L. infantum*. C : formes amastigotes axéniques de *L. amazonensis* en culture *in vitro*. Photos de microscopie optique après fixation au méthanol et coloration au Giemsa (photos P. Holzmüller).

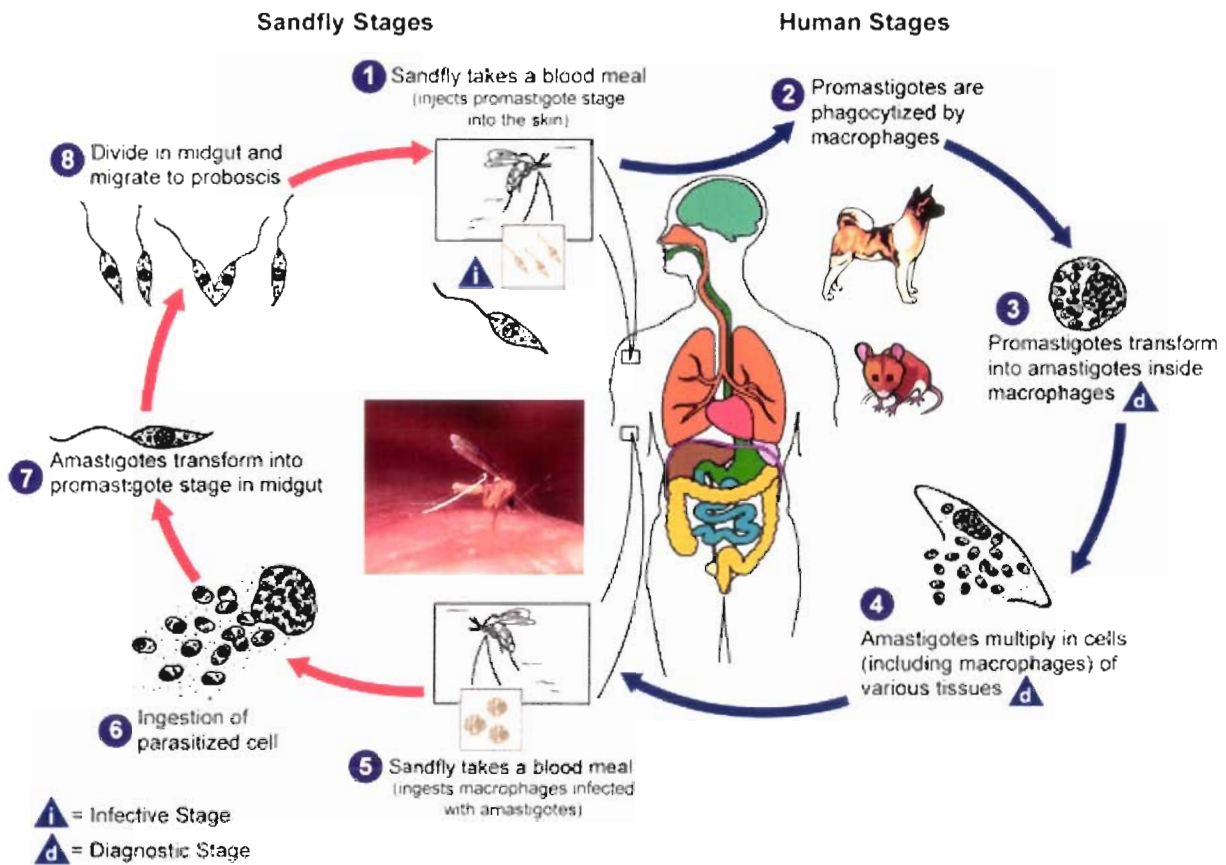
Un cycle parasitaire complet se déroule comme suit (Figure 5A) : lorsqu'un phlébotome infecté pique un mammifère pour se nourrir, il lui injecte des formes promastigotes métacycliques au cours de son repas sanguin. Celles-ci, estimées entre 10 et 100 par piqûre, sont injectées au niveau du derme conjointement à la salive qui contient des substances favorisant l'établissement de l'infection (Warburg *et al.*, 1994 ; Mbow *et al.*,

1998). Les promastigotes infectieux sont rapidement phagocytés par les cellules du système réticulo-histiocytaire (monocytes, histiocytes et macrophages et se transforment en formes amastigotes. Après plusieurs cycles de multiplication active par scissiparité, chaque macrophage peut contenir des dizaines de parasites individualisés dans les vésicules parasitophores. On suppose qu'à ce stade, les macrophages éclatent et libèrent les amastigotes qui peuvent propager l'infection en colonisant des macrophages sains. Le processus infectieux peut également s'effectuer lors de la division de macrophages infectés (Lainson, 1987).

Si le repas sanguin d'un phlébotome est effectué sur un mammifère infecté, il peut être contaminé par des macrophages parasités. Ces derniers vont être lysés et les amastigotes ingérés vont se différencier en promastigotes qui se multiplient dans le tube digestif du phlébotome. Les parasites peuvent alors être soit libres dans la lumière de l'intestin moyen, soit attachés par leur flagelle aux microvillosités des cellules épithéliales. Les promastigotes vont ensuite entamer une migration antérograde vers les pièces buccales du phlébotome. Cette migration s'accompagne d'une phase de maturation, appelée métacyclogénèse, au cours de laquelle des modifications morphologiques et métaboliques vont conduire à l'émergence de promastigotes métacycliques infectieux, prêts à être injectés lors d'un nouveau repas sanguin (Sacks, 1989).

La reproduction au laboratoire du cycle évolutif *in vitro* (Figure 5B) nous permet d'établir la correspondance entre les formes observées au cours des cultures en conditions axénique et asérique et le cycle de développement naturel du parasite.

A



B

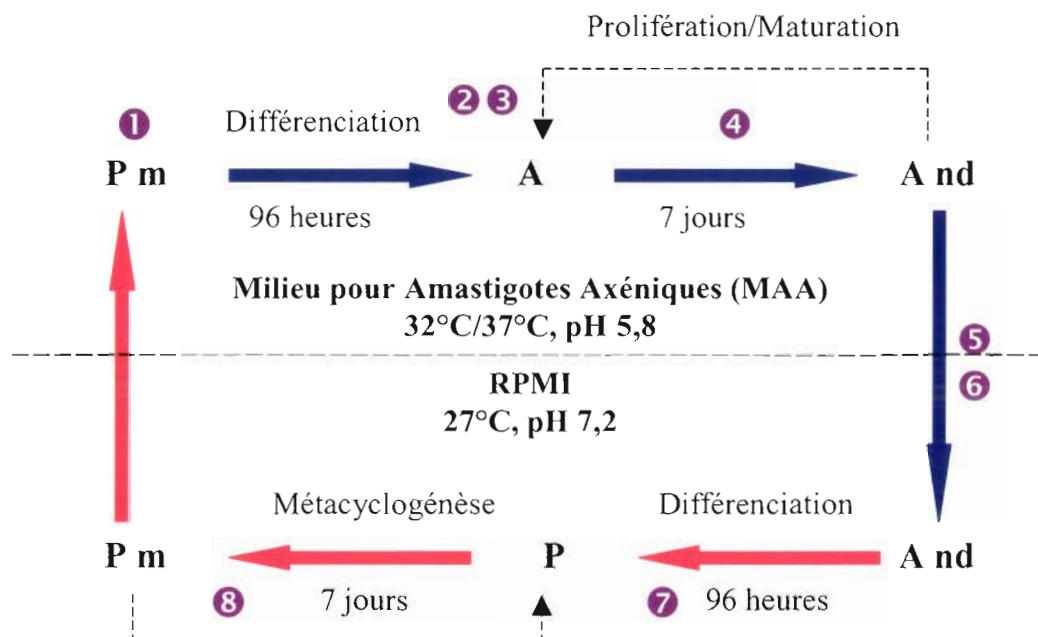


Figure 5 : Cycle évolutif des leishmanies. A : *in vivo* (d'après <http://www.dpd.cdc.gov>). B : *in vitro*, P = promastigotes, A = amastigotes, m = métacycliques, nd = de non-division (d'après J.-L. Lemesre, Brevet N° 6458581).

2 – Les leishmanioses.

Malgré les avancées de la recherche, les leishmanioses demeurent aujourd'hui encore un grave problème de santé publique en raison du nombre de personnes concernées, de l'étendue de la zone géographique couverte, ainsi que de la diversité et de la gravité des tableaux cliniques observés.

2.1 – Incidence.

Un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S., 1990) estimait, en 1990, la population à risque à quelques 350 millions d'individus, avec une incidence annuelle d'environ 400 000 nouveaux cas déclarés et une prévalence globale de plus de 12 millions de personnes atteintes de ces maladies. Ces chiffres éloquent ont classé les leishmanioses au 5^{ème} rang mondial des maladies parasitaires considérées comme prioritaires par l'O.M.S. L'épidémie de SIDA (Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquisée) n'a fait qu'aggraver la situation. En effet, depuis une première observation de leishmaniose viscérale chez un patient infecté par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) en 1985 (De La Loma *et al.*, 1985), la leishmaniose viscérale est maintenant classiquement décrite comme maladie opportuniste du SIDA. En Espagne, en Italie et en France, les cas de co-infections leishmanies-VIH sont en forte augmentation (Alvar *et al.*, 1997 ; Desjeux *et al.*, 2001). En France, dans les Alpes Maritimes, 2% des sujets séropositifs pour le VIH présentent une leishmaniose, et ils représentent 40% des cas de leishmaniose recensés (Marty *et al.*, 1994a, 1994b). Dans les grands foyers endémiques d'Amérique du Sud et d'Inde, même si peu de cas sont décrits, il semble évident que les co-infections leishmanies-VIH se développent (De Gorgolas et Miles, 1994). En définitive, toutes les causes d'immunodépression cellulaire comme les infections à VIH, mais aussi les transplantations, la malnutrition ou les traitements immunosuppresseurs, sont susceptibles de permettre la réactivation du parasite et le développement de la maladie sous une forme généralement sévère (Vilde *et al.*, 1990).

A l'heure actuelle, l'incidence mondiale des leishmanioses est comprise entre 1,5 et 2 millions de cas annuels, avec environ 500 000 cas de leishmaniose viscérale et 1 à 1,5 millions de cas de leishmaniose cutanée (Desjeux, 1996).

En outre, la progression de la leishmaniose canine est un nouveau paramètre à prendre en compte en épidémiologie humaine puisqu'une corrélation entre la prévalence de la leishmaniose canine et la transmission du parasite à l'homme a été démontrée (Gramiccia *et*

al., 1992 ; Marty *et al.*, 1992 ; Palatnik-De Sousa *et al.*, 2001). La prévalence de la leishmaniose canine est en forte augmentation depuis plusieurs années, apparaissant même actuellement en zone urbanisée ou loin des zones d'endémies (Quilici *et al.*, 1987 ; Berrahal *et al.*, 1996 ; Cabral *et al.*, 1998 ; Fisa *et al.*, 1999 ; Sideris *et al.*, 1999).

2.2 – Répartition géographique.

Les foyers endémiques de leishmanioses s'étendent sur de vastes régions du globe, concernant 97 pays répartis sur 4 des 5 continents (Figures 6). Deux types de foyers endémiques se distinguent classiquement selon leur localisation géographique :

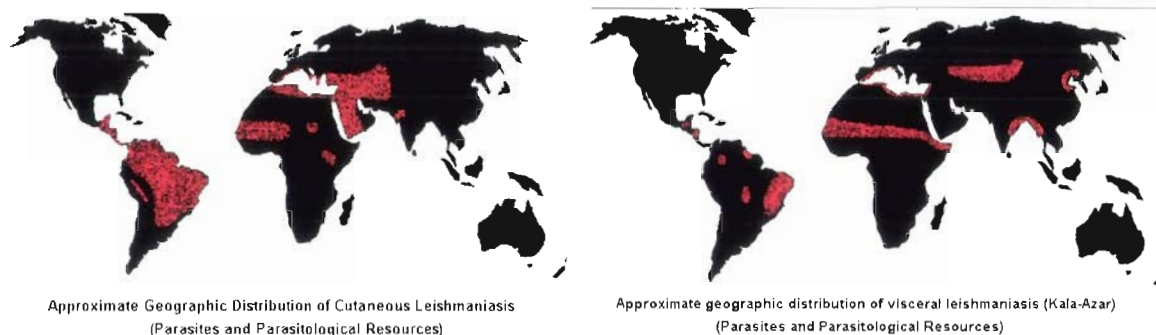
- l'Ancien Monde : bassin méditerranéen (dont le sud de la France) , le Proche, le Moyen, l'Extrême Orient et l'Afrique (à l'exception de l'Afrique du Sud),
- le Nouveau Monde : Més Amérique et Amérique du Sud.

2.3 – Manifestations cliniques et diagnostic.

Les leishmanioses sont principalement des zoonoses, affectant des animaux aussi bien commensaux ou sauvages que domestiques. Ils constituent alors des réservoirs à partir desquels l'homme peut être infecté. Seuls le kala-azar indien dû à *Leishmania donovani* et les formes cutanées à *Leishmania tropica* peuvent être considérées comme des anthroponoses.

La co-infection *Leishmania*/VIH est une nouvelle maladie extrêmement grave et de plus en plus fréquente, avec toutes les conséquences que cela implique en clinique, au niveau du diagnostic et de la chimiothérapie, et sur le plan épidémiologique et économique. L'évolution vers le tableau complet de l'infection parasitaire vient de l'état d'immunodépression lié à la sévère séropositivité pour le VIH, que l'on retrouve également après un traitement immunosuppresseur à la suite de greffes d'organes, d'affections hématologiques cancéreuses, de maladies auto-immunes. Par une sorte de coopération, le virus du SIDA et les leishmanies se renforcent mutuellement. D'une part, la leishmaniose hâte l'apparition du SIDA déclaré (avec des maladies opportunistes telles que la tuberculose ou la pneumonie) et réduit l'espérance de vie des personnes infectées par le VIH. De l'autre, le VIH favorise la propagation des leishmanies dans l'organisme de l'hôte. Ces deux affections conjuguées provoquent une double immunodéficience car les leishmanies et le VIH détruisent les mêmes cellules, de sorte que la gravité de la maladie et ses conséquences augmentent de façon exponentielle (Alvar *et al.*, 1997 ; Desjeux *et al.*, 2001).

A



B

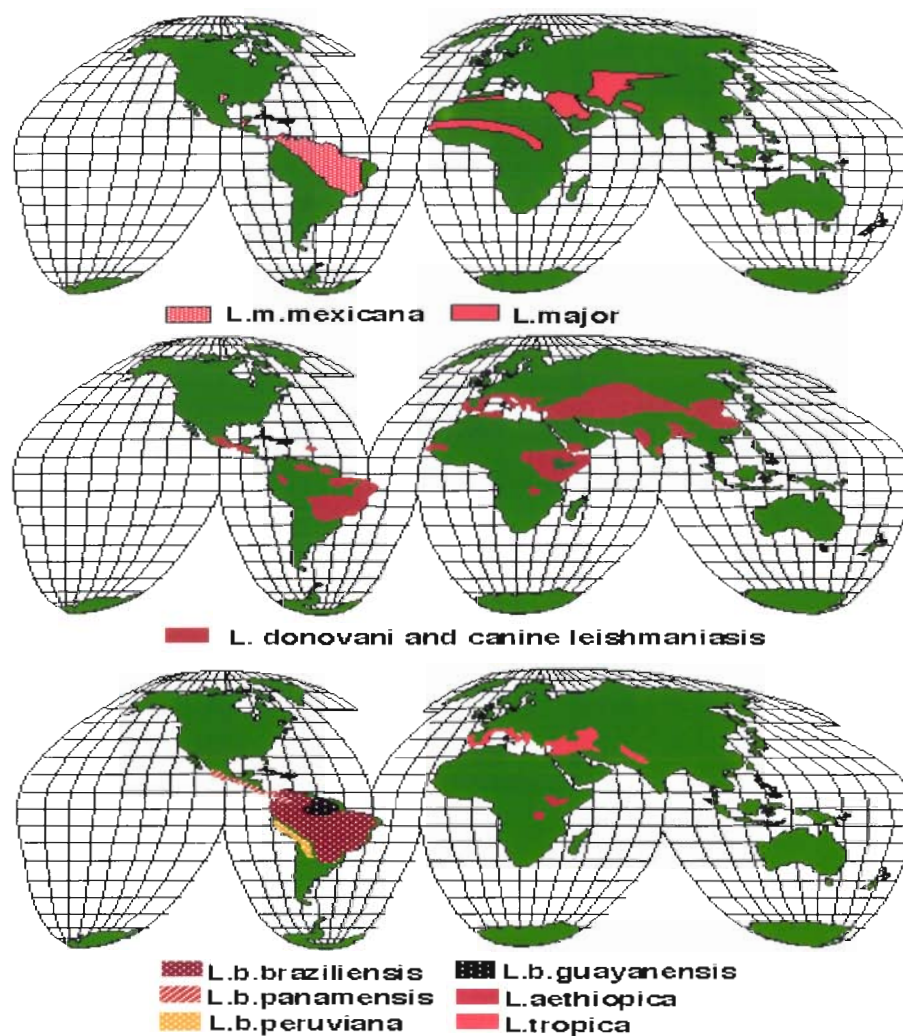


Figure 6 : Répartition géographique des leishmanioses. A : Répartition géographique des leishmanioses cutanées et viscérales (d'après <http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/>). B : Répartition géographique de certaines espèces de leishmanies (d'après <http://www.microbiology.wustl.edu>).

Les leishmanies ont la particularité de provoquer des tableaux cliniques qui diffèrent par leur localisation, leur gravité et leur retentissement social. Outre les infections asymptomatiques, trois grandes formes cliniques se distinguent : les leishmanioses cutanées (LC), cutanéomuqueuses (LCM) et viscérales (LV). Ce polymorphisme dépend non seulement des caractéristiques biologiques des espèces mais aussi de la réponse immunitaire de l'hôte. Les leishmanioses humaines provoquent une large variété de manifestations, aiguës ou chroniques, dépendantes de l'espèce infectante. Elles varient entre infections viscérales et plusieurs formes de lésions cutanées (Tableau 1). Les caractéristiques symptomatologiques communes : fièvre, asthénie, céphalées et vertiges, perte de poids et diarrhée ne sont pas significatives et ne favorisent pas le diagnostic.

Espèces	Manifestations cliniques	Guérison spontanée	Distribution géographique
<i>L. donovani</i>	LV (Kala Azar)	Non	Ancien monde
<i>L. infantum</i>	LV (Kala Azar)/LC	Non	Ancien monde
<i>L. chagasi</i> (= <i>L. infantum</i> ?)	LV (Kala Azar)	Non	Nouveau monde
<i>L. tropica</i>	LC (Bouton d'Orient)	Récidivante	Ancien monde
<i>L. major</i>	LC (Lésion humide)	Lente/ Non (SIDA)	Ancien monde
<i>L. aethiopica</i>	LC/LCD	Lente/ Non	Ancien monde
<i>L. mexicana</i>	LC (Ulcère des chicleros)	Variable	Nouveau monde
<i>L. amazonensis</i>	LC/LCD/LV	Variable/ Non	Nouveau monde
<i>L. pifanoi</i>	LC/LCD	Variable/ Non	Nouveau monde
<i>L. braziliensis</i>	LCM (Espundia)/LC	Non/ Oui	Nouveau monde
<i>L. guyanensis</i>	LC (Pian bois)	Oui	Nouveau monde
<i>L. panamensis</i>	LC (Ulcère unique)/LCM	Non/ Oui	Nouveau monde
<i>L. peruviana</i>	LC (Uta)	Généralement	Nouveau monde

Tableau 1 : Formes cliniques et répartition géographique de différentes espèces de leishmanies. LV : leishmaniose viscérale, LC : leishmaniose cutanée, LCD : leishmaniose cutanée diffuse, LCM : leishmaniose cutanée muqueuse.

Le diagnostic des leishmanioses repose classiquement sur des examens parasitologiques et immunologiques. A partir de différents types de prélèvements (sang périphérique, peau, moelle osseuse ou plus rarement la rate), des examens directs au microscope sur frottis ou coupes histologiques sont pratiqués. La mise en culture *in vitro* des prélèvements est un complément indispensable car elle permet d'avoir accès directement au parasite, et de pouvoir ainsi typer la souche isolée ou tester sa sensibilité aux drogues. Les parasites sont cultivés sous la forme promastigote à 25°C, pH 7.2, dans des milieux biphasiques comme le milieu NNN (Novy-macNeal-Nicolle ; Novy et MacNeal, 1904; Nicolle et Comte, 1908) ou dans des milieux liquides comme le milieu *Drosophila* de Schneider ou le RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Berens *et al.*, 1976), additionnés de sérum de veau fœtal décomplémenté et éventuellement enrichis en glucose, pyruvates, L-glutamine et hémine. Les techniques de biologie moléculaire ont permis de gagner en spécificité et en efficacité. L'amplification de l'ADN parasite par PCR peut s'effectuer sur des séquences répétées provenant d'ADN génomique (Wilson *et al.*, 1992 ; Piarroux *et al.*, 1993), sur l'ADN codant la petite sous-unité de l'ARN ribosomal (Uliana *et al.*, 1994) ou le miniexon (Ramos *et al.*, 1993), ou sur les séquences d'ADN codant des antigènes d'intérêt (Button et MacMaster, 1988). Il est également possible d'inoculer les prélèvements à des animaux de laboratoires (hamster ou souris), mais considérant les difficultés techniques et éthiques et la durée des expériences, cette méthode est limitée à l'isolement de souches difficiles à maintenir *in vitro*. Les tests immunologiques sont de deux types en fonctions de l'immunité, à médiation cellulaire ou humorale, impliquée. L'intradermoréaction ou test de Montenegro (Montenegro, 1926) consiste en l'injection intradermique de leishmanine (suspension de promastigotes, tués par la chaleur puis solubilisés au phénol, ou actuellement fixés au paraformaldéhyde). La lecture se fait 48 à 72 heures après l'injection et une réaction inflammatoire dont le diamètre dépasse 5 mm signe la positivité de l'infection leishmanienne. Cependant celle-ci n'est pas forcément active car le test peut identifier les traces d'une leishmaniose ancienne. La forte réponse humorale générée au cours des leishmanioses a permis de développer des outils diagnostics de référence : l'immunofluorescence sur des formes promastigotes fixées, le test d'agglutination directe (DAT) sur des promastigotes fixés et trypsinés, les tests ELISA (Enzyme-Linked ImmunoAbsorbant Assay) dont la sensibilité et la spécificité dépendent de l'antigène utilisé, et l'immunoempreinte (technique expérimentale) qui est hautement sensible et permet de suivre l'évolution de la maladie et d'identifier les différentes classes d'immunoglobulines constituant la réponse immune.

2.3.1 – La leishmaniose cutanée (Figure 7).

Après une période d'incubation pouvant aller de quelques semaines à plusieurs mois, apparaît une papule prurigineuse rouge sombre, généralement unique au point d'inoculation, siégeant sur une région découverte du corps, le plus souvent au niveau du visage. La lésion va ensuite évoluer vers une vésicule qui s'ulcère, s'infiltrer en profondeur et se recouvre de fines squames évoluant très lentement sous forme sèche ou sous forme humide, vers la guérison au prix d'une cicatrice indélébile. La leishmaniose cutanée diffuse (LCD) est une manifestation particulière de la forme cutanée simple, qui est associée à un état spécifique d'anergie ou d'absence de réponse immune. Elle se présente sous formes de vésicules voire de nodules disséminés sur l'ensemble du corps, et qui bien que souvent indolores soient extrêmement défigurant (Herwaldt *et al.*, 1992 ; Weigle et Saravia, 1996).

Le diagnostic de la LC repose essentiellement sur l'apparition de la lésion. La culture des parasites est préférable mais il existe des difficultés d'isolement des parasites à partir de la lésion, surtout si celle-ci est ancienne. Les mêmes difficultés s'appliquent à l'examen microscopique de biopsies. Néanmoins, la culture de parasites peut donner des résultats positifs en 1 à 3 semaines. L'intradermoréaction peut donner des résultats positifs 3 mois après l'apparition de la lésion. Enfin, les tests sérologiques ne sont pas encore fiables (Halpern, 2001).

2.3.2 – La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) ou *espundia* (Figure 8).

Après une période de 1 à 3 mois, on note l'apparition d'une lésion cutanée primaire qui va se résorber. Parfois de nombreuses années après une guérison apparemment complète, vont naître des lésions métastatiques sur les muqueuses buccale et nasale. La muqueuse et le cartilage palatin vont se déformer et évoluer vers l'ulcération et l'érosion du septum nasal (nez de Tapir) puis des lèvres et du palet pour finir par une destruction complète de la sphère naso-oropharyngée (Herwaldt, 1999 ; Ashford, 2000).

Le premier symptôme qui peut aider au diagnostic est une irritation de la pointe du nez ou des autres surfaces affectées. La mise en culture des parasites est très difficile car les amastigotes sont peu abondants au niveau de la lésion. Sur les biopsies, des réactions granulomateuses non spécifiques sont souvent observées mais la coloration au Giemsa peut

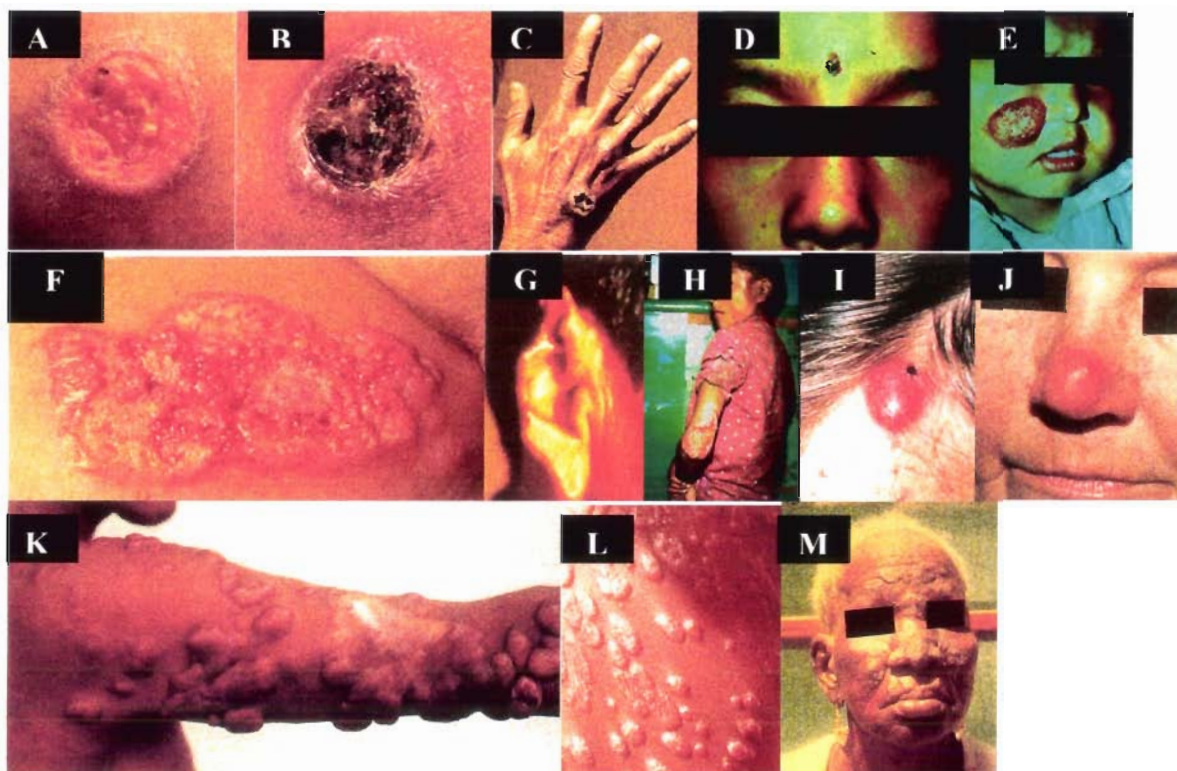


Figure 7 : Manifestations cliniques de la leishmaniose cutanée. A : ulcération avec bourrelet inflammatoire périphérique et fond sangneux. B : ulcération croûteuse. C : lésion ulcérée. D : bouton d'orient. E : lésion à extension périphérique. F : lésion papillomateuse végétante et érosive. G : mutilation du pavillon de l'oreille consécutive à « l'Ulcère des Gommiers ». H : large ulcération nécrotique. I : forme nodulaire tumorale « lupoïde ». J : infiltration en nappe. K : leishmaniose cutanée diffuse (LCD), nodules tumoraux confluent. L : LCD, petits nodules sur le dos. M : LCD, faciès léonin. (A, B : photos J.P. Dedet ; C, K: photos P. Desjeux ; D, E, H : d'après <http://www.icp.ucl.ac.be> ; F : photo R. Pradinaud ; G : photo Andrade-Narvaez ; I, J : photos R. Perello ; L, M : photos B. N'Diaye).



Figure 8 : Manifestations cliniques de la leishmaniose cutanéomuqueuse. A : effondrement de la cloison nasale. B : nez de tapir. C : atteinte pharyngienne. D : atteinte des muqueuses buccales. E : graves mutilations faciales. (A, C : photos L. Valda-Rodriguez ; B, E: d'après <http://www.icp.ucl.ac.be> ; D : photo P. Desjeux).

permettre d'identifier des parasites. Des tests sérologiques sont disponibles et donnent des résultats plus fiables que pour la leishmaniose cutanée simple. Cependant, en raison de la faible charge parasitaire, le diagnostic est souvent épidémiologique : voyage en zone d'endémie, tableau clinique associé à des analyses biologiques (Halpern, 2001).

2.3.3 – La leishmaniose viscérale (LV) ou kala-azar (Figure 9).

Il s'agit de la forme la plus grave de la maladie, avec une mortalité de presque 100% en l'absence de traitement. La leishmaniose viscérale englobe un grand nombre de manifestations cliniques, allant de la phase asymptomatique jusqu'au développement chronique de la maladie. Le syndrome classique du kala-azar débute après une période d'incubation variable, quelques semaines à plusieurs mois, et se caractérise par une fièvre dite *Dum-Dum* (persistante, irrégulière ou rémittente), une cachexie sévère, une hépatosplénomégalie, une pancytopénie (anémie, thrombocytopénie et leucopénie, avec neutropénie, forte éosinopénie et des lymphocytose et monocytose relatives) et une hypergammaglobulinémie (principalement des Immunoglobulines G issues de l'activation polyclonale des cellules B) accompagnée d'une hypoalbuminémie (Herwaldt, 1999).

La leishmaniose cutanée post kala-azar est une séquelle classique d'une leishmaniose viscérale qui guérie par traitement. Cette manifestation apparaît habituellement dans les 2 ans qui suivent la guérison complète de l'infection viscérale, et commence avec l'apparition de tâches sur la peau, comme des tâches de rousseur. L'évolution est équivalente à la LC diffuse et très mutilante (Ashford, 2000).

Le diagnostic définitif de la leishmaniose viscérale est basé sur l'observation microscopique de parasites sur des frottis colorés au Giemsa ou dans des cultures de prélèvements de moelle osseuse, de rate, de foie ou de ganglions lymphatiques. Les cultures sont positives en 1 à 3 semaines. Les tests d'immunofluorescence indirecte ne sont pas disponibles directement mais il peut exister des réactions croisées avec d'autres espèces de leishmanies ou de trypanosomes. Enfin, chez des patients à risques, il peut être intéressant de faire une formule sanguine ou des tests de coagulation et de la fonction hépatique (Halpern, 2001).

2.3.4 – La leishmaniose canine (Figure 10).

La leishmaniose viscérale canine est une pathologie bien connue des vétérinaires du Sud de la France. Des travaux pionniers ont montré que l'affection débute par un chancre d'inoculation au niveau de la truffe, du chanfrein ou de la face interne de l'oreille (Adler et Theodor, 1932). Les lésions peuvent être unique ou multiples et apparaissent entre 1 et 6 mois après la période d'infestation (Vidor *et al.*, 1991). Après 6 à 9 mois d'évolution, la cicatrisation est la règle générale et la viscéralisation surviendra quelques mois à quelques années plus tard. Le chien leishmanien présente un amaigrissement généralisé, associé à un état d'asthénie et de faiblesse, bien que l'appétit soit conservé. L'amyotrophie est particulièrement marquée au niveau de la face et des membres antérieurs, donnant à l'animal un aspect sénile, atonique et triste. Au niveau des organes profonds, hépato-splénomégalie et adénopathies sont fréquentes. Les signes cutanés sont nombreux : hyperkératose, dépigmentation et dépilation, notamment autour des yeux (signe des lunettes), desquamation, ulcérations cutanées au niveau du crâne, du bord des oreilles, des coussinets plantaires et de la truffe, onychogryphose (ongles de fakir). L'ulcération des muqueuses nasales est responsable d'épistaxis, et des atteintes oculaires viennent compléter le tableau clinique : granulomes, hyperhémie, kératite, uvéite, chorioretinite (MacConnel *et al.*, 1970). Cependant, certains chiens ayant présenté un chancre d'inoculation confirmé parasitologiquement, ne présentent de signes ni cliniques ni sérologiques de leishmaniose viscérale. Ces chiens asymptomatiques pourraient être des cas de résistance naturelle à la maladie, ou encore des formes infra-cliniques (Pinelli *et al.*, 1994). Paradoxalement, une issue rapidement fatale semble toucher ces chiens, souvent due à une glomérulonéphrite responsable d'une insuffisance rénale liée au dépôt d'immunocomplexes au niveau des glomérules rénaux, ou encore à des lésions pulmonaires issues d'une pneumonie interstitielle (Duarte *et al.*, 1986).

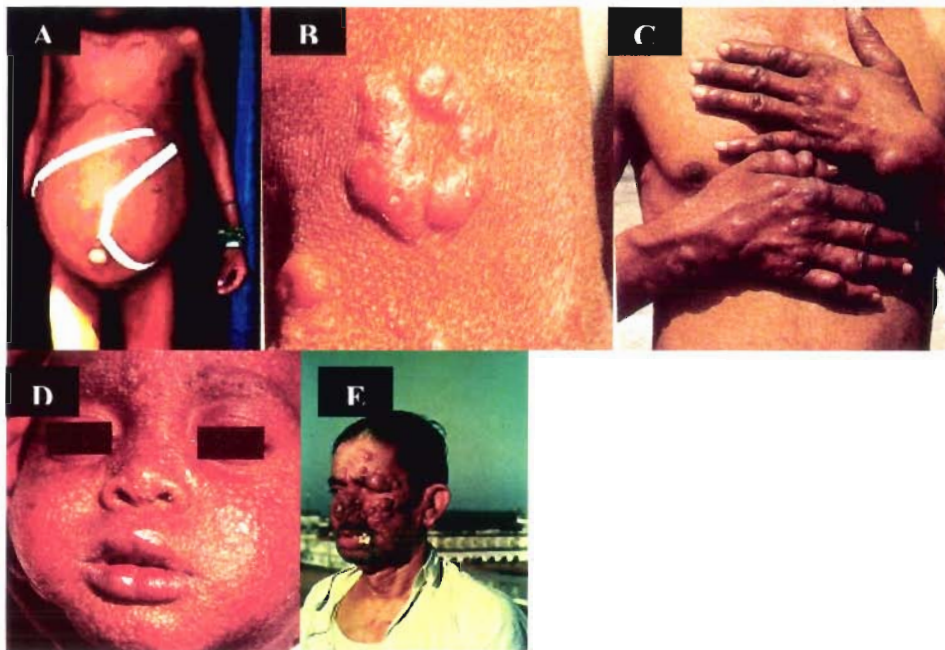


Figure 9 : Manifestations cliniques de la leishmaniose cutanéomuqueuse. A : hépatosplénomégalie chez l'enfant. B : leishmaniose dermique post-kala-azar en Inde, nodules cutanés très riches en parasites. C : leishmaniose dermique post-kala-azar en Inde, forme mixte avec nodules et taches hyperpigmentées. D : leishmaniose dermique post-kala-azar au Soudan, forme infantile. E : leishmaniose dermique post-kala-azar au Soudan, forme de l'adulte. (A, E : d'après <http://www.icp.ucl.ac.be> ; B, C : photos A. Nandy ; D : photo E.E. Zijlstra).

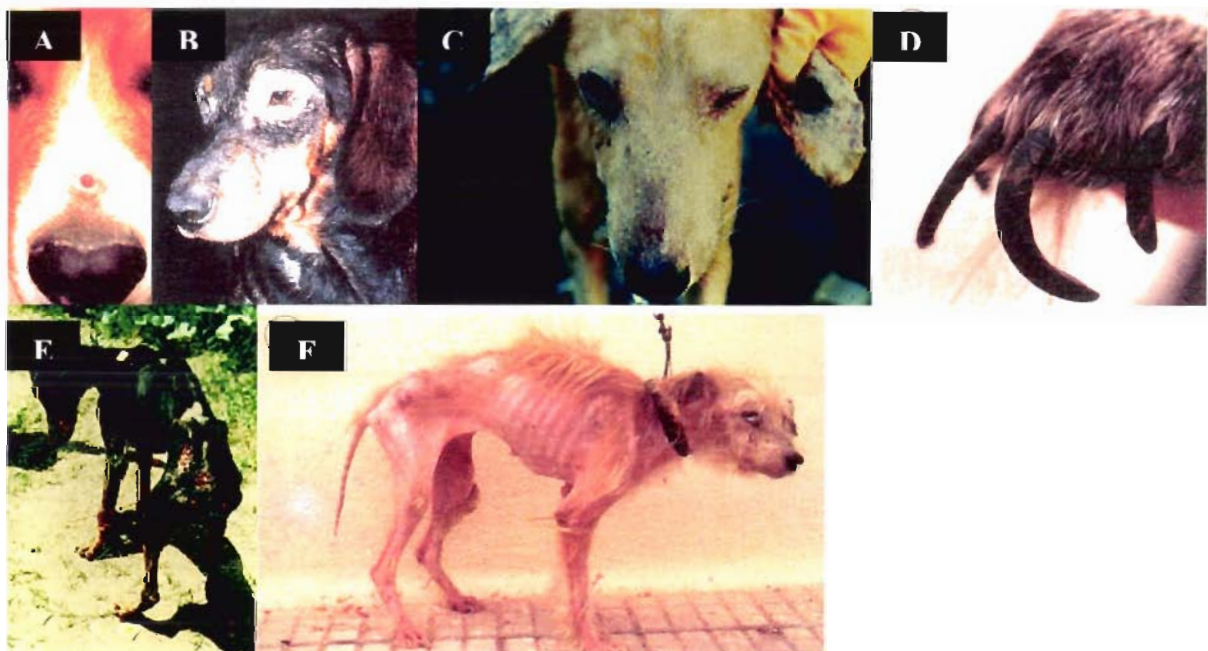


Figure 10 : Manifestations cliniques de la leishmaniose canine. A : chancre d'inoculation du chanfrein. B : dépilation et dermite furfuracée péri-orbitaire, « signe des lunettes ». C : ulcérations diffuses. D : onychogriphose. E : Dermite furfuracée de l'arrière-train. F : dépilation et cachexie chez un chien en phase terminale. (A : photo J. Dereure ; B : photo J.A. Rioux ; C, E : d'après <http://www.icp.ucl.ac.be> ; D, F : photos J.P. Dedet).

Le diagnostic de la leishmaniose canine est parfois difficile car les signes de la maladie sont très variés et parfois discrets. Plusieurs examens sanguins (sérologie, électrophorèse des protéines) permettent de confirmer le diagnostic clinique. Dans certains cas complexes, des analyses de la peau (calques, biopsies), de moelle osseuse ou des ganglions permettent de mettre en évidence le parasite grâce aux outils de biologie moléculaire (PCR). Des kits diagnostic existent également et offrent un dépistage rapide et fiable : test par immunofluorescence, test d'agglutination (Leishmatest®), test immunochromatographique sur membrane (Speed®Leish).

2.4 – Le traitement des leishmanioses.

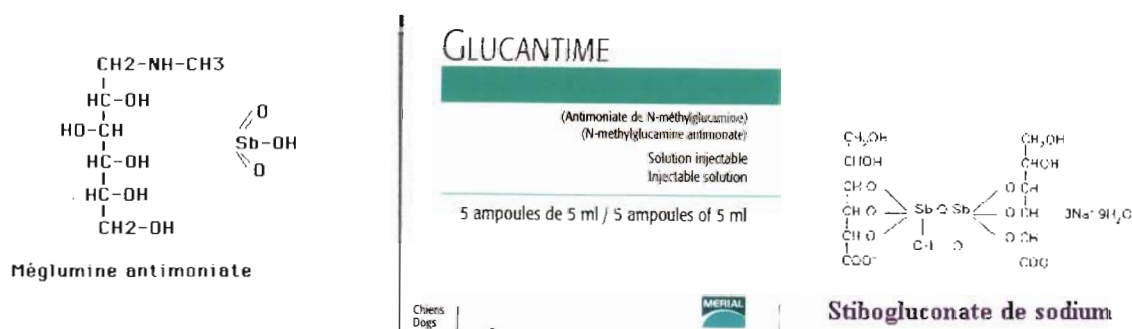
Le traitement idéal vise à éliminer les parasites et à promouvoir la guérison du patient. L'arsenal thérapeutique classique utilisé pour traiter les leishmanioses se compose en première intention exclusivement des dérivés pentavalents de l'antimoine (Glucantime® et Pentostam®), et dans les cas de non-réponse au traitement, de la pentamidine et de l'amphotéricine B. L'injection par voie intramusculaire ou intraveineuse est utilisée pour traiter tous les types de leishmanioses. Dans le cas des leishmanioses cutanées à guérison spontanée, il est toutefois possible de réaliser des injections intralésionnelles (Oliveira-Neto *et al.*, 1997 ; Sharquie *et al.*, 1997). La toxicité des médicaments classiquement utilisés pour traiter l'infection leishmanienne est bien connue, en dépit de la vectorisation de principes actifs comme l'amphotéricine B, et des cas de non-réponse au traitement ont été décrits (Wali *et al.*, 1992 ; Sundar *et al.*, 1994).

2.4.1 – Les traitements des leishmanioses humaines.

2.4.1.1 – Les dérivés stibiés.

Les dérivés de l'antimoine sont utilisés en médecine depuis l'antiquité. L'antimonio-tartrate de potassium (dérivé trivalent de l'antimoine), connu pour avoir une activité contre les trypanosomes, a été utilisé avec succès pour soigner la leishmaniose cutanéomuqueuse par Viannia en 1912. Cependant du fait de leur toxicité, les antimoniés trivalents organiques ou inorganiques ont été progressivement remplacés par les dérivés pentavalents dans les années 1920. Les dérivés de l'antimoine sont recommandés pour toutes les formes de leishmanioses, à l'exception des LCD.

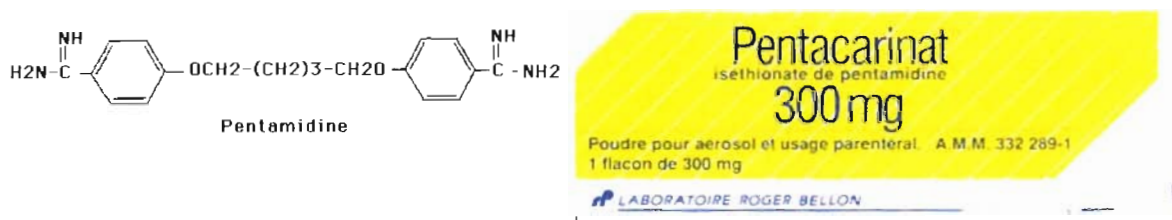
Actuellement deux formulations sont commercialisées: l'antimoniote de meglumine ou Glucantime®, contenant 85 mg/ml de Sb^{5+} et le stibogluconate de sodium, ou Pentostam® contenant 32% de Sb^{5+} (Traitement des leishmanioses dans les pays anglophones). La posologie actuelle découle des recommandations de l'O.M.S. et formulée selon Herwaldt & Berman (1992) est de 20 mg de Sb^{5+} par kg de poids corporel par jour, en cure de 20 jours pour une LC et de 30 jours dans le cas de la LV et de la LCM (*L. aethiopica* est réfractaire aux antimonials utilisés aux doses traditionnelles). L'injection est faite par voie intramusculaire profonde ou injections péri-lésionnelles à doses progressivement croissantes. Les effets secondaires sont importants : douleurs au point d'injection, troubles gastro-intestinaux et douleurs musculaires. La toxicité de ces traitements nécessite une hospitalisation obligatoire avec surveillance de la fonction rénale. Il existe également un risque de stibio-intolérance, en début de cure : fièvre, toux, myalgies, et en fin de traitement : atteinte hépato-rénale, myocardite, tachycardie, troubles de l'ECG, polynévrite si la dose totale est dépassée, avec un risque de choc anaphylactique dû aux sulfites.



Le mode d'action des dérivés stibiés est encore mal connu mais plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer l'action du Pentostam® et du Glucantime®. La première hypothèse a été démontrée par Goodwin et concerne la réduction des dérivés pentavalents en dérivés trivalents, fortement toxiques pour les leishmanies (Goodwin *et al.*, 1943 ; Goodwin, 1995). Les dérivés trivalents agissent en inhibant la phospho-fructo-kinase, la déshydrogénase pyruvique et les glutathion-S-transférases, bloquant ainsi des enzymes essentielles au métabolisme énergétique (Euzeby, 1986 ; Poon et Chu, 2000). Le mécanisme de réduction pourrait être réalisé par la cellule hôte, ce qui expliquerait la toxicité sélective des dérivés de l'antimoine (Serenio et Lemesre, 1997 ; Serenio *et al.*, 1998 ; Shaked-Mishan *et al.*, 2001). Les bases biochimiques de l'activité microbicide des dérivés stibiés sont peu décrites, mais leur action pourrait être due à l'inhibition de la synthèse d'ATP (Berman *et al.*, 1985 ; Berman, 1988), à la formation de complexes clivables ADN-protéines (Lucumi *et al.*, 1998), et à son

action sur les trois fonctions principales des glycosomes que sont la glycolyse, la β -oxydation des acides gras et la fixation du gaz carbonique. La seconde hypothèse a été démontrée au cours d'expériences de fractionnement du Pentostam®. Il s'est avéré que la fraction la plus active était celle qui contenait du m-chlorocrésol, le conservateur du Pentostam® (Roberts et Rainey, 1993).

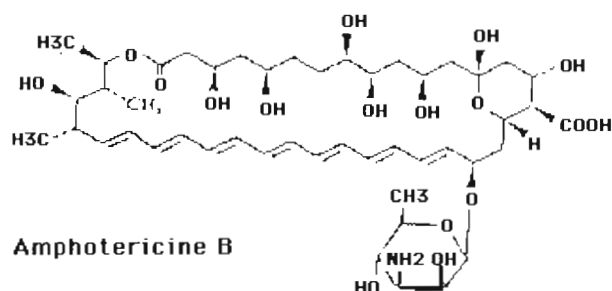
2.4.1.2 – La pentamidine.



La pentamidine est une diamine aromatique. Elle a d'abord été utilisée dans les années 1930-1940 contre les trypanosomes africains (Lourie et Yorke, 1939), puis appliquée aux leishmanies (Kirk et Sati, 1940; Wingfield, 1941; Napier *et al.*, 1943). Deux sels de pentamidine étaient employés avec des résultats semblables : le mésylate de pentamidine ou Lomidine® (retiré du marché) et l'iséthionate de pentamidine ou Pentacarinat®.

La pentamidine est utilisée dans les cas de non réponse au Pentostam® ou au Glucantime®. Elle est préférée aux dérivés stibiés pour traiter la forme *espundia* de la LCM et la LC due à *L. aethiopica*, réfractaire à l'action des antimoniés (Calza *et al.*, 2001). La pentamidine est administrée par voie parentérale, intramusculaire ou intraveineuse avec des effets secondaires nécessitant une étroite surveillance médicale : douleur, hypotension à l'injection, troubles rénaux, hypoglycémie à l'injection puis hyperglycémie, augmentation des transaminases, troubles hématologiques et cardiaques.

2.4.1.3 – L'amphotéricine B.



L'amphotéricine B ou Fungizone® appartient au groupe des antibiotiques microlides polyéniques. Cette molécule a d'abord été utilisée en tant qu'antifongique au début des années 1950 puis a été appliquée aux leishmanioses. Du fait de sa toxicité, l'amphotéricine B est généralement utilisée pour traiter les cas réfractaires aux autres thérapeutiques. Elle a néanmoins un côté pratique puisqu'elle peut être administrée *per os* avec moins d'effets secondaires que par voie injectable (fièvre dose dépendante, frissons, céphalées, malaise général, néphrotoxicité dose dépendante, thrombopénie, anémie, plus un risque de collapsus cardio vasculaire lors de la première injection => utilisation de Fungizone® injectable en milieu hospitalier exclusivement, à doses progressivement croissantes en perfusion lente avec surveillance de la fonction rénale). L'amphotéricine B provoque une altération de la membrane cellulaire aboutissant à une fuite du matériel intracellulaire, et ainsi n'entraîne pas la sélection de souches résistantes.

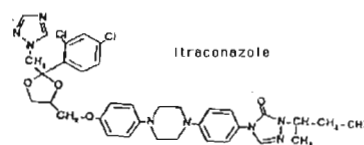
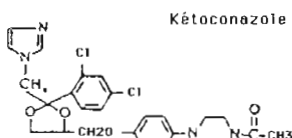
L'amphotéricine B sous sa forme vectorisée est plus efficace, et est même utilisée en première intention pour les co-infections leishmanies/SIDA en Europe. L'utilisation des liposomes d'amphotéricine B dans la thérapie de la leishmaniose a été initialement proposée par New *et al.* (1981). Récemment, une formulation liposomiale unilamellaire d'amphotéricine B (AmBisome®) (Ahmad *et al.*, 1991; Croft *et al.*, 1991) s'est avérée efficace contre des infections résistantes aux dérivés de l'antimoine (Croft *et al.*, 1991; Davidson *et al.*, 1991; Giacchino *et al.*, 1993; Sundar *et al.*, 1997). L'amphotéricine B encapsulée a une toxicité nettement moindre que l'amphotéricine B conventionnelle, réduisant ses effets

secondaires, et permet d'administrer rapidement des doses plus importantes de médicaments.

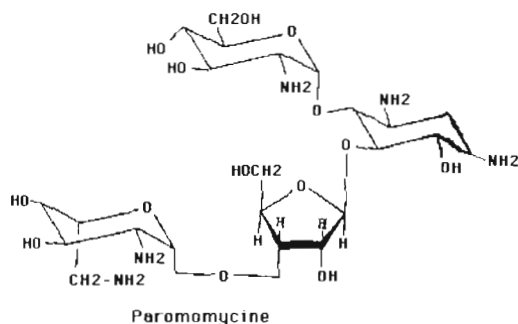
2.4.1.4 – Les nouvelles approches thérapeutiques.

Les progrès réalisés ces dernières années dans le traitement des leishmanioses ont été basés principalement sur l'utilisation combinée de molécules existantes ou utilisées dans d'autres infections ainsi que sur la stimulation du système immunitaire, plutôt que sur la découverte de nouvelles molécules anti-leishmaniennes.

L'**allopurinol**, analogue structural de l'hypoxanthine, peut être associé aux antimonies pour traiter les LC dues à *L. panamensis*. En association avec certains antifongiques imidazolés (**kétoconazole**, **itraconazole**), l'allopurinol a montré des résultats intéressants contre la leishmaniose viscérale (Kuyucu *et al.*, 2001).



La **paromycine**, antibiotique utilisé par voie orale pour le traitement de diarrhées bactériennes ou parasitaires, s'est révélée efficace par voie parentérale dans le traitement de la leishmaniose viscérale, seule ou en association avec les antimonies (Thakur *et al.*, 2000). La paromycine est au départ un amoebicide de contact, dont l'activité s'exerce par blocage de la synthèse protéique.



Plusieurs cytokines entrent en jeu dans le contrôle naturel des leishmanioses, parmi lesquelles l'interféron γ (voir § III, 2). Une chimiothérapie combinée avec un apport d'interféron γ synthétique devrait potentialiser l'activité microbicide des macrophages. Ainsi,

l'antimoine (20 mg/Kg/jour) en combinaison avec de l'**interferon- γ** humain recombinant (Imukin[®] 100 mg/m² de surface corporelle/jour) a été utilisé avec succès pour traiter des patients atteints de leishmaniose viscérale et cutanéomuqueuses (Badaro *et al.*, 1990; Bottasso *et al.*, 1992; Falcoff *et al.*, 1993).

Un nouveau médicament a vu le jour tout récemment et a été homologué en Inde, où l'on observe 50 % de la charge mondiale de la leishmaniose viscérale. Cette molécule, la **miltéfosine** (Impavido[®]), est le premier médicament par voie orale contre la leishmaniose. Elle sera vraisemblablement moins chère et plus facile à administrer que tous les traitements actuels. Elle a guéri 95 % des patients traités au cours des essais cliniques.

2.4.2 – Le traitement de la leishmaniose canine.

Depuis de nombreuses années, les vétérinaires traitent la leishmaniose viscérale canine avec le Glucantime[®] (Lamothe, 1999). Depuis quelques années ce traitement a été modifié, soit en allongeant la période et la fréquence d'administration de ce médicament, soit en l'associant à l'allopurinol (Ferrer, 1997). Ce dernier traitement est même souvent maintenu durant toute la vie du chien, cependant, le traitement peut-être interrompu lorsque les signes cliniques disparaissent, que les examens sanguins et le protéinogramme sont normaux et lorsque deux PCR sur de la moelle osseuse séparées de 6 mois sont négatives. La pentamidine peut aussi être utilisée, mais comme chez l'homme elle a des effets toxiques. Enfin, le traitement par de l'amphotéricine B liposomiale (AmBisome[®]) semble prometteur.

2.4.3 – La vaccination anti-leishmanienne.

Les problèmes de diagnostic précoce, les difficultés de traitement font que les leishmanioses restent encore aujourd'hui un grave problème de santé publique. A l'heure actuelle, il n'existe pas de vaccin contre *Leishmania* qui soit utilisé en routine, mais de nombreuses préparations vaccinales sont à l'étude dans le monde (Tableau 2). Les premières études, et celles qui ont peut-être donné les meilleurs résultats, sont basées sur l'inoculation de parasites vivants ou « leishmanisation », reposant sur l'observation ancienne que des personnes qui étaient guéries d'une lésion cutanée devenaient réfractaires à de nouvelles infections. Les problèmes éthiques posés par l'injection de parasites vivants ont orienté les recherches vers une vaccination avec soit des parasites atténués, soit tués. Avec l'avènement

des outils de la biochimie puis plus récemment ceux de la biologie moléculaire, la tendance des préparations vaccinales s'est tournée vers des fractions purifiées de lysats parasitaires puis vers des protéines recombinantes et enfin vers des peptides synthétiques. Les dernières tendances en matière de vaccination sont des constructions de vaccin ADN contenant le gène parasite d'intérêt dans des vecteurs d'expression eucaryotes. Il est intéressant de constater que parmi le grand nombre d'études réalisées, peu se sont avérées réellement efficaces. Néanmoins, des études en cours actuellement, qui ont atteint les essais cliniques de phase III, sont très prometteuses quant à l'existence prochaine du premier vaccin contre la leishmaniose. Il est fort probable que ce vaccin s'adressera dans un premier temps à la leishmaniose canine mais il aura ouvert la voie vers la vaccination humaine.

Tableau 2 : Exemples d'essais vaccinaux antileishmaniens (pp.28 à 30).

Abréviations :

BCG : bacille de Calmette-Guérin ;
 RhIL-12 : interleukine 12 humaine recombinante ;
 LiF2, LiF5, LiF6 : fractions antigéniques de *Leishmania infantum*, purifiées en fonctions de leur masse moléculaire ;
 LPG : lipophosphoglycane ;
 gp63 : glycoprotéine de masse moléculaire 63 kDa ;
 PSA : Promastigote Surface Antigens ;
 dp72 : protéine de 72 kDa purifiée à partir de promastigotes de *Leishmania donovani* ;
 LeIF : homologue de la protéine ribosomale humaine cIF4A ;
 TSA : thiol-specific-antioxidant proteins ;
 MAPS: microtubule associated proteins ;
 LmST1: *Leishmania major* stress-inducible 1 ;
 LACK: *Leishmania* homologue of the receptor for activated C kinase ;
 LCR1: antigène recombinant purifié à partir d'une banque d'ADN ;
 Amastigotes A2, P4, P8: antigènes purifiés par chromatographie d'immuno-affinité ;
 LD1: locus du chromosome 35 portant les gènes *BTI* codant un transporteur de la bioptérine et *ORFF* (*open reading frame F*) dont le produit est inconnu ;
 dhfr/ts: dihydrofolate réductase/thymidylate synthase.

Type de vaccin	Espèces	Voie d'administration	Protection	Modèle	Etude clinique	Références
Promastigotes vivants « leishmanisation »	<i>L. major</i>	Intradermique	Inconstante, manifestations cliniques importantes	Homme	/	Lawrow et Dubowskoj, 1937 ; Kelina, 1965, 1981 ; Serebryakov <i>et al.</i> , 1968 ; Greenblatt, 1980.
Promastigotes atténués	<i>L. major</i>	Intraveineuse, Sous cutanée	Contre <i>L. major</i>	Souris	/	Liew <i>et al.</i> , 1984; Rivier <i>et al.</i> , 1993 ; Aebischer <i>et al.</i> , 1994.
Promastigotes tués	<i>L. major</i>	Intraveineuse ou intrapéritonéale	Contre <i>L. major</i>	Souris	/	Liew <i>et al.</i> , 1984; Scott <i>et al.</i> , 1987.
	<i>L. donovani</i>	/	Contre <i>L. donovani</i>	Hamster	/	Mukhopadhyay <i>et al.</i> , 1999.
Promastigotes tués au merthiolate	5 souches cutanées <i>L. braziliensis</i>	Intramusculaire Sous cutanée	Variable Contre <i>L. chagasi</i>	Homme Chien	Phases I-III Phases I-II	Mayrink <i>et al.</i> , 1978, 1979, 1985 ; Antunes <i>et al.</i> , 1986. Mayrink <i>et al.</i> , 1996.
Promastigotes tués par la chaleur	<i>L. amazonensis</i>	Intramusculaire	Immunogène	Homme	Phases I-II	Vélez <i>et al.</i> , 2000.
Promastigotes tués par la chaleur + BCG	<i>L. major</i> <i>L. infantum</i>	Intramusculaire	Variable contre <i>L. major</i> et <i>L. tropica</i> Contre <i>L. infantum</i>	Homme Chien	Phases I-II Phases I-II	Sharifi <i>et al.</i> , 1998 ; Momeni <i>et al.</i> , 1999. Mohebbali <i>et al.</i> , 1998 ; Lasri <i>et al.</i> , 1999 ; Fallah <i>et al.</i> , 2000.
Promastigotes tués par la chaleur + alum + rIL-12	<i>L. amazonensis</i>	Intramusculaire	Contre <i>L. amazonensis</i>	Singe Macaque rhesus	Phases I-III	Kenney <i>et al.</i> , 1999.
Extraits antigéniques de <i>Leishmania</i>						
Lysats de promastigotes (sonication)	<i>L. braziliensis</i>	/	Contre <i>L. chagasi</i>	Chien	/	Mayrink <i>et al.</i> , 1996.
Antigènes d'excrétion-sécrétion de promastigotes	<i>L. infantum</i>	Sous cutanée	Contre <i>L. infantum</i>	Chien	Phases I-III	Lemesre <i>et al.</i> , en cours.

Fractions antigéniques purifiées						
Fraction P1 (lysate de promastigotes)	<i>L. infantum</i>	/	Contre <i>L. major</i>	Souris	/	Rolland <i>et al.</i> , 1993
Fractions LiF6 < 20 kDa	<i>L. infantum</i>	Intraveineuse	Complète contre <i>L. major</i> et <i>L. mexicana</i>	Souris	/	Monjour <i>et al.</i> , 1988, 1992 ; Frommel <i>et al.</i> , 1988 ; Dunan <i>et al.</i> , 1989.
LiF5 20-30 kDa	<i>L. infantum</i>	Intraveineuse	Complète contre <i>L. major</i> et <i>L. mexicana</i>	Souris	/	
LiF2 67-94 kDa	<i>L. infantum</i>	Intradermique	Contre <i>L. braziliensis</i> Contre <i>L. chagasi</i>	Homme Chien	/ Phases I-III	
Fraction microsomale Pol-F	<i>L. amazonensis</i>	/	Contre <i>L. mexicana</i>	Souris	/	Gonçalves <i>et al.</i> , 1988.
Protéines recombinantes						
LPG délipidé	<i>L. major</i> et <i>L. donovani</i>	/	Exacerbation des lésions dues à <i>L. major</i>	Souris	/	Mitchell et Handman, 1986.
gp63 native recombinante	<i>L. mexicana</i> <i>L. major</i>	sous cutanée /	Contre <i>L. mexicana</i> Aucune	Souris Homme Singe	/ / Phases I-II	Russel et Alexander, 1988 ; Handman <i>et al.</i> , 1990 ; Russo <i>et al.</i> , 1991 ; Olobo <i>et al.</i> , 1995.
gp46/M2	<i>L. amazonensis</i>	/	Contre <i>L. amazonensis</i> et <i>L. mexicana</i>	Souris	/	Champs et MacMahon-Pratt, 1988 ; Handman <i>et al.</i> , 1995 ; Sjölander <i>et al.</i> , 1998.
PSA-2 native recombinante	<i>L. major</i> <i>L. major</i>	Intrapéritonéale /	Contre <i>L. major</i> Aucune	Souris Souris	/ Phases I-II	
dp72	<i>L. donovani</i>	/	Contre <i>L. donovani</i>	Souris	/	Jaffe <i>et al.</i> , 1990 ; Rachamin et Jaffe, 1993.
LeIF	<i>L. braziliensis</i>	/	Contre <i>L. major</i>	Souris	/	Skeiky <i>et al.</i> , 1995, 1998.
TSA (=MAPS)	<i>L. major</i>	/	Immunogène (+ IL-12)	Souris	/	Webb <i>et al.</i> , 1998.
LmST1 (=M15)	<i>L. major</i>	/	Immunogène	Souris Homme	/	Webb <i>et al.</i> , 1996.
LACK (+ IL-12)	<i>L. major</i>	/	Contre <i>L. major</i>	Souris	/	Mougneau <i>et al.</i> , 1995.
LCR1	<i>L. chagasi</i>	/	Partielle contre <i>L. infantum</i>	Souris	Phases I-II	Wilson <i>et al.</i> , 1995.

Amastigotes A2, P4 et P8	<i>L. pifanoi</i>	/	/	Souris	/	Soong <i>et al.</i> , 1995.
Protéases à cystéine d'amastigotes	<i>L. major</i>	Intrapéritonéale	Contre <i>L. major</i>	Souris	Phases I-II	Rafati <i>et al.</i> , 2000.
LD1	<i>L. donovani</i>	/	Contre <i>L. donovani</i>	Souris	/	Dole <i>et al.</i> , 2000.
rB1 hyrophile	<i>L. donovani</i>	/	Contre <i>L. donovani</i>	Souris	/	Stager <i>et al.</i> , 2000.
Peptides synthétiques						
gp63	<i>L. major</i>	Sous cutanée	Partielle à totale selon les peptides	Souris	/	Jardim <i>et al.</i> , 1990 ; Yang <i>et al.</i> , 1991; Spitzer <i>et al.</i> , 1999.
Banque génomique partielle	<i>L. major</i>	Sous cutanée Intramusculaire	Contre <i>L. major</i>	Souris	/	Piedrafita <i>et al.</i> , 1999.
Microorganismes génétiquement modifiés						
<i>Salmonella</i> gp63	<i>L. major</i>	Orale	Contre <i>L. major</i>	Souris	Phases I-II	Xu <i>et al.</i> , 1995.
BCG gp63	<i>L. major</i>	/	Contre <i>L. major</i> et <i>L. mexicana</i>	Souris	Phases I-II	Connel <i>et al.</i> , 1993 ; Abdelhak <i>et al.</i> , 1995.
BCG lcr1	<i>L. chagasi</i>	/	Contre <i>L. infantum</i>	Souris	Phases I-II	Streit <i>et al.</i> , 2000.
Vaccinia virus gp46	<i>L. amazonensis</i> <i>L. major</i>	Intrapéritonéale	Contre <i>L. amazonensis</i>	Souris	/	MacMahon-Pratt <i>et al.</i> , 1993.
Promastigotes dhfr-/ts-	<i>L. major</i>	/	Contre <i>L. major</i>	Souris	/	
Vaccins ADN						
Plasmide gp63	<i>L. major</i>	Intramusculaire Intradermique	Contre <i>L. major</i>	Souris	Phases I-II	Xu et Liew, 1994; Walker <i>et al.</i> , 1998.
Plasmide PSA-2	<i>L. major</i>	Intramusculaire	Contre <i>L. major</i>	Souris	Phases I-II	Handman <i>et al.</i> , 2000.
Plasmide LACK	<i>L. major</i>	Intradermique	Contre <i>L. major</i>	Souris	Phases I-II	Gurunathan <i>et al.</i> , 2000.
Clones d'ADNc d'amastigotes	<i>L. donovani</i>	/	Contre <i>L. donovani</i>	Souris	Phases I-II	Melby <i>et al.</i> , 2000.

II – Biologie des leishmanies.

1 – Organisation cellulaire.

Les leishmanies sont des protozoaires relativement évolués chez lesquels on peut observer la plupart des organites caractéristiques des cellules eucaryotes (Figure 11). Le parasite est limité par une membrane phospholipidique classique, doublée du côté interne par une couche de microtubules d'environ 20 nm de diamètre constituant le cytosquelette. La face externe de la membrane plasmique est composée d'une glycocalix, d'épaisseur variable selon le stade de développement du parasite, composée essentiellement de glycolipides de haut poids moléculaire, de glycoinositol-phospholipides de faible poids moléculaire (GIPLs) et de protéines membranaires ancrées par un glycosylphosphatidylinositol (GPI). La membrane des leishmanies est constituée d'ergostérol qui remplace les molécules de cholestérol constituant classiquement la membrane des eucaryotes (Beach *et al.*, 1988).

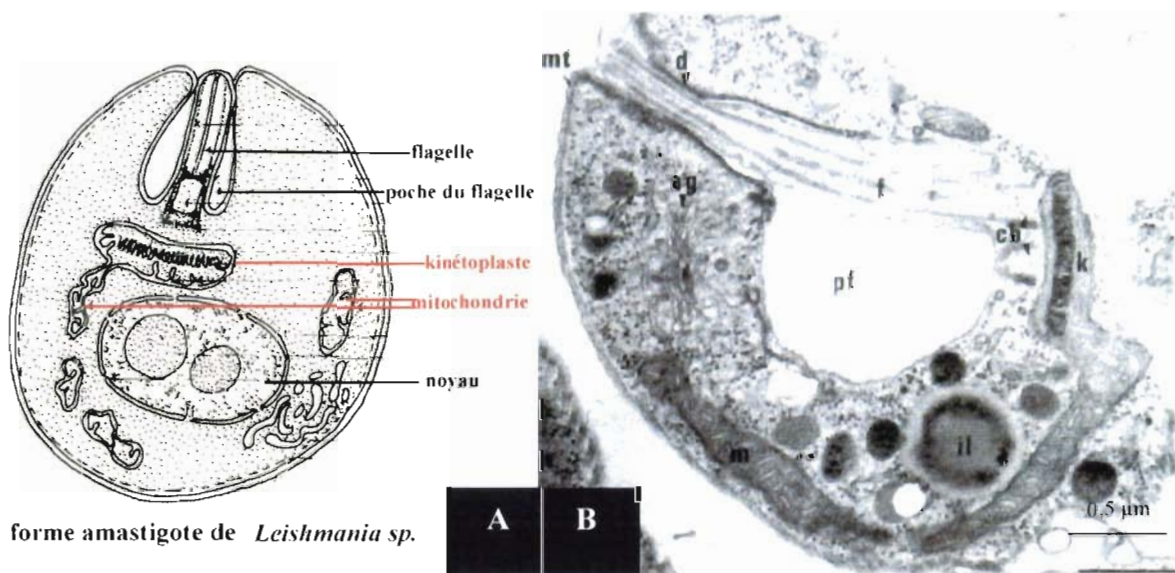


Figure 11 : Ultrastructure des leishmanies. A : représentation schématique (d'après T. Duriez). B : coupe de forme amastigote en microscopie électronique à transmission ; mt : microtubules, d : desmosomes, ag : appareil de Golgi, f : flagelle, cb : corpuscule basal, k : kinétoplaste, pf : poche flagellaire, m : mitochondrie, il : inclusion lipidique (photo J.C. Antoine).

Les leishmanies ont la particularité de posséder un flagelle situé à la partie antérieure des parasites. Ce flagelle est riche en microtubules stables associés en une structure complexe nommée axonème. La flexion de l'ensemble, dont l'énergie motrice est fournie par le kinétoplaste, assure la mobilité du promastigote. La base du flagelle est entourée par une invagination de la membrane plasmique formant la poche flagellaire. Cette portion de la

membrane plasmique est la seule, avec l'apex du parasite qui soit dépourvue de microtubules corticaux. Elle représente donc la zone principale, voire unique, où les vésicules provenant de l'appareil de Golgi vont fusionner avec la membrane plasmique et où les vésicules d'endocytose vont s'invaginer. La fermeture de la poche flagellaire est assurée par des ancrages desmosomiques au niveau du flagelle, qui permettront néanmoins une libre circulation des molécules entre le milieu extérieur et la poche flagellaire.

Les leishmanies, comme tous les kinétoplastidés possèdent des structures particulières: le kinétoplaste et les glycosomes. Le kinétoplaste se situe au niveau du corpuscule basal d'où part le flagelle. Il constitue l'unique mitochondrie fonctionnelle des kinétoplastidés. C'est un organite à double paroi contenant les molécules d'ADN kinétoplastique : les maxi-cercles et les mini-cercles. Les glycosomes, au nombre de 10 à 15 par cellule, de petite taille, sphériques ou allongés, sont apparentés aux peroxysomes et aux glyoxysomes des cellules eucaryotes supérieures. Ils jouent un rôle important dans le métabolisme parasitaire puisque de nombreuses étapes de la glycolyse s'y déroulent.

Enfin, les amastigotes du complexe *L. mexicana* possèdent des structures particulières appelées mégasomes. Ce sont des organites homologues aux lysosomes des cellules eucaryotes supérieures, qui ont un contenu acide et riche en hydrolases : phosphatases acides, arylsulfatase et protéases à cystéines.

2 – Organisation moléculaire.

2.1 – Le génome de *Leishmania*.

Le génome de *Leishmania* est resté pendant longtemps peu étudié en raison des difficultés que posait son analyse (Bastien *et al.*, 1999). Cependant l'évolution des techniques et la mise en place du réseau génome de *Leishmania* (*Leishmania* Genome Network) en 1994 ont permis d'accélérer son étude. La taille du génome haploïde est de 35 mégabases avec des variations de $\pm 0,5$ mégabase selon les souches, et relativement constante pour toutes les espèces de l'Ancien et du Nouveau Monde (Wincker *et al.*, 1996). Le nombre de chromosomes varie de 34 à 35 pour les espèces de leishmanies du Nouveau Monde, et il est de 36 pour celles de l'Ancien Monde (Britto *et al.*, 1998). L'une des caractéristiques essentielles du génome de *Leishmania* est sa richesse en G/C qui s'élève à 60 % en moyenne (Alavarez *et al.*, 1994). Le génome des leishmanies est assez peu complexe avec 60-65 % de séquences uniques, 13 % de séquences moyennement répétées et 12% de séquences fortement répétées (Leon *et al.* , 1978).

Le nombre de gènes connus est encore assez faible mais le séquençage automatique des ADNc est en cours dans le projet « *Leishmania* Genome Network ». Il faut noter qu'une forte proportion de gènes connus est répétée en tandem (Swindle et Tait, 1996), comme c'est le cas pour les gènes de la métalloprotéase gp63 ou des « Promastigote Surface Antigens », suggérant une régulation originale de l'expression génique.

La caractérisation de la ploïdie chez *Leishmania* est controversée, mais la diploïdie semble être l'hypothèse la plus vraisemblable. Des expériences de *knock-out* de gènes non essentiels ont montré que deux séries de transfection étaient nécessaires pour supprimer l'expression génique (Cruz *et al.*, 1991; Souza *et al.*, 1994; Webb et MacMaster, 1994). Il s'agirait cependant d'une diploïdie particulière puisque l'ensemble des marqueurs génétiques utilisés montre une forte homozygotie à la majorité des loci (Bastien *et al.*, 1992; Blaineau *et al.*, 1992; Rossi *et al.*, 1994). L'interprétation de ces données conduit à deux théories, soit une évolution clonale (Tibayrenc *et al.*, 1991), soit des échanges génétiques fréquents avec automixie au sein de populations limitées (Bastien *et al.*, 1992 ; Blaineau *et al.*, 1992).

2.2 – L'ADN kinétoplastique.

Le génome du kinétoplaste est constitué par deux classes de molécules d'ADN circulaire qui sont entrelacées et organisées en réseau : les maxi-cercles, équivalents du génome mitochondrial des eucaryotes supérieurs, et les mini-cercles qui interviennent en modifiant la transcription des gènes portés par les maxi-cercles (Ravel *et al.*, 1999). Le kinétoplaste contient 10 à 30 maxi-cercles identiques qui codent des transporteurs d'électrons et des ARN ribosomiques (ARNr) et guides (ARNg). Les mini-cercles plus nombreux et plus petits que les maxi-cercles, codent des ARNg qui interviennent dans l'édition de l'ARN, processus de modification des ARN transcrits codés par les maxi-cercles, par insertion/délétion de dérivés de l'uridine (Simpson, 1987). L'information nécessaire à l'édition est fournie par la complémentarité existant entre les ARNg et les ARN messagers (ARNm). Ce mécanisme permettrait une régulation différentielle des gènes mitochondriaux en fonction du développement parasitaire (Blum *et al.*, 1990).

2.3 – Une particularité de la transcription des gènes chez *Leishmania* : le trans-épissage et la polyadénylation au cours de la maturation des ARNm.

La transcription de la plupart des gènes de l'ADN nucléaire des Trypanosomatidés est

polycistronique (Figure 12), mais les ARNm matures sont monocistroniques (Pays *et al.*, 1993; Vanhamme et Pays, 1995; Teixeira, 1998). La maturation du pré-ARNm polycistronique nécessite la fragmentation et l'ajout d'une séquence mini-exon de 39 nucléotides en 5' (trans-épissage, revue par Agabian, 1990) et d'une séquence poly(A) en 3'. Chez *Leishmania*, le site accepteur de trans-épissage est constitué d'une séquence polypyrimidique en amont et du dinucléotide AG au site d'épissage (Huang et Van der Ploeg, 1991; LeBowitz *et al.*, 1993; Matthews *et al.*, 1994). Des études récentes suggèrent que le trans-épissage et la polyadénylation soient couplés : la sélection du site de polyadénylation d'un gène est gouvernée par la localisation du site accepteur de trans-épissage du gène suivant (LeBowitz, 1993; Matthews *et al.*, 1994; Schurch, 1994). De ce fait la régulation des mécanismes de trans-épissage et de polyadénylation serait importante pour la régulation des gènes au niveau post-transcriptionnel (LeBowitz, 1993; Matthews *et al.*, 1994).

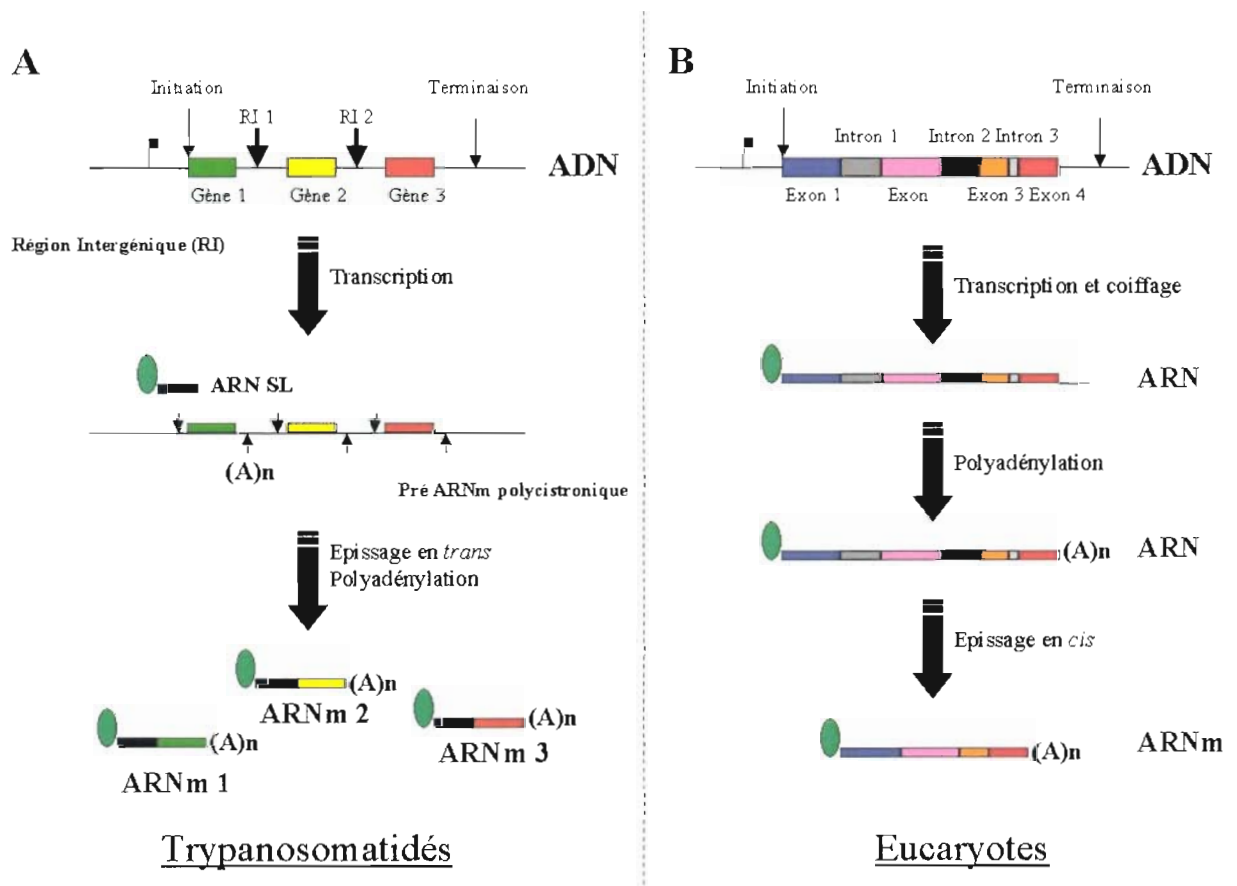


Figure 12 : Biosynthèse des ARNm. A : chez les Trypanosomatidés. B : chez les eucaryotes supérieurs. ARN SL : ARN splice leader contenant la séquence mini-exon, ■ : promoteur.

3 – Les antigènes de leishmanies.

Les travaux menés sur les antigènes de leishmanies ont pour but de définir des facteurs de virulence parasites ou de déterminer le potentiel immunoprotecteur de certaines molécules. L'essentiel des résultats a été obtenu avec la forme promastigote, cultivable *in vitro* alors que la forme amastigote nécessitait un isolement délicat à partir de lésions d'animaux parasités ou de macrophages infectés *in vitro*. Au cours des années 1980, 3 antigènes majeurs de surface ont été caractérisés : le lipophosphoglycane LPG (Pimenta *et al.*, 1987), la metalloprotéase de surface gp63 ou leishmanolysine (Kweider *et al.*, 1987), et les Promastigote Surface Antigens PSA (Champsi et MacMahon-Pratt, 1988). L'avènement de l'outil moléculaire dans les années 1990 a conduit à la découverte d'une série d'antigènes très conservés au cours de l'évolution, les panantigènes (Requena *et al.*, 2000). D'autres antigènes ont été isolés grâce à leur activité enzymatique, comme la phosphatase acide ou les protéases.

3.1 – Les antigènes constitutifs.

3.1.1 – Les antigènes membranaires.

3.1.1.1 – Le lipophosphoglycane (LPG).

Le LPG est la molécule majeure de surface des formes promastigotes de *Leishmania*. Contrairement à la forme promastigote, la forme amastigote n'exprime pas le LPG (*L. donovani*, *L. mexicana*) ou que très faiblement (*L. major*). La structure du LPG présente des variations au niveau des chaînes oligosaccharidiques qui induit une certaine spécificité d'espèce et qui joue un rôle crucial au cours de la métacyclogénèse des promastigotes (voir § III, 1.1). Plus récemment, son rôle en tant que facteur de virulence pour la forme promastigote a été confirmé (Spath, 2000).

3.1.1.2 – La leishmanolysine gp63.

La gp63, glycoprotéine de 60 à 65 kDa, est la protéase majeure de surface des promastigotes ("Promastigote Surface Protease", PSP) (Etges *et al.*, 1986) qui a été identifiée chez 15 espèces de leishmanies (Etges & Bouvier, 1991). C'est une metalloprotéase à zinc (Bouvier *et al.*, 1989) qui présente de nombreuses caractéristiques communes avec les metalloprotéases de la matrice extracellulaire (MacMaster *et al.*, 1994). L'ancrage de cette protéase à la membrane des promastigotes est assuré par un groupement

glycosylphosphatidylinositol (GPI) et son pH d'activité optimal est compris entre 7 et 10 (Bouvier *et al.*, 1995). Bien qu'exprimée par les formes amastigotes de différentes espèces de leishmanies, la présence d'une gp63 à la surface des amastigotes reste à démontrer. Ainsi, chez *L. mexicana*, la gp63 serait peu présente à la surface des amastigotes et son ancrage à la membrane ne serait pas assuré par un GPI (Medina-Acosta *et al.*, 1989) mais par une extrémité carboxy-terminale hydrophobe transmembranaire (Medina-Acosta *et al.*, 1993). Chez la forme amastigote, la gp63 aurait de plus des propriétés hydrophiles et une localisation lysosomale, où son activité à pH acide serait optimale (Ilg *et al.*, 1993). Certains auteurs l'ont aussi localisée dans la poche flagellaire des amastigotes (Bahr *et al.*, 1993). Il semble donc qu'un polymorphisme tant génétique que lié à des modifications post-traductionnelles, telles que des degrés variables de N-glycosylation, régit la présence des différentes isoformes de la gp63, leur conférant un statut de facteur de virulence au niveau des deux stades parasitaires (voir § III, 1).

3.1.1.3 – Les Promastigote Surface Antigens (PSA).

Les PSA sont des antigènes majeurs de surface des formes promastigotes de *Leishmania*. Ces PSA sont présentes chez toutes les espèces de leishmanies sauf celle du complexe *L. braziliensis*. C'est une famille multigénique de glycoprotéines, ancrées à la surface par un glycosyl-phosphatidylinositol, qui semble exprimée surtout par les formes promastigotes mais aussi par les formes amastigotes (Handman *et al.*, 1995). Cette famille de PSA est caractérisée par des domaines répétés riches en leucine (LRR Leucine-Rich Repeat), localisés dans la partie centrale des protéines, et constitués d'un nombre variable de répétition de 24-25 acides-aminés (de 3 à 15 motifs selon le type de PSA et l'espèce de leishmanie considérées). Ces LRR ont un motif structural particulier utilisé dans les processus de reconnaissance moléculaire protéine-protéine lors de transductions de signaux (Hashimoto *et al.*, 1988 ; Walker, 1993), d'adhésion (Hocking, 1998), de développement cellulaire (Hashimoto *et al.*, 1988; Rothberg *et al.*, 1990; Morisato et Anderson, 1994) ou d'interaction protéine-acides nucléiques (Ceulemans, 1999 ; Pan *et al.*, 2000). Une hypothèse est que cette famille de PSA est impliquée dans les interactions cellulaires lors de l'infection, comme cela a déjà été démontré pour d'autres protéines contenant des LRR (Gaillard *et al.*, 1991; Marino *et al.*, 2000). Les PSA possèdent également un domaine riche en cystéines très probablement impliqué dans leur conformation mais pouvant aussi servir de site de liaison à un métal. Les fonctions précises de cette famille protéine restent à découvrir, notamment pour les formes

solubles retrouvées dans les milieux de culture des formes promastigotes de *L. major* (Symons *et al.*, 1994) et de *L. infantum* (Jimenez-Ruiz *et al.*, 1998).

3.1.2 – Les antigènes somatiques.

Les antigènes somatiques représentent l'ensemble des antigènes non-membranaires du parasite : cytoplasmiques, nucléaires ou appartenant à des organites comme le kinétoplaste ou les mégasomes.

3.1.2.1 – Les panantigènes.

De nombreux antigènes somatiques appartiennent à une famille d'antigène dénommée récemment panantigènes. En effet, ces antigènes appartiennent à des familles de molécules très conservées au cours de l'évolution chez différents organismes, et qui présentent la particularité d'être des immunogènes majeurs (Tableau 3). La plupart de ces antigènes ont été identifiés après criblage d'une banque d'expression d'ADN complémentaire à l'aide de sérums de patients ou de chiens atteints de leishmaniose. Pour les protéines antioxydantes thiol-spécifiques ou TSA (Webb *et al.*, 1996), le criblage d'une banque d'ADNc d'amastigote a été réalisé à l'aide de sérums de souris immunisées avec des milieux de culture filtrés de promastigotes de *L. major*. Cet antigène, en plus d'être un panantigène, est un antigène d'excrétion-sécrétion.

Antigène			
Heat Shock Protein			
HSP70	73% avec HSP humaine	Riche en épitopes B	MacFarlane <i>et al.</i> , 1990 ; De Andrade <i>et al.</i> , 1992 ; Skeiky <i>et al.</i> , 1995 ; Quijada <i>et al.</i> , 1996
HSP83	64% avec HSP90 humaine		De Andrade <i>et al.</i> , 1992 ; Skeiky <i>et al.</i> , 1995 ; Angel <i>et al.</i> , 1996 ; Wiesgigl et Clos, 2001
HSP60	48% avec HSP60 humaine		Rey-Ladino <i>et al.</i> , 1997
LmSTII	38% avec STII (protéine de stress chez la levure)		Webb <i>et al.</i> , 1998
Protéines ribosomales			
LiP2a	45% avec la protéine ribosomale acide P2 humaine		Soto <i>et al.</i> , 1993
LiP2b	45% avec la protéine ribosomale acide P2 humaine		Soto <i>et al.</i> , 1993
LiP0/LcP0	39% avec la protéine humaine P0		Skeiky <i>et al.</i> , 1993 ; Soto <i>et al.</i> , 1993
LeIF	50% avec le facteur d'initiation humain eIF4A		Skeiky <i>et al.</i> , 1995
LmS3arp	homologue des protéines ribosomales S3a		Zemzoumi <i>et al.</i> , 1999
Protéines nucléosomales			
LiH2A	51% avec l'histone H2A humaine		Soto <i>et al.</i> , 1992
LiH3	63% avec l'histone H3 humaine		Soto <i>et al.</i> , 1994
LiH2B	49% avec l'histone H2B humaine		Soto <i>et al.</i> , 1999
LiH4	56% avec l'histone H4 humaine		Soto <i>et al.</i> , 1999
Autres antigènes			
LACK	45% avec la protéine RACK I de rat		Burns <i>et al.</i> , 1993
TSA	54% avec les protéines eucaryotiques TSA		Webb <i>et al.</i> , 1996
L39 (LcKin)	40% avec le domaine moteur de la kinésine de <i>C. elegans</i>	Contient plusieurs répétition de 39 acides aminés	Mougneau <i>et al.</i> , 1995
LcPP2C	31% avec la phosphatase 2C du foie de rat		Webb <i>et al.</i> , 1996

Tableau 3 : Les panantigènes de leishmanies. RACK I : récepteur de la protéine kinase C activée, TSA : antioxydant spécifique des thiols (d'après Requena *et al.*, 2000).

3.1.2.2 – Les protéases à cystéines.

Les protéases à cystéines, très étudiées chez *Leishmania*, s'expriment principalement chez la forme amastigote et semblent restreintes aux espèces responsables de leishmanioses cutanées. Néanmoins, des gènes codant ces enzymes ont été décrits récemment chez les espèces de leishmanies responsables de leishmaniose viscérale (Christensen *et al.*, 2000). Ces protéases sont localisées à l'intérieur d'un organe particulier, le mégasome, apparenté aux lysosomes (Robertson et Coombs, 1991). Les protéases à cystéines sont capables de moduler les mécanismes de défense de l'hôte, en jouant sur la production des cytokines de façon à favoriser la prolifération des parasites. D'autre part, à l'intérieur des macrophages, les protéases à cystéines pourraient être responsables de la dégradation des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité, internalisées par les leishmanies, limitant ainsi la présentation des antigènes parasitaires au système immunitaire (De Souza-Leao *et al.*, 1995). Chez les formes amastigotes de *L. mexicana*, les activités protéases à cystéines sont exprimées, à pH acide, en un complexe d'enzymes solubles de masses moléculaires allant de 16 à 36 kDa. Ces activités représentaient 90 % de l'activité protéasique totale du stade amastigote. Des études moléculaires permettent actuellement de distinguer l'existence de trois classes de gènes correspondant à trois types d'activités protéases à cystéine, apparentées à la famille des cathepsines B et L des mammifères (Robertson et Coombs, 1990, 1993 ; Coombs et Mottram, 1997).

Les enzymes de type I ont fait l'objet de nombreuses études en raison de leur fortes activités et d'une spécificité de stade parasitaire marquée. En effet, elles sont exprimées spécifiquement par le stade amastigote de l'hôte mammifère (Souza *et al.*, 1992; Traub-Cseko *et al.*, 1993). Ces enzymes sont caractérisées par une longue extension carboxy-terminale riche en résidus proline, serine et thréonine (Traub-Cseko *et al.*, 1993) qui est en grande partie coupée durant un processus post-transcriptionnel chez *L. pifanoi* (Dubois *et al.*, 1994). Cette portion carboxy-terminale serait responsable du routage des enzymes vers le mégasome et de l'inhibition de leur activité (Dubois *et al.*, 1994). Les gènes de type I chez *L. mexicana* ont 19 copies arrangées en tandem (Mottram *et al.*, 1996). Déjà en 1989, Alfieri et ses collaborateurs montraient qu'il existait une bonne corrélation entre l'inhibition des protéases à cystéines par les esters d'acides aminés, notamment l'ester méthylé de la L-leucine, et l'activité leishmanicide chez des macrophages infectés par *L. amazonensis* (Alfieri *et al.*, 1989). Plus récemment, des expériences de délétion du gène de type I chez *L. mexicana* ont donné des résultats controversés. En effet, l'infectivité *in vitro* vis-à-vis de macrophages du mutant nul

correspondant était significativement réduite. Mais ce mutant était capable d'infecter des souris de la même façon que la souche sauvage (Mottram *et al.*, 1996).

Les protéases à cystéines de types II et III ont été mises en évidence uniquement chez les leishmanies, alors que celles de type I sont présentes chez d'autres trypanosomatidés. La transcription de leur gène respectif semble régulée au cours du cycle de développement parasitaire de *L. mexicana* (Robertson et Coombs, 1990 ; Mottram *et al.*, 1992 ; Bart *et al.*, 1995). Les enzymes de type III sont apparentées aux cathepsines B de mammifères, mais leur rôle reste inconnu.

3.2 – Les antigènes excrétés-sécrétés (AES).

En 1965, Greenblatt et Glaser furent les premiers à s'intéresser à la sécrétion par les promastigotes de *Leishmania* d'un matériel de haut poids moléculaire dans le milieu de culture, probablement suite à l'activité métabolique du parasite. Durant les années 1970, des travaux ont montré que ces molécules partageaient des déterminants antigéniques avec les parasites dont elles étaient dérivées et qu'elles précipitaient en présence d'un sérum de lapin homologue (Schnur *et al.*, 1972 ; Slutzky et Greenblatt, 1977, 1979 ; Slutzky *et al.*, 1979 ; El-On *et al.*, 1979). La comparaison de ces composés, appelés « facteurs excrétés » (Excreted-factors ou EF) ou « substance excrétée » (Excreted substance ou ES), chez plusieurs espèces de *Leishmania* révéla la présence d'épitopes spécifiques utilisables pour sérotyper les leishmanies (Schnur *et al.*, 1972; Schnur et Zuckerman, 1975, 1977). Des études ultérieures ont montré que le facteur excrété était constitué majoritairement par des phosphoglycanes et qu'ils partageaient des épitopes communs avec des composés de la surface des promastigotes (Slutzky et Greenblatt, 1977 ; El-On *et al.*, 1979 ; Kaneshiro *et al.*, 1982 ; Handman *et al.*, 1984 ; Schnur *et al.*, 1990). Durant les années 1980, plusieurs composés immunogènes ont été observés parmi les facteurs excrétés dans les milieux de culture du stade promastigote de diverses espèces de *Leishmania* : des glycolipides, des carbohydrates, des glycoprotéines et une phosphatase acide (Decker-Jackson et Honigberg, 1978 ; Kaneshiro *et al.*, 1982 ; Bates et Dwyer, 1987 ; Jaffe *et al.*, 1990). Tous ces antigènes semblent jouer un rôle déterminant pour le promastigote, dans l'infection du phlébotome. Chez la forme amastigote, ces molécules excrétées-sécrétées semblent participer à l'adaptation du parasite chez son hôte, en participant probablement à la modulation de la réponse immune de celui-ci. Ce qui est également intéressant, c'est que les antigènes d'excrétion-sécrétion des deux stades sont de puissants immunogènes aussi bien chez le chien que chez l'homme (Cibrelus *et al.*, 1999). L'ensemble

des antigènes d'excrétion-sécrétion décrits dans la littérature est résumé dans le tableau 4.

AES	Présent chez la forme promastigote	Présent chez la forme amastigote
Phosphoglycanes		
PG	Oui	Non
pPPG	Oui	Non
aPPG	PPP2 pourrait provenir du même gène <i>ppg2</i>	Oui (gène <i>ppg2</i>)
Enzymes		
phosphatase acide *		
chitinase	Oui, sauf <i>L. major</i>	Uniquement chez <i>L. donovani</i>
sérine oligopeptidase	Oui	Non
ecto-protéine kinase	Oui	Non
CK1		
CK2	Oui	Non
N-acétylglucosaminidase	Oui	Non
sucrase	Oui	Non
cellulases (endoglucanase et cellobiohydrolase)	Oui	Non
Autres		
facteur de croissance		
leishporine	Oui	Non
	Oui chez <i>L. amazonensis</i>	Oui chez <i>L. amazonensis</i>

Tableau 4 : Les antigènes d'excrétion-sécrétion des leishmanies. PG : protéoglycane (forme soluble du LPG, aPPG : protéophosphoglycane de la forme amastigote, pPPG : protéophosphoglycane de la forme promastigote, pPPG2 : protéophosphoglycane 2 de la forme promastigote, * : membre des phosphoglycanes.

3.2.1 – Les AES des formes promastigotes.

Au cours du développement des promastigotes de *Leishmania* dans l'intestin du phlébotome, la sécrétion d'au moins huit enzymes a été observée: chitinase, N-acétylglucosamidase, deux ecto-protéines kinases, sucrase, phosphatase acide, endoglucanase et cellobiohydrolase. Les deux premières enzymes sont impliquées dans la lyse de la couche de chitine présente sur la membrane péritrophique qui entoure le bol alimentaire sanguin; cette lyse permet la migration des parasites vers les parties buccales du phlébotome. Elles semblent aussi endommager la cuticule le long de la valve cardiaque, facilitant ainsi la régurgitation des parasites au cours du repas de sang (Schlein *et al.*, 1991, 1992). Récemment, Sacerdoti-Sierra et Jaffe (1997) ont mis en évidence deux ecto-protéines kinases dont une des activités est semblable à celle de la caséine kinase. La sucrase et la phosphatase acide interviendraient dans les phénomènes de nutrition et de développement du parasite (Bates *et al.*, 1988; Blum et Opperdoes, 1994). Deux autres activités cellulase de type endoglucanase et cellobiohydrolase ont été identifiées dans les milieux de culture de promastigotes par Jacobson et Schlein en 1997. Ces activités cellulases seraient impliquées dans la nutrition du parasite. La phosphatase acide est un membre de la famille des phosphoglycanes (Lovelace et Gottlieb, 1986). Tous les promastigotes de leishmanies sécrètent cet antigène dans leur milieu de culture (Shakarian et Dwyer, 2000a, 2000b). La phosphatase acide semble être exprimée sous forme polymérique chez les espèces de leishmanies du Nouveau Monde (Antoine *et al.*, 1987) tandis qu'elle semble présente sous une forme monomérique ou oligomérique chez les espèces de l'Ancien Monde (Ilg *et al.*, 1991). Chez *L. mexicana* deux gènes ont été identifiés: sAP1 et sAP2 (Wiese, 1995), mais la fonction de cette molécule reste indéterminée ; des expériences de *knock-out* de ces gènes indiquent que cette enzyme n'est pas nécessaire à la croissance des promastigotes (Wiese *et al.*, 1995), ni à leur infectivité *in vitro* (Wiese, 1998).

Des études structurales réalisées sur les phlébotomes infectés par diverses espèces de *Leishmania* ont montré la présence d'une matrice filamenteuse riche en carbohydrates, dans les régions cardiaques et abdominales. Cette matrice, gélatineuse, qui bloque la valve cardiaque et stomodéale de l'insecte, contient de nombreux promastigotes procycliques immobilisés, alors que les promastigotes métacycliques ne sont pas affectés par ce « filet » (Killick-Kendrick *et al.*, 1988 ; Walters *et al.*, 1987, 1989a, 1989b). Il semble que les divers carbohydrates sécrétés par les promastigotes, appartenant à la famille des phosphoglycanes (Ilg *et al.*, 1999), soient à l'origine de cette matrice et donc qu'ils participent à la transmission des formes infectieuses lors d'un second repas de sang (Beach *et al.*, 1985; Jefferies *et al.*,

1986; Warburg et Schlein, 1986 ; Killick-Kendrick *et al.*, 1988). Le phosphoglycane ou PG est considéré comme la forme soluble du LPG (Greis *et al.*, 1992 ; Handman *et al.*, 1984 ; Ilg *et al.*, 1994), retrouvé en tant que facteur d'excrétion-sécrétion dans le surnageant des cultures de promastigotes. Le PG possède une structure commune avec le LPG (Handman *et al.*, 1984), avec des unités disaccharidiques répétées et une structure terminale oligosaccharidique, mais ne possède pas la structure d'ancrage lyso-1-alkylphosphatidylinositol. Il proviendrait soit du LPG clivé par l'action d'une phosphodiesterase, soit d'une synthèse de novo et d'une sécrétion *via* la poche flagellaire. Sa fonction n'est pas déterminée. Le protéophosphoglycane des promastigotes ou pPPG (Ilg *et al.*, 1999) est sécrété par les formes promastigotes de nombreuses espèces de leishmanies sous forme filamenteuse de 3 à 6 nm de diamètre, souvent accumulée au centre d'un agrégat de parasites emprisonnés dans un réseau gélatineux. Cette molécule, par sa structure, possède des épitopes communs avec le LPG (Stierhof *et al.*, 1994). Le pPPG possède une structure particulière, composée principalement de carbohydrates (76%) et de phosphates (20%) et seulement de 4% d'acides aminés, principalement sérine (50 %), proline et alanine. Les résidus sérines sont phosphorylés par des structures composées de chaînes de phosphoglycane LPG-like liées par des phosphodiester. Ce pPPG pourrait être responsable en partie du bouchon renfermant les promastigotes procycliques (Stierhof *et al.*, 1999).

Noronha *et al.* (1994, 2000) ont montré l'expression, chez *L. amazonensis*, d'une « leishporine » ou « pore-forming protein » (Horta, 1997). Sachant que cette famille de protéine, homologue du composant C9 du complément, est sécrétée par les formes amastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Andrews *et al.*, 1990), il est très probable que cette leishporine serait un AES chez *L. amazonensis*. Cette protéine possède une activité cytolytique, mais pas d'activité protéasique ni d'activité phospholipase. Son mécanisme d'action n'est pas semblable à celui d'un détergent (Noronha *et al.*, 1994). En 1988, Lemesre *et al.* ont montré l'existence d'un facteur de croissance, agissant de manière dose-dépendante, produit par les leishmanies cultivées *in vitro*.

D'un point de vue plus général, les antigènes excrétés-sécrétés par les formes promastigotes de *Leishmania* chez l'hôte vertébré, faciliteraient l'infection des macrophages par les parasites, perturberaient les fonctions microbicides des macrophages et diminueraient la différenciation des monocytes et des lymphocytes (El-On *et al.*, 1980; Londner *et al.*, 1983).

3.2.2 – Les AES des formes amastigotes.

La sécrétion d'antigènes par le stade amastigote est très peu documentée. Ces travaux portent principalement sur l'expression des phosphoglycanes.

Une phosphatase acide sécrétée dans la lumière de la vacuole parasitophore par les amastigotes de *L. donovani* a été décrite (Wolfram *et al.*, 1996), mais elle n'est pas exprimée chez les formes amastigotes de *L. mexicana* et *L. amazonensis*.

Les études biochimiques réalisées chez les amastigotes de *L. mexicana* montrent que le LPG, le PG, ou les pPPG sont absents (Ilg *et al.*, 1999). Cependant, il semble exister un protéophosphoglycane spécifique de la forme amastigote, le aPPG (Ilg *et al.*, 1998). Sa composition est différente de celle du pPPG précédemment décrit : 70% de glycane mais 14% de phosphates et 16% d'acides aminés, l'acide aminé majeur étant toujours la sérine mais avec une quantité équivalente des autres acides aminés. Un gène différent de celui du pPPG a pu être cloné: *ppg2* (Gopfert *et al.*, 1999), mais les auteurs suggèrent que ce gène *ppg2* code aussi pour un PPG chez la forme promastigote appelé pPPG2 qui diffère de celui exprimé chez l'amastigote, aPPG, principalement par les types des phosphoglycosylations de la protéine PPG2 qui sont plus courtes chez la forme amastigote que chez la forme promastigote (Klein *et al.*, 1999). Cette molécule est sécrétée en quantité via la poche flagellaire de l'amastigote dans le phagolysosome du macrophage où il s'accumule en des quantités estimées en mg/ml, provoquant probablement le développement massif de cette vacuole (Peters *et al.*, 1997). Cet aPPG, ainsi libéré dans le milieu extracellulaire, semble activer le complément par la voie des lectines, et pourrait aider les amastigotes à éviter la lyse par le complément, en stimulant celui-ci localement au niveau du aPPG libéré dans le milieu extracellulaire.

3.3 – Les antigènes utilisés pour diagnostiquer les leishmanioses.

Le diagnostic sérologique est toujours actuellement la technique de référence en matière de dépistage des leishmanioses. En effet, les forts taux d'anticorps spécifiques de *Leishmania* dans le sérum des malades, la culture de parasites in vitro et le développement continu des techniques immunologiques sont autant d'arguments favorables au développement du diagnostic sérologique. Une batterie de tests immunologiques (immunofluorescence indirecte, ELISA, électrosynérèse, immunoréplique, immunoprécipitation, test d'agglutination directe, ...) associés à une grande variété d'antigènes parasites est utilisée en routine pour détecter les anticorps dans les sérums de

malades (Tableau 5). La spécificité et la sensibilité de chaque méthode dépendent du type, de la source et de la pureté de l'antigène.

Tableau 5 : Exemples d'antigènes utilisés dans le diagnostic sérologique des leishmanioses (pp. xx et xx). LC : leishmaniose cutanée. LCM : leishmaniose cutanéomuqueuse. LCPK : leishmaniose cutanée post *kala azar*. LV : leishmaniose viscérale. LVC : leishmaniose viscérale canine. HSP : heat shock protein.

Antigènes	Méthode	Espèce	Spécificité	Modèle	Références
Antigènes de promastigotes	ELISA	<i>L. b. panamensis</i> <i>L. infantum</i>	Leishmanioses du Nouveau Monde Protéine ribosomale P0, histones H2a et H3	Homme Chien	Antony <i>et al.</i> , 1980. Soto <i>et al.</i> , 1995, 1996.
Antigènes solubles de promastigotes	Western Blot	<i>L. chagasi</i>	Antigènes de 119 et 123 kDa	Homme	Dos Santos <i>et al.</i> , 1987.
	Dot ELISA	<i>L. infantum</i>	LVC	Chien	Vercammen <i>et al.</i> , 1998.
Suspension de promastigotes	ELISA	<i>L. donovani</i>	LV	Homme	Mukerji <i>et al.</i> , 1991.
Polypeptides du stade promastigote	Western Blot	<i>L. donovani</i>	Région spécifique de 49 et 14 kDa	Homme	Cardenosa <i>et al.</i> , 1995.
		<i>L. infantum</i>	Antigènes de 18, 21, 23, 31 kDa spécifiques d'une LV aiguë	Homme	Marty <i>et al.</i> , 1995.
			Antigène de 94 kDa spécifique d'une LV	Homme	Rolland <i>et al.</i> , 1995
			LVC active : antigène de 26 kDa	Chien	Fernandez-Perez <i>et al.</i> , 1999.
			LVC : antigènes < 46 kDa	Chien	Aisa <i>et al.</i> , 1998.
Lysat de promastigotes	ELISA, IFI	<i>L. major</i>	LC	Homme	Mosleh <i>et al.</i> , 1995.
Extrait antigénique de promastigotes	Western Blot	<i>L. infantum</i>	Début de LVC : antigènes de 29, 50-57 kDa, LVC active : antigènes de 26 et 34-35,5 kDa	Chien	Carrera <i>et al.</i> , 1996.
Fraction antigénique semi-purifiée	Western Blot	<i>L. infantum</i>	Antigènes de 18, 28, 30, 33 et 72 kDa	Chien	Da Costa <i>et al.</i> , 1996.
Antigènes de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. lainsoni</i>	DAT (test d'agglutination directe)	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. lainsoni</i>	LC	Singe	Garcez <i>et al.</i> , 1997.
Antigènes totaux	Western Blot	<i>L. infantum</i>	Premières phases de la LVC : HSP 70	Chien	Nito <i>et al.</i> , 1999.
Protéine purifiée gp 70-2 et dp 72	Dot Blot	<i>L. donovani</i>	LV	Homme	Jaffe et Zalis, 1988.

gp 63 native	ELISA	<i>L. donovani</i>	Distinction LV active/LV guérie	Homme	Okong'o-Odera <i>et al.</i> , 1993a.
Protéine purifiée de 66 kDa	ELISA	<i>L. donovani</i>	LV indienne	Homme	Vinayak <i>et al.</i> , 1994.
Antigènes de 70 et 116 kDa	ELISA	<i>L. donovani</i>	LV	Homme	Okong'o-Odera <i>et al.</i> , 1993b.
Antigène membranaire P32	Western Blot/ELISA	<i>L. infantum</i>	LV méditerranéenne	Homme	Tebourski <i>et al.</i> , 1994.
Antigènes solubles de 27 et 30 kDa	Western Blot	<i>L. braziliensis</i>	LC	Homme	Brito <i>et al.</i> , 2000.
Antigène de 200 kDa	ELISA	<i>L. donovani</i>	LV, LCPK	Homme	Kaul <i>et al.</i> , 2000.
Nucléoside hydrolase		<i>L. donovani</i>	LV	Homme	Santana <i>et al.</i> , 2002.
Kinésine recombinante de 39 kDa	ELISA	<i>L. donovani</i>	LV et LCPK, LV active	Homme	Singh <i>et al.</i> , 1995 ; Badaro <i>et al.</i> , 1996.
Protéine recombinante 133P-C (HSP 70)	ELISA	<i>L. braziliensis</i>	LCM	Homme	Amorim <i>et al.</i> , 1996.
Peptides synthétiques couplés à l'albumine humaine	ELISA	<i>L. donovani</i>	LV	Homme	Fargeas <i>et al.</i> , 1996.
Peptide de 28 aa du gène B	ELISA	<i>L. major</i>	LC (Jordanie)	Homme	Jensen <i>et al.</i> , 1996
Protéine ribosomale P2 recombinante	ELISA	<i>L. infantum</i>	LV	Homme	Soto <i>et al.</i> , 1996.
HSP 83 recombinante	Fast ELISA	<i>L. infantum</i>	LVC	Chien	Angel <i>et al.</i> , 1996.
gp63 recombinante	ELISA	<i>L. infantum</i>	LVC	Chien	Morales <i>et al.</i> , 1997.
Protéine recombinante du gène B et peptide synthétique	ELISA	<i>L. donovani</i>	LV, LCPK	Homme	Jensen <i>et al.</i> , 1999.
Protéine de fusion des histones H2b et H4	Western Blot	<i>L. infantum</i>	LVC	Chien	Soto <i>et al.</i> , 1999.
K39	ELISA	<i>L. infantum</i>	LVC	Chien	Kumar <i>et al.</i> , 2001 ; Scalone <i>et al.</i> , 2002.
Protéine recombinante A2	ELISA	<i>L. donovani</i>	LV, LVC	Homme Chien	Carvalho <i>et al.</i> , 2002.

III – Interactions hôte-parasite.

1 – L'infection par *Leishmania*.

Les leishmanies présentent, au cours de leur cycle biologique, des capacités adaptatives étonnantes qui leur permettent de coloniser à la fois le milieu extracellulaire du tractus digestif de l'insecte vecteur et un habitat intracellulaire chez l'hôte mammifère. Les parasites sont alors soumis à des variations très importantes de température, de pH, de composition en gaz, en ions, et en métabolites. En effet, après un repas sanguin infectieux, les formes amastigotes, libérées des macrophages, vont se trouver dans l'intestin de la femelle phlébotome. Seule une partie des amastigotes va survivre aux enzymes digestives et se différencier en formes promastigotes (Warburg et Schlein, 1986). Les promastigotes vont alors subir des transformations morphologiques, structurales et biochimiques, selon un processus appelé métacyclogénèse, qui conduisent à l'émergence de promastigotes métacycliques infectieux pour l'hôte vertébré.

Lorsque ces formes infectantes sont injectées, au moment de la piqûre, au niveau du tissu conjonctif du derme de l'hôte vertébré, elles vont devoir s'attacher aux macrophages, être phagocytées, se différencier en formes amastigotes et se multiplier à l'intérieur du phagolysosome. Le système immunitaire de l'hôte va alors s'activer et développer une réaction discrète en plusieurs phases. Tout d'abord, quelques minutes après l'agression, les macrophages et les neutrophiles vont être recrutés par des facteurs chimiotactiques humoraux libérés localement et se diriger vers le site de l'infection. Une réaction inflammatoire des cellules phagocytaires, s'accompagnant de la libération de radicaux libres de l'oxygène et de l'azote et d'enzymes hydrolytiques, va conduire à l'élimination de la plupart des promastigotes injectés. Si tous les parasites sont détruits, l'homéostasie est restaurée sans intervention de l'immunité spécifique.

La colonisation des macrophages par *Leishmania* est un phénomène adaptatif remarquable puisque le parasite doit tout d'abord identifier et pénétrer le bon type cellulaire et ensuite survivre et se développer à l'intérieur d'une cellule effectrice de l'immunité.

1.1 – La métacyclogénèse des promastigotes.

La forme promastigote de *Leishmania* prolifère et se différencie dans l'intestin des diptères pour préparer les formes infectantes à parasiter les cellules de l'hôte mammifère. De

nombreuses études *in vitro* ont montré que l'acquisition de l'infectivité des promastigotes dépendait de l'état de maturation du parasite au cours de la phase de croissance. En effet, les promastigotes de phase exponentielle de croissance, qui se divisent activement par scissiparité, sont significativement moins infectieux que les promastigotes de phase stationnaire qui ne se divisent plus ou très peu (Giannini, 1974 ; Doran et Herman, 1981 ; Sacks et Perkins, 1984, 1985 ; Sacks *et al.*, 1985 ; Howard *et al.*, 1987 ; Kweider *et al.*, 1987 ; Mallinson *et al.*, 1989 ; Mallinson et Coombs, 1989a, 1989b).

Vingt-quatre heures après l'ingestion du repas sanguin, le bol alimentaire se trouve dans l'intestin médian où il est entouré d'une membrane dite péritrophique, synthétisée par les cellules épithéliales du tube digestif, et composée d'un réseau de chitine et d'une matrice de glycoprotéines. Cette membrane péritrophique, qui sert de barrière entre le contenu luminal et les enzymes digestives, assure la compartimentation de l'activité digestive et évite aux microvillosités intestinales d'être endommagées. En outre, elle permettrait la survie initiale des promastigotes en modérant l'exposition des parasites aux activités protéolytiques du bol alimentaire avant leur différenciation en une forme résistante aux protéases (Pimenta *et al.*, 1997). C'est dans ce bol alimentaire que les amastigotes ingérés se différencient en promastigotes qui se multiplient activement, d'abord sous une forme trapue dite procyclique puis, sous une forme fuselée dite nectomonade (Figure 13). Après digestion du bol alimentaire, la membrane péritrophique se lyse et la division des parasites se poursuit soit dans l'intestin médian (sous-genre *Leishmania*), soit dans l'intestin médian abdominal et dans certaines portions de l'intestin postérieur (pylore/iléon; sous-genre *Vianna*). Certains parasites se transforment en promastigotes de forme ovale dite haptomonade, puis en paramastigotes. Le rôle de la colonisation de l'intestin postérieur du phlébotome par les formes haptomonades et paramastigotes du sous-genre *Vianna* demeure inconnu. Les autres promastigotes, libres ou attachés par leur flagelle aux microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin médian vont alors migrer vers la partie thoracique de l'intestin. C'est avant ou au cours de cette migration, que les leishmanies vont se transformer en promastigotes métacycliques très infectieux pour les hôtes mammifères. Les promastigotes métacycliques ne sont plus capables de se diviser et présentent un corps cellulaire de petite taille très fuselé, avec un très long flagelle (Killick-Kendrick, 1990). Ils sont très mobiles et vont s'accumuler dans les parties antérieures et buccales (proboscis) de l'insecte (Figure 13).

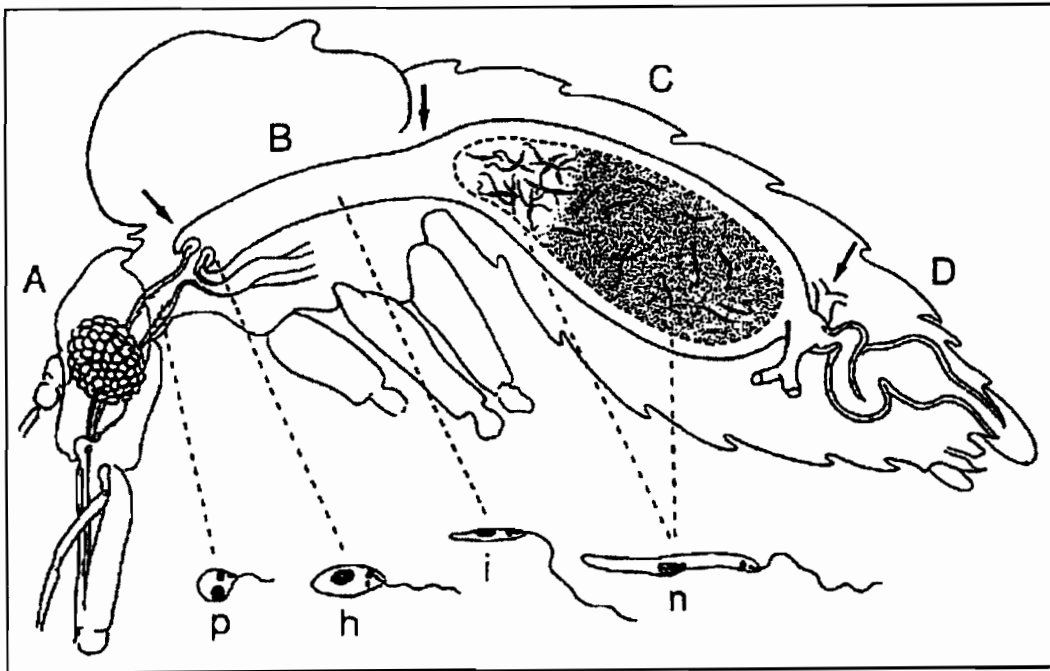


Figure 13 : Evolution des différents morphotypes des formes promastigotes de *Leishmania* au cours de la métacyclogénèse. Les flèches divisent le tractus digestif en intestin antérieur (A), intestin médian thoracique (B), intestin médian abdominal (C), et intestin postérieur (D). Le sang (zone grisée) dans l'intestin abdominal (C) est entouré par la membrane péritrophique figurée en pointillés. Les différents morphotypes du stade promastigote sont la forme nectomonade (n), la forme infective (i), la forme haptomonade (h), et la forme paramastigote (p) (d'après Schlein et al., 1992).

Le phénomène de métacyclogénèse s'accompagne de modifications des caractéristiques et des propriétés biochimiques de la surface des parasites ainsi que d'une régulation de l'expression de gènes. Grâce aux études réalisées sur des parasites cultivés *in vitro*, de nombreuses différences au niveau de la surface de la membrane des formes métacycliques infectieuses par rapport aux formes de division, ont été mises en évidence :

➤ **le lipophosphoglycane LPG.** Le LPG est une molécule tripartite composée d'un polymère de sous-unités oligosaccharidiques liées entre elles par des liaisons phosphodiester, d'un noyau hexasaccharidique ou heptasaccharidique, et d'un lipide qui sert d'ancrage membranaire (Figure 14). Durant la métacyclogénèse, le LPG acquiert de nouveaux hydrates de carbone et il y a doublement des unités disaccharidiques phosphorylées. Cela entraîne la formation d'une glycocalyx plus épaisse chez les formes métacycliques (17 nm) que chez les formes de phase exponentielle (7 nm) (Pimenta *et al.*, 1989). Cette caractéristique permet une meilleure résistance aux hydrolases du phlébotome et surtout une résistance à l'action du

complément. En effet, seuls les promastigotes métacycliques portant des chaînes longues de LPG (environ 30 sous-unités par molécules) sont capables de résister à la lyse par le complément, tandis que les promastigotes procycliques exprimant des chaînes de LPG plus courtes (15 sous-unités par molécules) seront lysées (McConville *et al.*, 1992; Sacks, 1989). D'autre part, les variations structurales du LPG seraient, au moins en partie, responsables des localisations successives occupées par les parasites dans l'intestin du phlébotome. Chez les promastigotes de *L. donovani*, la métacyclogénèse s'accompagne du repliement du LPG qui masque les résidus terminaux galactose et mannose impliqués dans la fixation des parasites en phase de croissance sur les microvillosités intestinales des phlébotomes (Sacks *et al.*, 1995). Les parasites peuvent alors se détacher de l'intestin et entamer leur migration vers le proboscis de l'insecte. Enfin, le LPG est impliqué dans la reconnaissance et dans l'attachement des promastigotes aux récepteurs de surface des macrophages (Blackwell, 1985 ; Wilson *et al.*, 1989).

➤ **les glycoprotéines de surface des promastigotes.** Deux glycoprotéines, la gp63 et la gp46 ancrée dans la membrane des promastigotes par un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Figure 14), ont été associées à la métacyclogénèse en tant que facteurs de virulence. La quantité des deux protéines, ainsi que celle des ARNm correspondant, augmente fortement lors du processus de différenciation (Kweider *et al.*, 1987; Russell et Alexander, 1988 ; Beetham *et al.*, 1997). Chez les promastigotes infectieux de *L. chagasi*, la quantité de gp63 est 2 fois supérieure à celle trouvée chez les promastigotes procycliques (Ramamoorthy *et al.*, 1992). La gp63 est impliquée dans la résistance à la lyse par le complément, dans le clivage de nombreux substrats tel le fragment C3b du complément, dans l'attachement des promastigotes à la surface des macrophages, et dans l'induction d'une réponse immune à médiation cellulaire et humorale (Russell et Wilhelm, 1986 ; Russell et Alexander, 1988 ; Bouvier *et al.*, 1989 ; Roberts *et al.*, 1993 ; Joshi *et al.*, 1998). D'autre part, l'expression différentielle des ARNm de la gp46 de *L. chagasi* a été récemment corrélée avec le processus de métacyclogénèse (Beetham *et al.*, 1997).

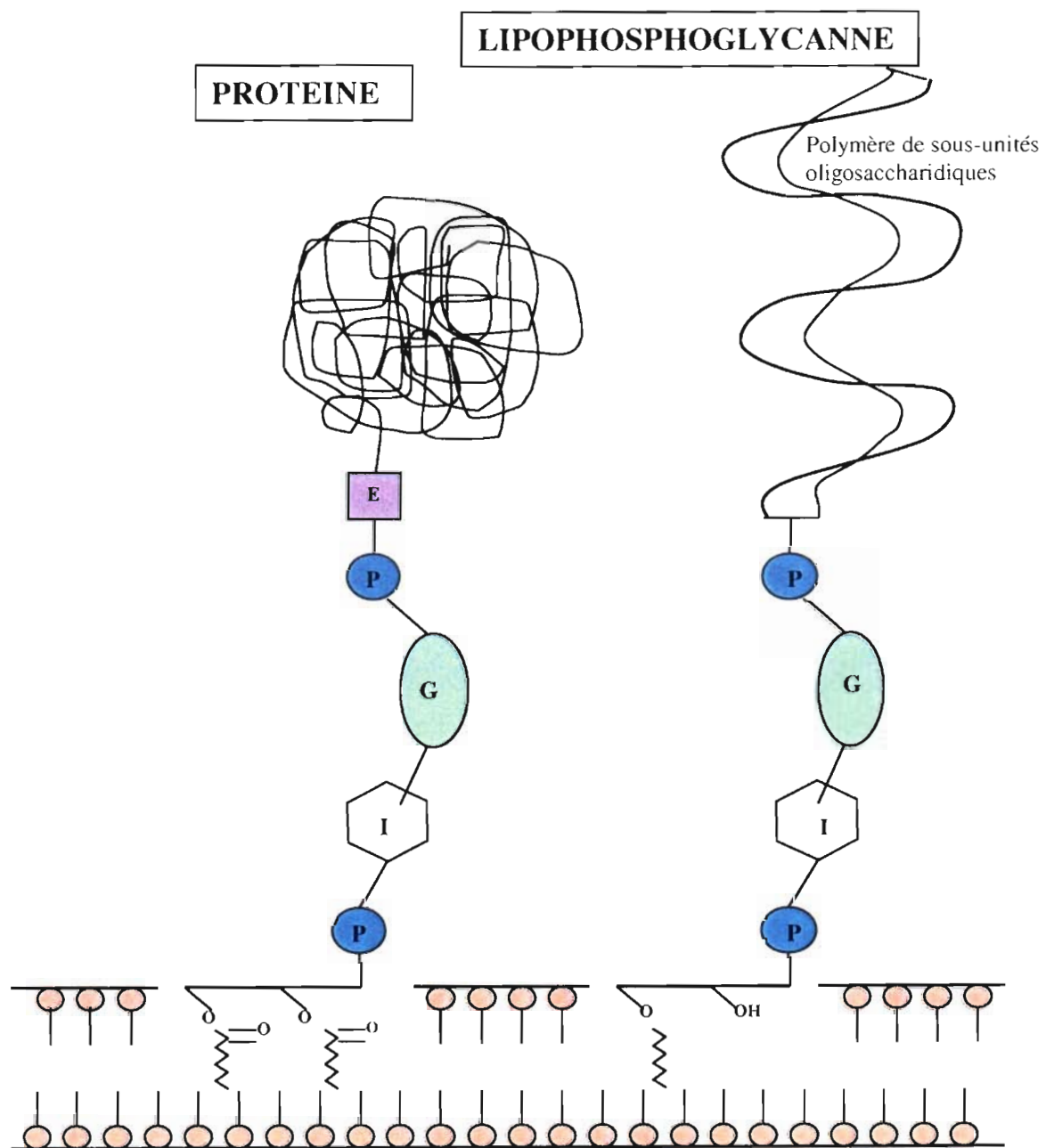


Figure 14 : Représentation schématique des protéines à ancrage de type glycosyl-phosphatidylinositol et du lipophosphoglycane. I : inositol ; G : noyau carbohydrate ; P : phosphate ; E : éthanolamine (d'après Turco, 1988).

➤ une régulation de l'expression des gènes. Du point de vue de la régulation de l'expression des gènes, comme pour les gènes "tissus spécifiques" des métazoaires, il a été démontré, que certains gènes de leishmanies modulaient leur expression en fonction du stade parasitaire. Les protéines de stress pourraient jouer un rôle dans la résistance au choc thermique et pourraient donc être exprimées de façon préférentielle lors de la métacyclogénèse. Trois gènes apparentés aux *HSP 70* ont été clonés chez *L. major*. De façon intéressante, un de ces gènes est uniquement détecté dans l'ARNm des formes promastigotes métacycliques (Searle *et al.*, 1989). En 1990, Coulson et Smith ont isolé quatre clones d'ADNc dont les gènes correspondants (A, B, C, D1 et D2) s'expriment préférentiellement chez les formes métacycliques et parfois uniquement chez ces dernières. La protéine codée par le gène B est une molécule hydrophile de 177 acides aminés (Smith *et al.*, 1994). Des anticorps spécifiques, dirigés contre cette protéine, reconnaissent une molécule de surface présente chez les promastigotes métacycliques et les amastigotes. Par contre, aucune réactivité n'a été observée sur les formes de multiplication non infectieuses (Flinn et Smith, 1992). Récemment, une seconde protéine codée par cette même famille de gènes a été caractérisée. Il s'agit de la protéine A/C de 7,6 kDa, qui présente de nombreuses homologues avec la protéine B, et qui comme elle, n'est exprimée qu'à la surface des promastigotes métacycliques infectieux (MacKean *et al.*, 1997). Des transcrits, appelés MAT-1 (Metacyclic promastigote Associated Transcripts) et correspondant à une protéine à domaine de fixation à l'ADN comparable à celui des facteurs de transcription, ont été isolés chez des promastigotes métacycliques de *L. major* (Brodin *et al.*, 1992). Une étude sur les transcrits du gène de la β -tubuline a montré que, lors de la métacyclogénèse, la régulation de la demi-vie des ARNm était un facteur déterminant dans le contrôle de l'expression des gènes (Coulson *et al.*, 1996). Enfin, Noll *et al.* (Noll *et al.*, 1997) ont observé une accumulation de l'ARNm et de l'histone H1 elle-même durant la métacyclogénèse. Cette histone H1 serait impliquée dans l'arrêt de la prolifération observé lors de la différenciation en promastigotes infectieux.

La régulation de l'expression des gènes s'accompagne de variations quantitatives et qualitatives de certaines enzymes et de certains antigènes des parasites. Des différences au niveau protéique ont été observées, par SDS-PAGE, chez *L. infantum* (Bandyopadhyay *et al.*, 1991). Deux protéines de 51 et 114 kDa sont trouvées exclusivement chez les promastigotes de phase stationnaire tandis que l'expression de deux protéines de 23 et 38 kDa est fortement réduite durant la différenciation en promastigotes métacycliques. Chez *L. mexicana*, les isoenzymes et certaines protéines trouvées chez les formes infectieuses sont similaires à celles trouvées chez le stade amastigote suggérant une préadaptation des promastigotes à la

colonisation des macrophages (Mallinson et Coombs, 1989a, 1989b ; Mallinson *et al.*, 1989). De même, l'augmentation de l'activité de protéines kinases ainsi qu'un changement significatif dans le schéma de phosphorylation de protéines de *L. major* semblent indiquer la mise en place d'un mécanisme adaptatif pour la survie du parasite chez l'hôte vertébré (Hermoso et Jaffe, 1993).

1.2 – La reconnaissance et l'attachement des formes promastigotes aux macrophages.

Les promastigotes métacycliques injectés chez l'hôte mammifère, et ayant échappé à la première barrière de l'immunité non-spécifique constituée par l'action lytique du complément, vont reconnaître et adhérer aux macrophages du derme ou aux cellules dendritiques par leur flagelle ou leur corps cellulaire (Figure 15). Puis les macrophages recrutés sur le site de l'infection vont être infectés.



Figure 15 : Promastigotes de *L. amazonensis* attachés à des macrophages par leur flagelle ou leur corps cellulaire. (photo de microscopie électronique d'après Pimenta et De Souza, 1986 ; grossissement $\times 5900$).

La reconnaissance spécifique des promastigotes avec la surface des macrophages est médiée par des récepteurs présents sur la membrane plasmique des macrophages, de différentes molécules parasitaires situées sur la face externe de la membrane plasmique et/ou excrétées-sécrétées (Tableau 6).

Stade parasitaire	Présence (+) ou absence (-) de sérum	Récepteurs présents dans la membrane plasmique des macrophages	Ligands présents dans/sur la membrane plasmique des parasites	Espèce de <i>Leishmania</i>
Promastigotes	-	Récepteur mannose/fucose Récepteur des AGE Famille des intégrines : - CR3 (CD11b/CD18, Mac-1) - intégrine p150,95 - récepteur de la fibronectine	LPG, gp63 ? composants du complément synthétisés par les macrophages, LPG, gp63 LPG Peptide SRYD de la gp63	<i>L. donovani</i> <i>L. major</i> <i>L. donovani</i> <i>L. major</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. major</i> <i>L. chagasi</i>
	+	CR1, CR3, p150,95 Récepteur de la fibronectine Récepteurs Fcγ MBP	Composants C3b et C3bi du complément Fibronectine IgG LPG	<i>L. donovani</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. major</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i>
Amastigotes	-	Récepteur du mannose/fucose Protéoglycanes à héparan sulfate	? molécules liant l'héparine	<i>L. major</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. major</i>
	+	CR3 Récepteurs Fcγ MBP	Composant C3 du complément IgG GIPL	<i>L. major</i> <i>L. major</i>

Tableau 6 : Récepteurs et ligands impliqués dans l'interaction macrophage/promastigote (Antoine *et al.*, 1999).

Les molécules de surface des promastigotes interagissant avec les récepteurs des macrophages ont d'abord été caractérisées en absence de sérum. Des expériences d'inhibition compétitive avec des glycoprotéines ont permis de démontrer que le LPG à la surface des promastigotes leur permettait de se lier à différents récepteurs de surface des macrophages : le récepteur mannose-fucose (Blackwell *et al.*, 1985 ; Wilson et Pearson, 1986, 1988), le récepteur des produits de fin de glycosylation (AGE : Advanced Glycosylation End products) (Mosser *et al.*, 1987), le récepteur 3 du complément CR3 (Blackwell *et al.*, 1985 ; Mosser et Edelson, 1985 ; Wilson et Pearson, 1986 ; Russell et Wright, 1988 ; Talamas-Rohana *et al.*, 1990), l'intégrine P150,95 (Mosser et Rosenthal, 1993). Par ailleurs, Rizvi *et al.* (1988) ont montré que la gp63 présentait une similitude de structure avec le domaine de liaison Arg-Gly-Asp (RGD) de la fibronectine. En fait, la gp63 possède une séquence Ser-Arg-Tyr-Asp (SRYD) qui mime immunologiquement et fonctionnellement la séquence RGD de la fibronectine (Soteriadou *et al.*, 1992). Les récepteurs CR3 et de la fibronectine (FnR) qui appartiennent à la famille des intégrines reconnaissent les peptides portant la séquence RGD, dont la gp63.

Dans les conditions physiologiques, c'est à dire en présence de facteurs sériques, les composants du système du complément semblent jouer un rôle majeur dans l'adhésion des promastigotes aux macrophages. Les promastigotes métacycliques sont insensibles à l'action lytique du complément, mais leur opsonisation augmente leur interaction avec les macrophages (Mosser et Edelson, 1984; Wozencraft et Blackwell, 1987). D'ailleurs, les promastigotes de *L. major* sont capables d'activer la voie du complément en l'absence d'anticorps spécifiques. Ils accumulent à leur surface le composant C3b, issu de la protéolyse du composant C3, par une liaison ester avec le LPG (Puentes *et al.*, 1988). Le composant C3bi a également été retrouvé à la surface des parasites (Mosser et Edelson, 1985). L'attachement des promastigotes s'effectue alors par l'intermédiaire des récepteurs CR3 et CR1 présents sur les macrophages. D'autres récepteurs membranaires des macrophages, comme la MBP (Mannan Binding Protein) peuvent lier le LPG, mais aussi les GIPLs (Glycosyl-Inositol-PhosphoLipids) des formes amastigotes (Green *et al.*, 1994). La MBP mime une molécule C1q et peut activer la voie classique du complément, entraînant le recrutement du composant C3 (Ohta *et al.*, 1990 ; Mauel *et al.*, 1996). Il est à noter que chez les amastigotes de *L. amazonensis*, une activité de liaison à l'héparine interagirait avec les protéoglycanes à héparane sulfate de la surface des macrophages (Love *et al.*, 1993). Enfin, d'autres facteurs sériques comme les immunoglobulines interviennent, via leurs récepteurs

spécifiques, dans l'attachement des promastigotes aux macrophages (Mosser et Rosenthal, 1993).

Dans les conditions physiologiques, l'endocytose des promastigotes se font en présence de facteurs sériques et donc préférentiellement par les récepteurs aux C3b et C3bi, peu enclins à activer la flambée oxydative des macrophages. Des études conduites sur *L. major*, indiquent que le CR1 est le principal médiateur de l'attachement des promastigotes infectieux (Da Silva *et al.*, 1989). Quant aux promastigotes non infectieux, ils utiliseraient plutôt le CR3 qui induit une flambée respiratoire plus importante conduisant vraisemblablement à la destruction des parasites intracellulaires (Da Silva *et al.*, 1989).

1.3 – La phagocytose des promastigotes et la formation de la vésicule parasitophore.

Les macrophages internalisent les promastigotes par un phénomène de phagocytose initié par la liaison des parasites aux récepteurs CR1, CR3, Fc et le récepteur mannose-fucose. A partir de ces récepteurs, des signaux, qui impliquent la phosphatidylinositol-3-kinase et la phospholipase C, vont être émis et permettre le recrutement sous-membranaire des molécules amorçant la polymérisation de l'actine (Love *et al.*, 1998). Des pseudopodes vont alors englober les parasites qui se retrouvent en position intracellulaire à l'intérieur d'une vacuole appelée phagosome. Ce phagosome est bordé, dans un premier temps, par une membrane ayant pour origine la membrane plasmique du macrophage.

Au cours de la migration des phagosomes néo-formés vers la région centrale de la cellule, ceux-ci commencent à subir des modifications aboutissant, après plusieurs heures, à la formation de vacuoles parasitophores (VP) (Figure 22). Elles sont de taille et de morphologie variables selon l'espèce de *Leishmania* qu'elles hébergent. On distingue deux morphotypes de VP: des vacuoles individuelles, de petite taille abritant un seul ou quelques parasites (*L. donovani*, *L. major*) et des vacuoles de très grande taille, communautaires, chacune pouvant héberger des dizaines de parasites (*L. amazonensis*). Dans le premier cas, les macrophages contiennent de nombreuses vacuoles alors que dans le second cas, les macrophages contiennent peu de VP, voir une seule. Chez les macrophages infectés par *L. mexicana* on trouve les deux morphotypes de VP. Peters *et al.* (Peters *et al.*, 1997) ont montré que la sécrétion de protéophosphoglycane (aPPG) par les amastigotes de *L. mexicana* contribuait à l'expansion et à l'élargissement des phagosomes abritant des parasites pour former de vastes vacuoles parasitophores. Dans les VP, les parasites ne sont pas libres mais attachés à la

membrane de ces organites par leur pôle postérieur, opposé à la poche flagellaire (Figure 16).

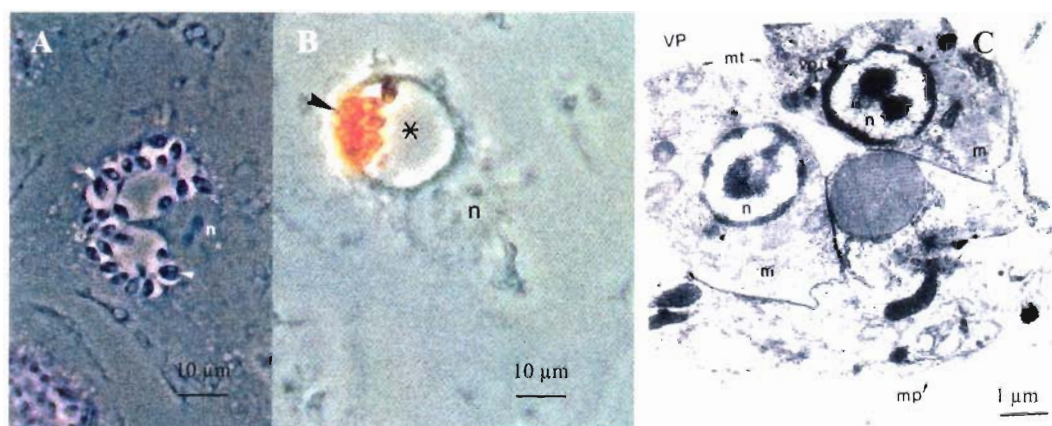


Figure 16 : Vacuoles parasitophores dans des macrophages de souris infectés par *Leishmania*. A : observation au microscope à contraste de phase de macrophages infectés par *L. mexicana* depuis 48 heures ; B : observation au microscope à contraste de phase d'un macrophage infecté par des amastigotes de *L. amazonensis* depuis 24 heures ; C : observation en microscopie électronique à transmission des sites d'attachement des amastigotes de *L. amazonensis* sur la membrane des vacuoles parasitophores d'un macrophage murin infecté. n : noyau ; * : centre de la vacuole parasitophore ; ► : amastigotes ; m : mégasomes ; mt : microtubules corticaux ; vp : vacuoles de polyphosphate ; VP : lumière de la vacuole parasitophore ; mp : membrane plasmique du macrophage (d'après Antoine *et al.*, 1999).

Les VP possèdent les caractéristiques de phagolysosomes suite à la fusion des phagosomes abritant des leishmanies avec des endosomes tardifs et des lysosomes. Dans le cas des phagosomes abritant *L. amazonensis*, cette fusion est si importante qu'elle aboutit à une déplétion quasi totale des lysosomes de la cellule hôte (Barbieri *et al.*, 1985). Paradoxalement, la fusion lysosomiale ne provoque pas la destruction des parasites. En outre, les VP récupèrent de nombreuses substances internalisées par la voie d'endocytose des macrophages, qui peuvent servir comme source de nutriments pour les parasites. Les VP maintiennent un pH luminal acide (entre 4,5 et 5,5 selon les espèces) par un processus actif faisant intervenir la pompe à protons ATP dépendante située dans leur membrane. Des études du contenu vacuolaire ont mis en évidence la présence de nombreuses enzymes lysosomales (phosphatase acide, trimétaphosphatase, arylsulfatases A et B, cathepsines B, H, L et D; voir tableau 7). Une augmentation de l'activité de ces enzymes est même observée lors de l'infection, suggérant que les leishmanies ne résistent pas à leur environnement en réduisant

l'activité et/ou la quantité d'hydrolases acides de la cellule hôte (Antoine *et al.*, 1987; Prina *et al.*, 1990 ; Alexander et Russel, 1992). La membrane des VP (Tableau 7), quant à elle, présente des caractéristiques mixtes de membrane lysosomale (présence de glycoprotéines membranaires lysosomales, absence de récepteurs pour le mannose-6-phosphate) et de membrane pré-lysosomales (présence de macrosialine et de protéine Rab7p). Les VP résulteraient donc de la fusion stable des lysomes précoces et tardifs. De manière intéressante, on peut également noter la présence de molécules de classe II du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) dans la membrane des VP, certainement issues de la membrane plasmique du macrophage lors de la constitution du phagosome.

Molécules synthétisées par		Espèce de <i>Leishmania</i> analysée
MEMBRANE DES VACUOLES PARASITOPHORES		
macrophages	- rab7p (GTPase spécifique des endosomes tardifs/prélysosomes) - glycoprotéines lysosomales lamp-1 lamp-2 - macrosialine (glycoprotéine prélysosomale spécifique des macrophages) - ATPase H⁺ - molécules de classe II du CMH - molécules H2-M codées par le CMH - annexines I et VI	<i>L. donovani</i> , <i>L. amazonensis</i> <i>L. donovani</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> , <i>L. mexicana</i> <i>L. donovani</i> , <i>L. amazonensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. donovani</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. major</i> <i>L. amazonensis</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. donovani</i> <i>L. mexicana</i>
parasites	- antigènes non identifiés détectés à l'aide d'anticorps spécifiques de groupements carbohydrates	<i>L. mexicana</i>
CONTENU DES VACUOLES PARASITOPHORES		
macrophages	- phosphatase acide - trimétophosphatase - arylsulfatase - β-glucuronidase - cathepsine B - cathepsines H, L, D - grand récepteur pour le mannose 6-phosphate	<i>L. amazonensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. donovani</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. mexicana</i> <i>L. donovani</i> , <i>L. amazonensis</i> <i>L. mexicana</i>
parasites	- antigènes non identifiés détectés à l'aide d'anticorps spécifiques de groupements carbohydrates - protéophosphoglycane de haut poids moléculaire - phosphatase acide	<i>L. mexicana</i> <i>L. donovani</i>

Tableau 7 : Composition de la membrane et du contenu des vacuoles parasitophores de différentes espèces de *Leishmania* (d'après Antoine *et al.*, 1998).

1.4 – La différenciation des formes promastigotes en formes amastigotes.

C'est à l'intérieur de la vacuole parasitophore que les promastigotes vont se différencier en amastigotes, formes parasitaires mieux adaptées à la vie intracellulaire. Cette transformation se fait entre 12 et 24 heures après la phagocytose des promastigotes par les macrophages (Killick-Kendrick et Molyneux, 1981) et présente une durée variable selon les espèces de *Leishmania*. D'après des critères ultrastructuraux et biochimiques, ce processus requiert 3 à 4 jours pour *L. mexicana*, et jusqu'à 5 à 7 jours pour *L. amazonensis*. Au cours de cette différenciation, il se produit des modifications morphologiques et une modulation de l'expression de certains gènes (activation/inactivation). Ainsi, on observe une perte progressive du flagelle, liée à une diminution de la synthèse des tubulines α et β , une ovalisation du corps cellulaire avec migration du kinétoplaste en position baso-latérale, et l'apparition des mégasomes chez *L. amazonensis* et *L. mexicana*. La composition de la membrane plasmique va également se modifier: le LPG va disparaître chez *L. donovani* et *L. mexicana*, ou ne va plus être exprimé qu'à un très faible niveau et sous une forme différente chez *L. major*. De même, les isoformes de la gp63 ne vont plus être exprimées ou seulement très faiblement selon les espèces. Certaines fonctions de la membrane plasmique, telles que le maintien du gradient électrochimique de protons et le transport de la proline, sont toujours assurées au stade amastigote mais par des molécules en partie différentes de celles utilisées par le stade promastigote.

C'est la diminution de pH et l'action de la température qui seraient les facteurs déclenchant la différenciation des promastigotes, et il est possible d'obtenir *in vitro* la transformation promastigotes-amastigotes en modifiant les conditions de pH, de température et de milieux de culture des parasites (Pan, 1984 ; Eperon et MacMahon-Pratt, 1989 ; Doyle *et al.*, 1991 ; Bates *et al.*, 1992 ; Joshi *et al.*, 1993 ; Bates et Tetley, 1993 ; Bates, 1993, 1994 ; Lemesre *et al.*, 1994 ; Zilberstein et Shapira, 1994 ; Hodgkinson *et al.*, 1996 ; Balanco *et al.*, 1998 ; Cysne-Finkelstein *et al.*, 1998 ; Saar *et al.*, 1998).

1.4.1 – La perturbation des fonctions macrophagiques.

L'infection des macrophages par *L. donovani* a pour conséquence l'inhibition d'un bon nombre de leurs fonctions parmi lesquelles se trouvent la phagocytose, la production d'IL-1, l'expression du gène *c-fos* en réponse au lipopolysaccharide (LPS) et aux esters de phorbol, l'expression des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité

(CMH II) en réponse à l'IFN- γ , ou la production de radicaux libres de l'oxygène et des dérivés nitrés suite à une stimulation par les esters de phorbol (Reiner *et al.*, 1987 ; Moore *et al.*, 1993 ; Olivier, 1996 ; Olivier *et al.*, 1998 ; Nandan *et al.*, 1999). Une fois infectés, les macrophages semblent avoir perdu leurs aptitudes de cellules effectrices de l'immunité, en dépit de stimuli adéquats (Docampo et Moreno, 1999). Certaines molécules parasitaires semblent d'ailleurs pouvoir moduler l'expression des ARNm codant la NOS II, tandis que d'autres semblent plutôt agir sur l'activité de cette enzyme (Stenger *et al.*, 1996; Piani *et al.*, 1999; Linares *et al.*, 2000; Balestieri *et al.*, 2002).

En fait, les leishmanies ont développé différentes stratégies, soit pour inhiber les fonctions leishmanicides du macrophage, soit pour résister aux molécules toxiques générées. Le premier candidat à l'établissement du parasitisme est certainement le LPG, car lorsqu'il est absent chez les parasites, ces derniers sont phagocytés très efficacement et détruits très rapidement. Durant les premières étapes de l'infection, le LPG empêche la fusion des phagosomes avec les lysosomes, ce qui protège les promastigotes de l'action des hydrolases et leur garantit un environnement propice pour leur différenciation en amastigotes (Desjardins et Descoteaux, 1997). Le LPG agirait en inhibant ou en atténuant certains signaux de transduction mettant en jeu la protéine kinase C (PKC) et des fonctions dépendantes de cette enzyme comme la flambée oxydative (MacNeely et Turco, 1987 ; MacNeely *et al.*, 1989 ; Descoteaux *et al.*, 1992). Le LPG agirait au niveau de la phosphorylation des substrats de la PKC corrélée à une translocation moindre vers la membrane plasmique (Olivier *et al.*, 1992b ; Descoteaux et Turco, 1993). D'autres molécules comme la phosphatase acide, la gp 63 ou les GIPLs pourraient entrer en synergie avec le LPG pour inhiber le stress oxydatif (Remaley *et al.*, 1985 ; MacNeely *et al.*, 1989 ; Sorensen *et al.*, 1994). Le LPG et la phosphatase acide perturbent également l'homéostasie calcique, qui est primordiale au niveau de la signalisation intracellulaire du macrophage (Olivier *et al.*, 1992a). Par exemple, la phosphatase acide entraînerait une déphosphorylation de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) *in vitro*, perturbant ainsi la signalisation intracellulaire du macrophage en bloquant le relargage des réserves calciques. Le LPG et les GIPLs peuvent également moduler l'expression de la NO synthase inductible en diminuant la production de NO, responsable en grande partie de l'activité microbicide des macrophages (Proudfoot *et al.*, 1995, 1996). Une revue de Bogdan et Rölinghoff (1998) indique que des études pharmacologiques ont permis de mettre en évidence de fortes homologues de structure entre une protéine de leishmanie et la L-N^G-monométhyl-arginine (L-NMMA), qui est un analogue structural de la L-arginine inhibant compétitivement la NOS-II (Travaux non publiés).

D'autres voies de signalisation intracellulaire, par exemple mettant en jeu des tyrosines kinases, semblent également altérées. Martiny *et al.* (1996, 1999) ont montré une inhibition de la phosphorylation des tyrosine kinases quelques minutes après l'infection des macrophages par *L. amazonensis*. De la même façon, la phosphorylation du facteur de transcription Stat 1 par les kinases Janus Jak 1 et Jak 2, lors de l'infection de macrophages par *L. donovani*, perturbe la transcription de gènes induite par l'IFN- γ (Nandan et Reiner, 1995). La phosphorylation des tyrosines peut donc être considéré comme un mécanisme de régulation des mécanismes de défense antimicrobienne, comme le burst oxydatif (Mitsuyama *et al.*, 1993 ; Zhou et Brown, 1993), l'activation par les récepteurs de l'IFN- γ (Greenlund *et al.*, 1994), ou la production de NO par les macrophages activés (Dong *et al.*, 1993). L'expression de facteurs parasitaires comme les phosphatidylsérines à pour conséquence de faciliter la dissémination des formes amastigotes dans l'hôte en augmentant leur internalisation par les macrophages, mais surtout en induisant la sécrétion de TGF- β (inhibiteur de la réponse immune) et la synthèse d'IL-10, cytokine antagoniste à l'activation macrophagique donc à la production de NO, créant ainsi une sensibilité accrue à l'infection leishmanienne (De Freitas Balanco *et al.*, 2001). Le TGF- β est un puissant activateur de l'arginase, qui régule négativement la voie de la NOS-II en hydrolysant la L-arginine en ornithine et en urée, induisant alors la voie de biosynthèse des polyamines, qui sont des facteurs de croissance parasitaires (Coons *et al.*, 1990 ; Iniesta *et al.*, 2001, 2002).

Des enzymes hydrolytiques parasitaires interviendraient également dans la modulation des fonctions macrophagiques. Chez différentes espèces de *Leishmania*, une diminution de la présentation par les molécules CMH II d'antigènes exogènes et d'antigènes parasitaires a été observée (Fruth *et al.*, 1993 ; Lytton *et al.*, 1993 ; Prina *et al.*, 1993, 1996 ; Wolfram *et al.*, 1995, 1996). L'endocytose, la séquestration et la dégradation dans la VP de molécules de classe II ont été décrites dans des macrophages infectés par *L. amazonensis* ou *L. mexicana* (Reiner *et al.*, 1987 ; Lang *et al.*, 1994 ; De Souza-Leao *et al.* , 1995 ; Flohe *et al.* , 1997 ; Antoine *et al.*, 1998). Cependant la signification biologique de ce phénomène n'est pas encore élucidée. En effet, l'internalisation et la dégradation des molécules de classe II par les amastigotes ne sont pas corrélées à une réduction de l'expression de ces molécules par les macrophages infectés (Antoine *et al.*, 1998). Récemment, ces mêmes auteurs (Antoine *et al.*, 1999) ont montré dans le modèle expérimental murin, que les leishmanies capturaient, en plus des molécules de classe II, d'autres molécules nécessaires pour la présentation d'antigènes, en particulier le cofacteur H-2M qui facilite la liaison des fragments antigéniques sur les

molécules de classe II. Des travaux anciens de Coombs et Baxter (1984) avaient démontré que des inhibiteurs de cystéine-protéases inhibaient la croissance des formes amastigotes des macrophages péritonéaux de souris. Une hypothèse séduisante serait que ces cystéine-protéases seraient à l'origine de la dégradation des molécules du CMH II et que les produits de dégradation de molécules clés de l'immunité joueraient un rôle de facteurs de croissance parasites (Rosenthal, 1999).

Outre la dérégulation des fonctions microbicides effectrices du macrophage, les leishmanies se servent de leur cellule hôte comme d'une cachette au sein de l'organisme infecté. En effet, l'infection de macrophages murins par *L. donovani* a pour conséquence d'inhiber leur capacité à entrer en apoptose, par l'intermédiaire du facteur de croissance GM-CSF (granulocyte monocyte-colony stimulating factor) et par la production de TNF- α (Moore et Matlashewski, 1994). Le macrophage devenu inoffensif et quasi-immortel constitue alors la cellule hôte presque parfaite. De plus, les leishmanies induisent la sécrétion par la cellule infectée, de prostaglandine E2 (Reiner et Malemud, 1985) et de TGF- β (Barral *et al.*, 1993), tous deux considérés comme des inhibiteurs de la réponse immune. Ayant pris le contrôle des fonctions du macrophage qui les abrite, les leishmanies élaborent en outre des mécanismes conduisant à un silence immunologique contribuant à leur maintien et à leur développement au sein de l'hôte infecté.

1.4.2 – L'adaptation des amastigotes aux conditions de vie intracellulaires : le pH et la température.

Les amastigotes dans les vacuoles parasitophores doivent se multiplier dans un compartiment lysosomal très acide et riche en hydrolases fonctionnelles. Contrairement à d'autres micro-organismes à développement intracellulaire qui ont élaboré des mécanismes d'échappement, les amastigotes de *Leishmania* se sont adaptés à un tel environnement. En effet, les amastigotes sont des organismes anaérobies, acidophiles et capables de résister aux hydrolases lysosomales.

Leur métabolisme ainsi que l'incorporation des nucléosides, du glucose et de la proline, est optimal à un pH compris entre 4 et 5,5 (Mukkada *et al.*, 1985 ; Zilberstein et Dwyer, 1985 ; Glaser *et al.*, 1988 ; Burchmore et Hart, 1995 ; Mauel, 1996). Cette acidophilie serait liée à la présence dans leur membrane plasmique d'une pompe à protons dépendante de l'ATP, spécifique de stade (Figure 17). Cette pompe contribuerait au maintien du pH intracellulaire qui se situe entre 6,8 et 7. De plus, les amastigotes tireraient partie de la force

protomotrice générée pour faire entrer le glucose et les acides aminés (Zilberstein et Dwyer, 1985, 1988 ; Glaser *et al.*, 1988 ; Mauel, 1996).

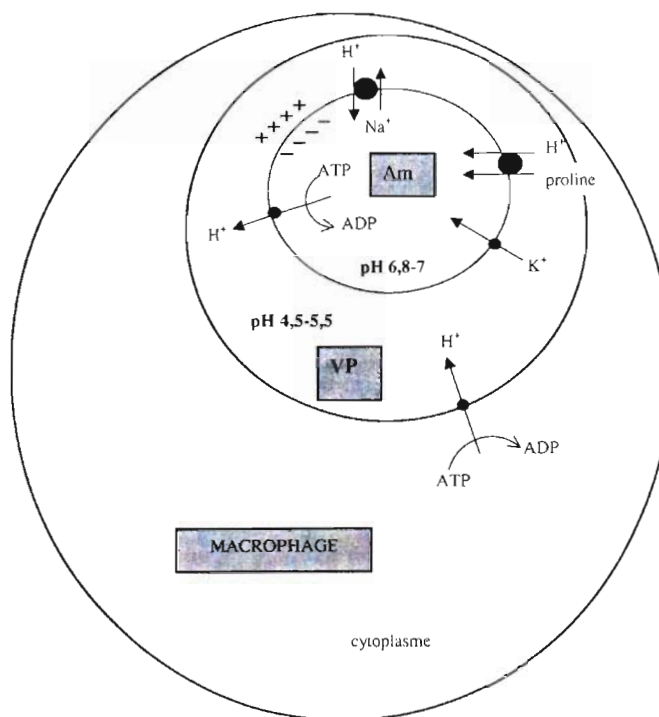


Figure 17 : Modèle de régulation du pH et des concentrations ioniques chez les amastigotes de *Leishmania*. Am : amastigote ; VP : vacuole parasitophore (d'après Mukkada *et al.*, 1985).

L'expression de certaines protéines de choc thermique telles que les hsp70 et hsp83 est induite avant les changements morphologiques des amastigotes et permettrait l'adaptation des parasites aux changements d'environnement qu'ils rencontrent chez l'hôte vertébré (passage insecte-mammifère, conditions hostiles des VP) (Leon *et al.*, 1995 ; Andersen *et al.*, 1996). L'incubation de *L. chagasi* avec des concentrations d' H_2O_2 non létales, mimant ainsi la flambée oxydative déclenchée lors de l'entrée dans le macrophage, induit la synthèse de hsp70. De plus, cette incubation rend les parasites plus résistants à la toxicité des peroxydes et augmente leur virulence pour des souris BALB/c (Wilson *et al.*, 1994). La synthèse de la hsp70 induite dès l'entrée du promastigote dans le macrophage protégerait ce dernier de la flambée oxydative.

En outre, les amastigotes possèdent de fortes activités glutathion-péroxydase, catalase et superoxyde dismutase (Panaro *et al.*, 1995). Ces trois enzymes sont capables de dégrader les produits toxiques de l'oxygène et diminuent donc fortement les effets de la flambée oxydative sur les parasites. D'autre part, l'activité protéasique de la gp63 inactive les enzymes

protéolytiques de la cellule hôte, protégeant ainsi le parasite de leur action (Chaudhuri et Chang, 1988).

Enfin, les amastigotes n'expriment que très peu de protéines sur leur membrane ou bien elles sont difficilement accessibles, ce qui pourrait favoriser la résistance aux protéases. Le LPG et les protéines liées par un ancrage GPI sont beaucoup moins exprimés à la surface des amastigotes que sur celle des promastigotes. Par contre, la présence de nombreux GIPLs aurait un rôle protecteur contre l'action des enzymes et le pH acide.

1.4.3 – Persistance et développement de l'infection chez l'hôte mammifère : la pathogénie du stade amastigote.

L'étape de dissémination des leishmanies au sein des mammifères infectés est très peu connue. Chez des porteurs asymptomatiques, comme c'est le cas chez le chien, les leishmanies peuvent séjourner à l'état latent durant toute la vie de l'animal. D'autre part, il existe peu de renseignements sur la diffusion des sites d'infection dans les cas de leishmanioses cutanées diffuses ou cutanéomuqueuses, ou encore sur l'émergence de lésions cutanées après une leishmaniose viscérale.

Lors d'examen microscopiques de biopsies de lésions, il est courant d'observer des formes amastigotes extracellulaires. L'hypothèse classiquement formulée est une rupture de la cellule hôte due à une surpopulation parastiaire ; les amastigotes ainsi libérés étant rapidement phagocytés par les macrophages sains environnants. Cependant, il semble que la voie d'internalisation soit différente de celle existant lors de la primo-infection par les promastigotes. En effet, l'adhésion des formes amastigotes de *L. amazonensis* aux macrophages n'est pas inhibée par le blocage des récepteurs macrophagiques CR1 ou mannose-fucose, et l'adjonction de sérum n'augmente pas l'ancrage des parasites (Mosser et Rosenthal, 1993).

Dans le modèle expérimental murin, des techniques sensibles d'amplification génique (PCR) ont montré qu'un petit nombre de parasites pouvait persister dans les ganglions lymphatiques, la rate et la moelle osseuse plusieurs mois après la guérison des lésions cutanées (Aebischer *et al.*, 1993). Ces parasites sont parfois trouvés dans des macrophages ou des cellules dendritiques, mais le plus souvent dans des fibroblastes réticulés, des cellules qui constituent un refuge pour les amastigotes car elles ne disposent que d'un pouvoir leishmanicide limité (Bogdan *et al.*, 2000). Le maintien de l'infection sous forme latente dépend de la capacité du macrophage à générer des taux de NO suffisant pour induire un effet

leishmanicide. Ainsi, des quantités élevées de la NO synthase inductible (NOS II) continuent à être détectées au niveau des sites inflammatoires et dans les ganglions lymphatiques plusieurs mois après l'infection. De plus, l'administration d'un inhibiteur de la NOS II à des souris guéries depuis plusieurs mois entraîne une multiplication massive du parasite et l'apparition de nouvelles lésions. Enfin, il est maintenant acquis que le maintien d'une expression élevée de NOS II plusieurs mois après l'infection dépend de la stimulation chronique de lymphocytes T CD4 + anti-*Leishmania*. Ainsi, l'élimination sélective, même partielle, de ces cellules chez des souris ayant survécu à l'infection entraîne une augmentation de la charge parasitaire, un phénomène comparable à celui observé chez l'homme dans le cas de patients infectés par le VIH. Malgré ce dernier résultat, très peu d'informations sont actuellement disponibles sur le phénotype, la durée de vie et la fréquence de renouvellement des lymphocytes T anti-*Leishmania* chez des souris résistantes. Il semble néanmoins que le maintien d'une immunité protectrice contre le parasite nécessite la production continue d'IL-12. Ainsi, le contrôle de la multiplication du parasite par des souris déficientes en IL-12 n'est possible que si ces souris sont traitées périodiquement avec de l'IL-12 recombinante, l'interruption du traitement entraînant la multiplication massive du parasite (Park *et al.*, 2000).

2 - La réponse immune de l'hôte.

L'activation du système immunitaire en réponse à la détection de microorganismes pathogènes appartenant au non-soi est complexe. En outre, la diversité des réponses immunitaires chez un même type d'hôte laisse à penser qu'il peut exister une composante génétique à la sensibilité/résistance à l'infection par les leishmanies. Les mécanismes impliqués dans l'immunité innée naturelle agissent immédiatement après l'invasion par le pathogène. Cette première phase est rapidement suivie, quelques heures après l'infection d'une réponse immunitaire précoce non-adaptative. Ces phases précoces permettent de contrôler l'infection avant que les lymphocytes spécifiques de la réponse immunitaire adaptative ne soient générés. De plus, les cytokines produites au cours des phases initiales de la réponse immune précoce vont jouer un rôle déterminant dans le développement ultérieur de la réponse immunitaire adaptative en orientant celle-ci vers une réponse de type humorale ou cellulaire.

Dans le cas de l'infection par *Leishmania*, il semble que les deux types de réponses immunes coexistent après que le macrophage infecté aura joué son rôle de cellule

présentatrice d'antigènes. C'est sur le modèle expérimental murin de laboratoire qu'ont été réalisés la majorité des travaux d'immunologie qui ont permis d'élucider une partie des mécanismes qui gouvernent la différenciation dichotomique des lymphocytes T CD4+ naïfs en cellule de type Th2 productrices d'interleukine 4 (IL-4), d'IL-10 et d'IL-13, caractéristiques d'une réponse à médiation humorale, ou en cellules de type Th1 productrices d'IL-12 et d'interféron γ (IFN- γ), significatives d'une réponse à médiation cellulaire, (Figure 18).

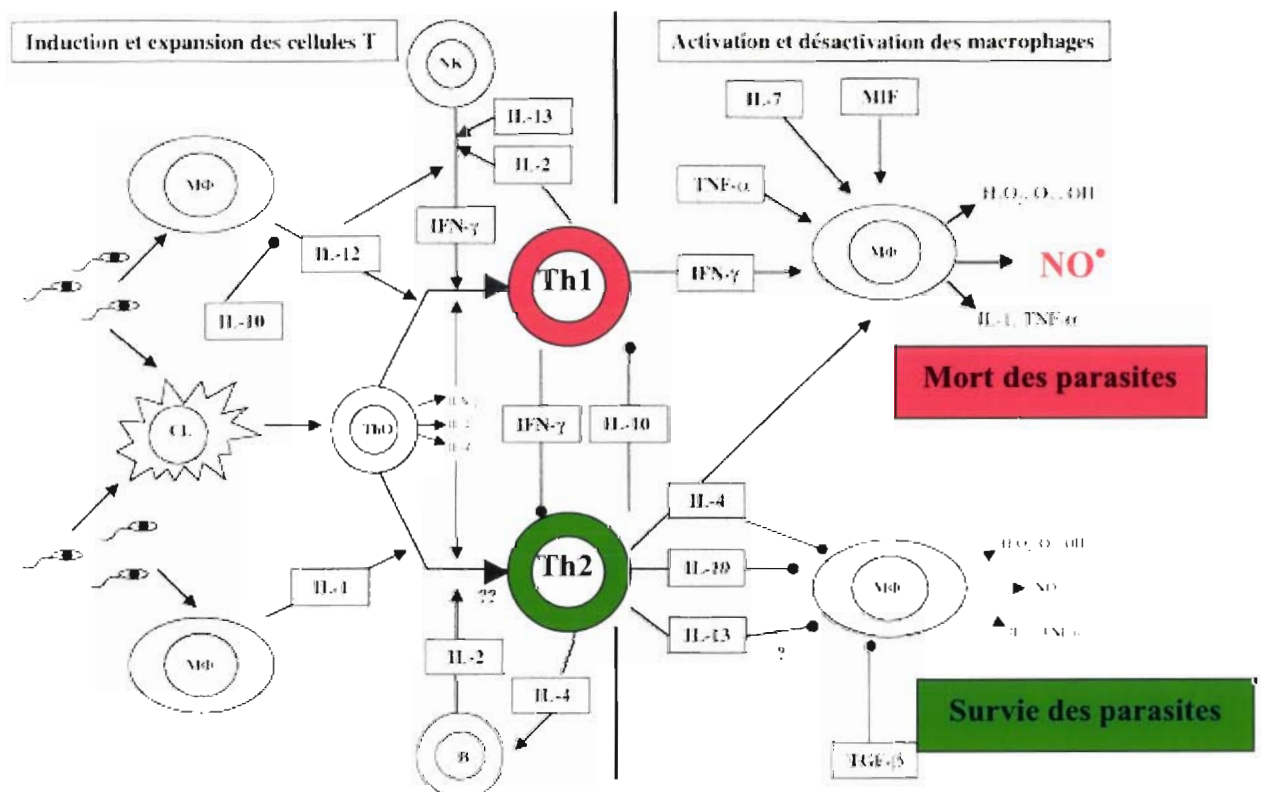


Figure 18 : Dichotomie de la réponse immunitaire lors de l'infection par *Leishmania*. CL : cellules dendritiques ou cellules de Langerhans ; MΦ : macrophages ; NK : natural killer ; B : lymphocytes B ; Th0 : précurseur des lymphocytes T helper ; Th1/Th2 : lymphocytes T helper de type TH1/Th2 ; → : activation ; —● : inhibition.

2.1 – Le contrôle génétique de la sensibilité/résistance à l'infection leishmanienne.

Plusieurs observations expérimentales ont permis d'identifier l'existence d'un contrôle génétique de l'évolution des infections leishmaniennes. Premièrement, les leishmanies sont capables d'établir des infections parasitaires asymptomatiques au sein d'une population donnée d'hôtes naturels (Meller-Melloul *et al.*, 1991 ; Ephros *et al.*, 1994 ; Shiddo *et al.*, 1995). Deuxièmement, des expériences ont montré qu'il y avait, pour une espèce donnée de

Leishmania, absence de polymorphisme au niveau des populations parasites (Pacheco *et al.*, 1995 ; Garin *et al.*, 2001).

La sensibilité aux leishmanies de différentes lignées de souris syngéniques est sous contrôle génétique et dépend essentiellement des réponses immunes innée et acquise (Coffman et Beebe, 1998 ; Beebe *et al.*, 1999). Ainsi, les souris C57Bl/6 et C3H sont résistantes à l'infection par diverses espèces de leishmanies et d'autres, telles que les souris Balb/C sont particulièrement sensibles. De nombreux gènes localisés dans et en dehors de la région codant les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) influencent le devenir des interactions hôtes-parasites (Tableau 8). Ils jouent un rôle majeur soit durant les étapes précoces soit durant les étapes tardives de l'infection (Blackwell, 1996). Le gène qui a été le plus étudié est *Lsh* qui contrôle notamment la phase précoce des infections dues à *L. donovani* et à *L. infantum*, mais aussi celle des infections dues à *Mycobacterium bovis*, *M. lepraemurium*, *M. intracellulare* et *Salmonella typhimurium*. De ce fait, le gène *Lsh* est également nommé gène *Bcg* ou *Ity*. Deux allèles du gène *Lsh* ont été décrits, *Lsh^r* chez les souris dites résistantes et *Lsh^s* chez les souris dites sensibles. Parmi les souris *Lsh^s* homozygotes récessives, différents profils de maladie ont été observés plusieurs mois après l'infection par *L. donovani* (Blackwell *et al.*, 1980). Chez ces souris, trois phénotypes sont observés : une guérison rapide (haplotypes s et r), une guérison à plus ou moins long terme (haplotype b) et pas de guérison du tout (haplotypes d, f et q) (Ulczak et Blackwell, 1983). Ce gène *Lsh* code pour une protéine membranaire dénommée Nramp (Natural resistance-associated macrophage protein) qui pourrait assurer des fonctions de transporteur (transport de nitrites/nitrates ?, transport de la L-arginine ?, transport de cations Mn^{2+} ?). La localisation intracellulaire de cette protéine a pu être précisée. Elle a ainsi été détectée dans la membrane de compartiments d'endocytose et de phagocytose. Le gène *Lsh* (maintenant dénommé *Nramp-1*) serait surtout exprimé au niveau de certaines populations de macrophages présentes dans le foie et la rate lesquelles, selon l'allèle exprimé, présenteraient une permissivité faible ou élevée à la multiplication des leishmanies (Blackwell *et al.*, 1991). Des souris mutantes dépourvues de gène *Nramp-1* fonctionnel ont été sélectionnées et sont extrêmement permissives à *M. bovis*, *L. donovani* et *S. typhimurium*, au moins pendant les premières phases de ces infections, ce qui démontre le rôle majeur de ce gène dans le contrôle précoce de la multiplication des agents pathogènes à développement intracellulaire. Le gène *Lsh* interviendrait aussi durant la phase tardive des infections dues à *L. donovani* en modulant certaines fonctions macrophagiques impliquées dans la présentation d'antigènes. Cette phase tardive est également sous la dépendance des gènes qui spécifient les molécules du CMH.

D'autres gènes, non liés à *Lsh* mais qui comme ce dernier pourraient s'exprimer au niveau de certaines populations de macrophages, contrôlent les leishmanioses cutanées dues à *L. major* (*Scl-1*) et à *L. mexicana* (*Scl-2*) (Blackwell, 1996). Les locus de *Scl-1* et *Scl-2* ont pu être précisés. Ils sont tous deux situés dans des régions contenant des gènes impliqués dans l'activation des macrophages et des lymphocytes. Ainsi, *Scl-1* est localisé dans une région distale du chromosome 11 qui code pour diverses monokines/chemokines (JE, MIP1 α , MIP1 β , RANTES) et pour la NO-synthase inductible (NOS II). Quant à *Scl-2*, il est localisé dans une région codant des tyrosine-kinases appartenant à la famille JAK, kinases qui jouent un rôle important dans l'activation des macrophages par l'IFN- γ .

Gène	Chromosome	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>	<i>L. mexicana</i>	
				Cutanée	métastatique/viscérale
Lsh	1	++	/	++	
H-2	17	++	+	/	++
H-11	ND	++	++	+	++
Scl-1	11	/	++	+	/
Scl-2	4	/	/	++	++/ND

Tableau 8 : Exemples de gènes murins contrôlant l'infection leishmanienne (d'après Alexander et Russel, 1992).

Des études très récentes aboutissent à l'idée que, chez la souris, la résistance/susceptibilité à *L. major* est gouvernée par de nombreux autres gènes que *Scl-1*, chacun n'ayant pas, semble-t-il, un rôle déterminant (Beebe *et al.*, 1997). Des locus ont été identifiés sur les chromosomes 6, 7, 9 (locus *lmrl* / *Leishmania major* resistance 1), 10, 15, 16 et 17 (locus *lmr2* / *Leishmania major* resistance 2). Les locus *lmr1* et *lmr2* recouvrent respectivement le gène codant pour le récepteur de l'IL-10 et le locus *H-2*. Par ailleurs, il a été proposé qu'un autre locus présent dans une partie proximale du chromosome 11 jouerait un rôle dans la résistance/susceptibilité à *L. major*. Ce locus, nommé *Tpm1* (*T-cell phenotype modifier 1*) est impliqué dans les voies de différenciation Th1/Th2 (maintien/perte de la capacité à répondre à l'IL-12) et il recouvre de nombreux gènes candidats codant pour diverses cytokines de type Th2 : IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, les gènes codant le GM-CSF et l'IL-3 ainsi que des gènes codant pour des molécules impliquées dans la transduction de signaux : ITK (IL-2 inducible T-cell kinase) ou pour des facteurs de transcription : IRF-1 (Interferon

Regulatory Factor-1, TcF1 (T-cell Factor 1). Il semble, enfin, que certaines cytokines comme l'IL-18, n'interviennent pas dans la différenciation des lymphocytes de type Th1 chez les souris génétiquement résistantes à l'infection par *L. major* (Monteforte *et al.*, 2000).

Enfin, le gène *H-11* de localisation et d'expression inconnues contrôle toutes les formes de leishmanioses murines étudiées (Blackwell *et al.*, 1985, Roberts *et al.*, 1989).

Des gènes homologues aux gènes murins décrits ci-dessus ont été identifiés chez l'homme. Par exemple, le gène *Nramp1* sur le chromosome 2, le gène *Scl-1* sur le chromosome 17 et le gène *Scl-2* sur le chromosome 9. Cependant, aucune étude n'a encore été réalisée sur l'implication de ces gènes dans le contrôle génétique de l'infection leishmanienne. Chez le chien, une étude récente montre que des mutations dans le gène *Nramp1* seraient à l'origine d'une plus grande susceptibilité à l'infection par *Leishmania* (Altet *et al.*, 2002).

2.2 – La réponse immune à médiation humorale.

Lors de l'infection par *L. donovani*, l'hôte va développer une hypergammaglobulinémie caractéristique. Cependant, il semble que l'immunité à médiation humorale n'intervienne que peu dans les mécanismes effecteurs de la résistance à l'infection. Néanmoins, les observations cliniques et plusieurs études indiquent que les lymphocytes B et les anticorps peuvent influencer la progression de la maladie et la guérison. En particulier, des travaux pionniers ont mis en évidence un rôle régulateur des anticorps dans le contrôle de l'infection. Lorsque des souris Balb/C (sensibles à l'infection par *L. major*) sont traitées à la naissance avec des anticorps anti-IgM, ces souris alors déficientes en cellules B et en anticorps, deviennent résistantes à une infection cutanée par *L. major* (Sacks *et al.*, 1984). Paradoxalement, le même traitement effectué sur des souris C3H/HeN résistantes à l'infection par *L. major*, conduit au développement de lésions cutanées (Scott *et al.*, 1986). La progression normale de la maladie chez des souris Balb/C et C3H/HeN déplétées en cellules B peut être restaurée par transfert de cellules T. Ces résultats indiquent que la formation de cellules T protectrices ou exacerbatrices de la maladie chez la souris est dépendante des cellules B et que cette formation est reliée à l'habileté de ces cellules B à présenter les antigènes (Liew, 1990). D'autres travaux ont montré que certains anticorps pouvaient accompagner un état de protection contre la leishmaniose. Par exemple, un anticorps monoclonal anti-PSA de *L. amazonensis*, utilisé dans un essai Winn-type, a prouvé son rôle protecteur chez des souris BALB/c infectées avec des promastigotes de cette espèce (Anderson *et al.*, 1983). D'autre part, l'effet protecteur observé lors de l'immunisation par une

PSA de *L. amazonensis* s'accompagne d'une production d'anticorps anti-PSA (McMahon-Pratt *et al.*, 1993). Le transfert passif de ces anticorps anti-PSA offre également un bon niveau de protection (Anderson *et al.*, 1983).

Bien que classiquement utilisés pour diagnostiquer les leishmanioses, les anticorps produits lors de l'infection par *Leishmania* semblent également jouer un rôle non-négligeable dans l'immunité antiparasitaire. A ce titre, ils présentent plusieurs intérêts :

➤ **Une action directe sur les parasites.** En se fixant sur les amastigotes, les IgG et les IgM peuvent activer le complément et permettre la destruction des parasites libres (Hoover *et al.*, 1985). Le sérum d'animaux résistants à *Leishmania* est toxique pour les parasites et cette propriété disparaît après chauffage ou absorption des anticorps (Pearson et Steigbigel, 1981).

➤ **La modulation de l'action des macrophages.** Les anticorps peuvent agir par opsonisation et suivant les cas augmenter ou diminuer la phagocytose et perturber le développement intracellulaire des parasites (Pearson et Steigbigel, 1980). Les parasites sont capables d'échapper à l'action des anticorps par un phénomène de « capping ». Les promastigotes et les amastigotes de *L. donovani* peuvent regrouper très rapidement les antigènes après fixation d'anticorps. Les plages de complexes antigènes-anticorps migrent ensuite à une extrémité de la cellule puis sont éliminés (Doyle *et al.*, 1974, 1975; Dwyer, 1976).

➤ **Une activation polyclonale des lymphocytes B.** Chez l'homme parasité par *L. donovani*, la stimulation du système immunitaire peut s'accompagner de l'apparition d'anticorps anti-muscles lisses, de facteurs rhumatoïdes ou de cryoglobulines aux conséquences hépatiques, rénales et vasculaires diverses (Pearson *et al.*, 1983 ; Wolga *et al.*, 1983 ; Argov *et al.*, 1989). Chez le chien parasité par *L. infantum*, un pic très important de β et γ -globulines accompagne la production oligoclonale d'immunoglobulines dont certaines sont spécifiques d'antigènes de *Leishmania*, et d'autres liées au processus inflammatoire, comme les anticorps anti-actine et anti-tubuline (Pateraki *et al.*, 1983 ; Brandonisio *et al.*, 1990).

2.3 – La réponse immune à médiation cellulaire.

2.3.1 – Les premières étapes de l'invasion et l'immunité innée.

Lors de la piqûre du phlébotome, les promastigotes métacycliques injectés sont confrontés à la première barrière de l'immunité de l'hôte infecté, constituée par le système du complément (Figure 19). L'activation des protéines du complément par la voie classique entraîne la fixation du composant C3 sur la membrane plasmique des parasites et son clivage en C3b. C3b peut se fixer au LPG ou à la gp63 du parasite et induire sa destruction en déclenchant la formation du complexe lytique C5b-9. Cependant, la gp63 favorise aussi la protéolyse de C3b et sa conversion en molécule inactive C3bi. En outre, les promastigotes possèdent à leur surface des protéines kinases capables d'inactiver C3 et C3b en les phosphorylant. Enfin, l'encombrement spatial du LPG restreint l'accès à la membrane plasmique des complexes C5b-9 (voir § II, 3.1.1.1).

La seconde barrière de l'immunité innée est constituée par les polynucléaires neutrophiles, cellules phagocytaires du sang circulant, qui sont retrouvées en abondance au niveau du site inflammatoire 1 à 2 heures après l'infection. Ces cellules ne sont pas indispensables à l'éradication des leishmanies mais leur mobilisation rapide contribue à fortement limiter l'expansion des leishmanies au début de l'infection.

Comme les neutrophiles, les macrophages résidant au site d'infection vont phagocyter des leishmanies. L'infection des macrophages par les promastigotes induit généralement la production rapide de facteurs chimiotactiques (MIP-1 α , MCP-1) et de cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12) qui provoquent et amplifient la réaction inflammatoire en attirant et en activant d'autres cellules du système immunitaire. Le jeu des cytokines va avoir pour conséquence principale l'activation du macrophage qui se traduit par la synthèse de molécules microbicides, comme les dérivés actifs de l'oxygène ou de l'azote. Le LPG et la gp63 peuvent inhiber les dérivés actifs de l'oxygène en agissant sur la protéine kinase C ou en dégradant l'un de ses substrats : la protéine MRP (Turco, 1999). D'autre part, les GIPLs, présents en grand nombre à la surface des leishmanies, sont responsables de l'inhibition de la synthèse de NO. Enfin, les macrophages infectés produisent peu ou pas d'IL-12, qui est une cytokine déterminante dans l'établissement d'une immunité protectrice.

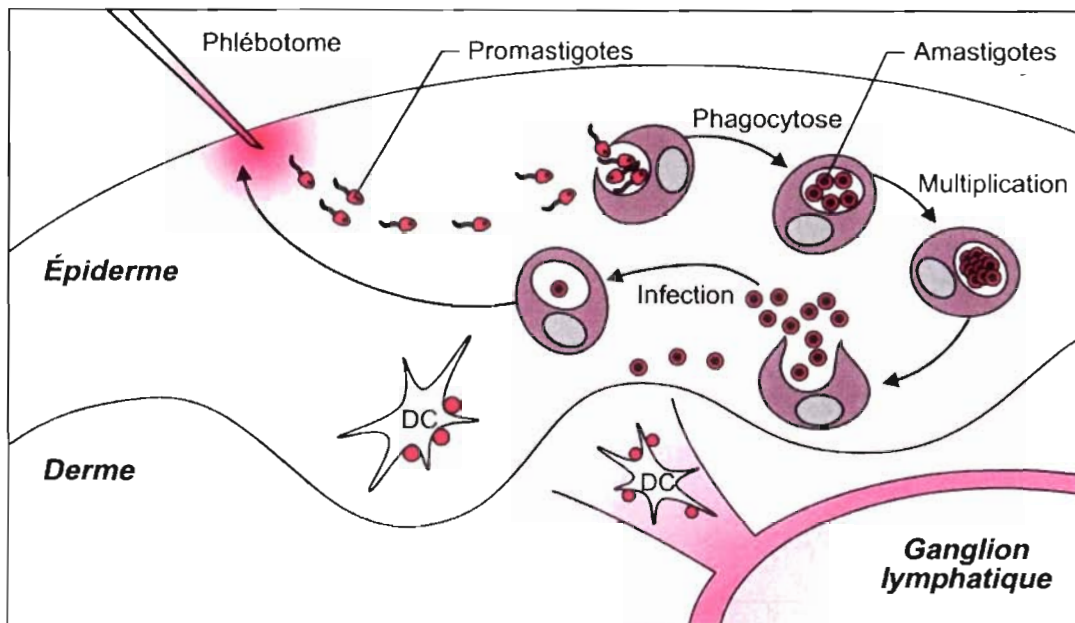


Figure 19 : Premières étapes de l'infection par *Leishmania*. DC : cellules dendritiques (d'après Filippi *et al.*, 2001).

2.3.2 – L'intervention et la migration des cellules dendritiques au cours de l'induction de l'immunité acquise.

L'activation de l'immunité acquise est le fruit de la présentation d'antigènes parasitaires au répertoire des lymphocytes T par le biais des cellules dendritiques de l'épiderme ou cellules de Langerhans (Figure 20). Lorsque les promastigotes pénètrent dans l'organisme, ces cellules qui résident dans l'épiderme, migrent dans le derme où elles phagocytent des fragments de parasites ou des parasites entiers ayant échappés à la destruction (Figure 19). Cette ingestion de parasites va avoir pour conséquence d'induire la maturation des cellules dendritiques et leur migration vers le ganglion lymphatique drainant (Moll, 1993). Lors de cette étape de maturation, les cellules dendritiques dégradent les antigènes de leishmanies en peptides et présentent ces peptides à leur surface sous forme de complexes stables avec les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Des expériences *in vitro* ont également démontré que la maturation des cellules dendritiques s'accompagnait de l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86 à leur surface (Von Stebut *et al.*, 1998).

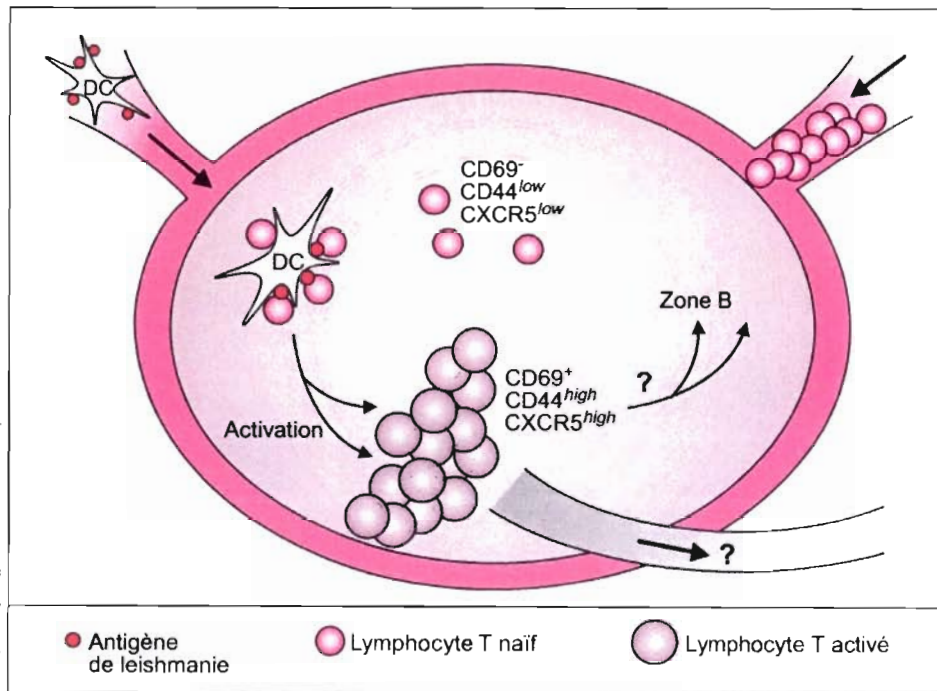


Figure 20 : Activation et différenciation des lymphocytes TCD4⁺ (d'après Filippi *et al.*, 2001).

Contrairement aux cellules de l'immunité innée qui reconnaissent des structures ou des molécules qui ne sont présentes que chez les microorganismes, comme le LPG ou la gp63 des leishmanies, les lymphocytes T CD4⁺ possèdent à leur surface des récepteurs (TCR = T Cell Receptor) qui vont reconnaître les complexes peptides antigéniques-CMH de classe II. Grâce à des mécanismes de recombinaison permettant d'engendrer un grand nombre de TCR différents à partir d'un petit nombre de gènes, le répertoire T est constitué de plusieurs millions de lymphocytes T reconnaissant chacun un ligand peptide-CMH particulier. Un nombre considérable de lymphocytes T de spécificités différentes est ainsi produit chaque jour dans le thymus. Ces cellules, que l'on qualifie de naïves parce qu'elles n'ont encore jamais rencontré leur ligand spécifique, passent ensuite dans le sang et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires : les ganglions lymphatiques et la rate. En l'absence de situation inflammatoire, ces lymphocytes T naïfs ne séjournent que quelques heures dans ces organes qu'ils quittent en passant dans la lymphe (dans le cas des cellules des ganglions) ou dans le sang (dans le cas des cellules de la rate). Étant donné la grande diversité des TCR, la population lymphocytaire T spécifique d'un micro-organisme est très faible. Ainsi, pour que ces lymphocytes T puissent jouer un rôle dans le développement d'une immunité anti-leishmanienne, une phase d'expansion est nécessaire. L'activation et l'expansion sélective des lymphocytes T anti-*Leishmania* s'effectue dans le ganglion lymphatique qui draine le site de l'infection.

2.3.3 – La maturation et la migration des lymphocytes T.

Des cellules dendritiques présentant à leur surface des molécules du CMH associées à des peptides de *Leishmania* commencent à être détectées dans le ganglion 24 heures après l'infection. Même s'il n'a pas encore été possible de déterminer dans quelle région du ganglion se trouvaient ces cellules, des études effectuées dans d'autres modèles expérimentaux suggèrent fortement qu'elles soient localisées dans la zone T du ganglion. L'infection leishmanienne induit une expansion à la fois transitoire et très rapide des lymphocytes T dans le ganglion drainant. Cette expansion s'accompagne d'une progression rapide de ces lymphocytes anti-*Leishmania* à travers le cycle cellulaire et de changements phénotypiques caractéristiques de l'activation lymphocytaire : expression de CD69, augmentation de l'expression de CD44 et du récepteur des chimiokines CXCR5 (Malherbe *et al.*, 2000). L'expansion des lymphocytes T dans le ganglion est maximale 3 jours après l'infection. Ces cellules apparaissent ensuite dans la circulation sanguine, dans la rate et dans le foie. Une fois activés, les lymphocytes T anti-*Leishmania* se différencient en cellules productrices de cytokines. Dans le cas d'une immunité protectrice, les lymphocytes T se différencient principalement en lymphocytes T de type Th1 qui sécrètent l'IFN- γ , cytokine indispensable au contrôle de la multiplication des leishmanies (Figure 21) (Reiner et Locksley, 1995).

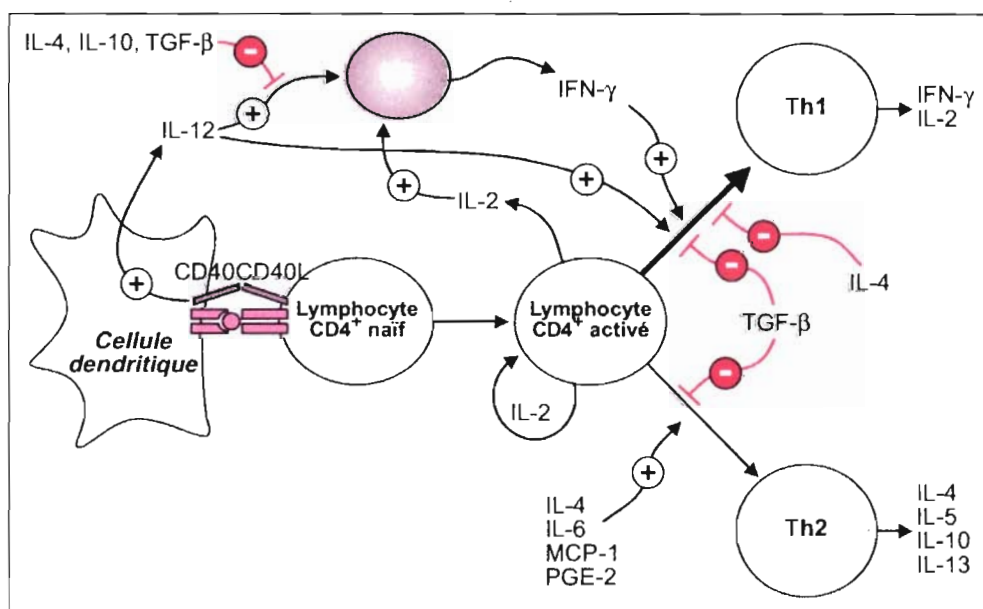


Figure 21 : Paramètres influençant la différenciation des lymphocytes T CD4+ (d'après Filippi *et al.*, 2001).



La différenciation des lymphocytes T anti-*Leishmania* en cellules de type Th1 étant déterminante pour le contrôle de l'infection, de nombreux chercheurs ont voulu identifier les molécules qui jouaient un rôle dans ce processus. Il semble maintenant acquis que des interactions moléculaires déterminantes se produisent au niveau de la synapse immunologique, la structure qui permet des contacts étroits entre cellules dendritiques et lymphocytes T (Lanzavecchia et Sallusto, 2000). Contrairement aux résultats obtenus dans d'autres modèles, certaines interactions moléculaires ne semblent jouer qu'un rôle limité dans la différenciation des lymphocytes T anti-*Leishmania* en cellules Th1. Ainsi, des souris porteuses d'une mutation dans le gène de la molécule de co-stimulation CD28 sont toujours capables de développer une réponse de type Th1 et de contrôler la multiplication du parasite (Corry *et al.*, 1994). De même, le blocage des interactions entre les molécules CD27, 4-1BB, CD30, OX40 et leurs ligands respectifs n'affecte pas la capacité des souris infectées à contrôler l'infection (Akiba *et al.*, 2000). A l'inverse, la différenciation des lymphocytes T en cellules Th1 nécessite l'interaction entre CD154, une protéine de la famille du TNF- α exprimée à la surface des lymphocytes T, et son récepteur CD40 présent à la surface des cellules dendritiques et des lymphocytes B. Ainsi, des souris porteuses de mutations dans les gènes de CD40 ou de CD154 sont incapables de développer une réponse protectrice de type Th1 à moins de recevoir quotidiennement une injection d'IL-12 recombinante (Campbell *et al.*, 1996). La fixation de CD154 à CD40 semble donc avoir pour fonction principale de stimuler la production d'IL-12, un mécanisme compatible avec le rôle déterminant de cette cytokine dans la différenciation des lymphocytes T en cellules Th1 (Sypek *et al.*, 1993 ; Von Stebut *et al.*, 1998). Cependant, il est difficile de déterminer si l'IL-12 agit de manière directe sur les lymphocytes T ou de manière indirecte en favorisant la production d'IFN- γ par les cellules NK. Ces deux hypothèses ne sont d'ailleurs pas exclusives l'une de l'autre et il est très probable que les deux phénomènes se produisent simultanément. En effet, l'IL-12 est un puissant activateur des cellules NK, et l'élimination de ces dernières au moment de l'infection provoque une dissémination plus rapide du parasite sans toutefois compromettre la guérison de l'hôte (Scharton et Scott, 1993). De plus, des études *in vitro* ont montré que l'IL-12 agissait directement sur les cellules T CD4 + naïves en activant la transcription du gène de l'IFN- γ et en inhibant celle du gène de l'IL-4 *via* le facteur de transcription STAT-4 et la protéine T-BET. D'autres cytokines agissent en synergie avec l'IL-12 pour favoriser la polarisation des lymphocytes T naïfs en cellules de type Th1. Ainsi, outre son rôle tardif dans l'activation des fonctions leishmanicides des macrophages, l'IFN- γ agit au début de l'infection en favorisant la production d'IL-1. De plus, la présence d'IFN- γ permet aux

lymphocytes T de conserver leur capacité de réponse à l'IL-12 en maintenant à leur surface des niveaux d'expression élevés de son récepteur. Enfin, l'IFN- γ favorise indirectement le développement d'une réponse Th1 en limitant l'expansion des lymphocytes Th2. Comme l'IFN- γ , l'IL-18 agit en synergie avec l'IL-12 pour favoriser la différenciation des lymphocytes en cellules de type Th1 (Robinson *et al.*, 1997).

Le rôle des lymphocytes T CD8⁺ dans le contrôle des leishmanioses est controversé. Certaines études ne prêtent aucun rôle actif aux lymphocytes T CD8⁺ dans le développement d'une réponse immune protectrice contre les leishmanies (Erb *et al.*, 1996 ; Huber *et al.*, 1998 ; Holaday, 2000). Il semble néanmoins que les lymphocytes CD8⁺ soient capables de reconnaître et d'interagir avec les macrophages infectés par des leishmanies chez la souris (Da Conceicao-Silva *et al.*, 1994), mais aussi chez le chien (Pinelli *et al.*, 1994). Une étude a montré que les sous populations lymphocytaires CD4⁺/CD8⁺ autant que CD4⁺/CD8⁻ étaient capables de conférer une protection contre l'infection leishmanienne chez la souris (Lezama-Davila et Gallagher, 1995). La tendance actuelle tendrait à prouver l'existence d'une coopération différentielle entre les lymphocytes T CD8⁺ et T CD4⁺, afin d'optimiser la réponse immune innée et adaptative contre l'infection leishmanienne (Mary *et al.*, 1999 ; Russo *et al.*, 1999 ; Belkaid *et al.*, 2002).

2.3.4 – La destruction des amastigotes : la voie du monoxyde d'azote (NO).

Une fois activés dans le ganglion drainant le site de l'infection, les lymphocytes T anti-*Leishmania* sont vraisemblablement recrutés au niveau du site inflammatoire. Cette hypothèse communément admise n'a toutefois jamais été démontrée expérimentalement puisqu'il n'a pas encore été techniquement possible de visualiser les lymphocytes T au niveau du site inflammatoire. Il semble toutefois acquis que la mobilisation des lymphocytes T anti-*Leishmania* conduit à une élimination des parasites par deux mécanismes complémentaires qui mettent en jeu les macrophages (Figure 22). Un de ces mécanismes est la destruction des macrophages infectés et le relargage des amastigotes dans le milieu extracellulaire. Ce phénomène dépend de l'interaction entre CD95L, une molécule de la famille du TNF- α exprimée à la surface des lymphocytes Th1, et son récepteur CD95, une molécule dont l'engagement induit la mort par apoptose et dont l'expression à la surface des macrophages infectés est augmentée par l'IFN- γ (Conceicao-Silva *et al.*, 1998). Le deuxième mécanisme par lequel les lymphocytes T participent à l'élimination des leishmanies est l'activation des

propriétés leishmanicides des macrophages. Cette activation est principalement due à l'induction par l'IFN- γ de l'expression de la NO synthase inducible (NOS II), une enzyme qui catalyse la synthèse d'un composé toxique pour les amastigotes, le NO (Bogdan *et al.*, 2000). L'induction de la synthèse de NOS II par les macrophages dépend à la fois de la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T et les cellules NK et de la sécrétion autocrine de TNF- α par les macrophages. En outre, des infections leishmaniennes expérimentales ont montré que la destruction des leishmanies pouvait être totalement réversée en présence de L-N^G-monométhyl-arginine (L-NMMA), un analogue structural de la L-arginine qui inhibe la NOS II. De plus, la destruction des amastigotes s'effectue normalement dans une lignée macrophagique déficiente en dérivés actifs de l'oxygène (flambée oxydative), conférant au NO un caractère nécessaire et certainement suffisant pour expliquer l'activité microbicide du macrophage (Liew et Cox, 1991).

En contrepartie, les leishmanies vont produire des molécules qui vont activer l'arginase par le biais de cytokines caractéristiques de la voie Th2, comme l'IL-4, l'IL-10 et surtout le TGF- β (Figure 30). L'activation de l'arginase va réguler négativement la NOS II et induire la voie de biosynthèse des polyamines qui sont des facteurs de croissance parasites.

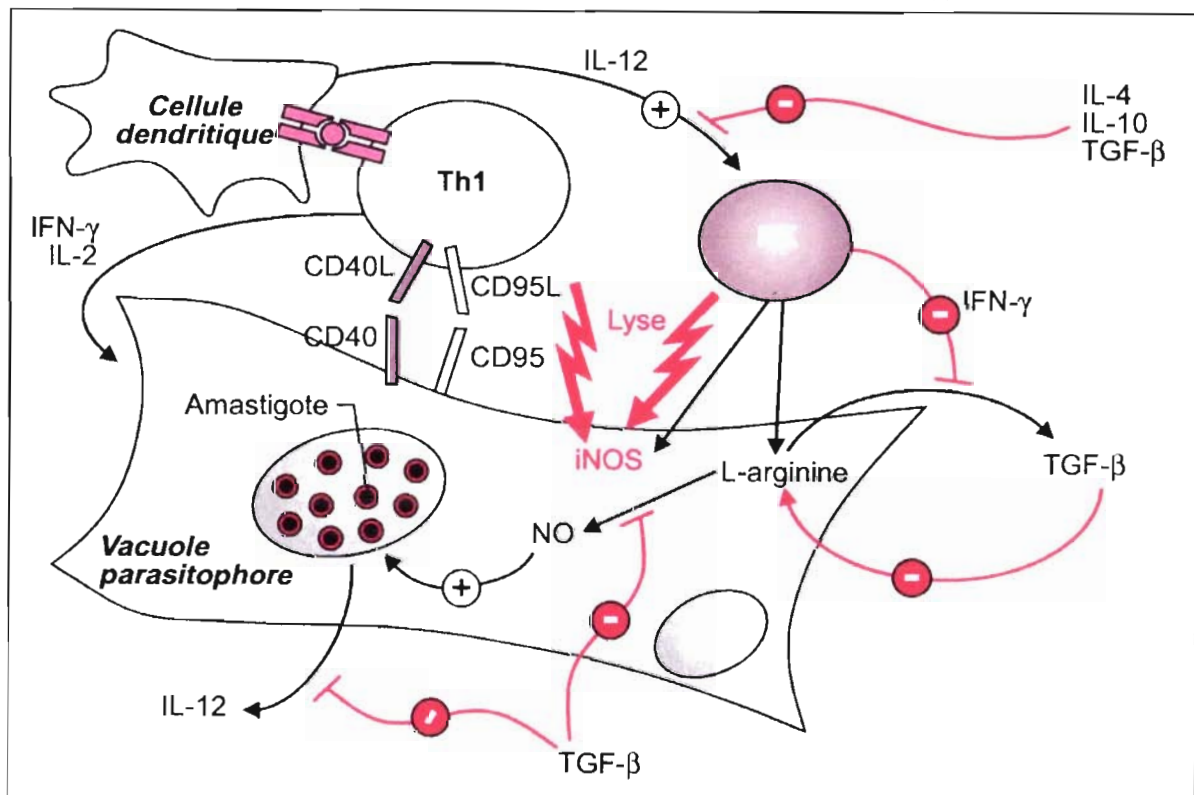


Figure 22 : Destruction des leishmanies (d'après Filippi *et al.*, 2001). (+) : activation ; (-) : inhibition ; (cellule avec éclat) : induction de la lyse du macrophage par les toxines des cellules tueuses (NK).

3 – Le NO, médiateur biologique ubiquitaire.

3.1 – Généralités.

Le NO a été élu “ Molecule of the year ” par les éditeurs du journal *Science* en 1992, confirmant ainsi son importance en biologie. En effet, le NO intervient dans des processus aussi divers que la pression sanguine, la physiologie cardio-vasculaire, la neurophysiologie, les fonctions rénales, hépatiques, pulmonaires et musculaires, les défenses immunitaires de l'hôte, l'inflammation, la division cellulaire, l'action des vasodilatateurs et des anti-tumoraux, le déclenchement des hormones, et le démarrage du diabète.

Le NO est synthétisé dans de nombreux types cellulaires, à partir de l'un des atomes d'azote du groupement guanidium de la L-arginine, par la NO synthase (NOS) à travers un processus qui conduit à la formation de L-citrulline (Figure 23). Plusieurs isoformes de cette enzyme ont été isolées (Forstermann *et al.*, 1991, 1994). Certaines sont toujours présentes dans les cellules (NO synthase constitutive : cNOS ou NOS I) et sont inactives jusqu'à ce que les taux de calcium intracellulaires augmentent, et qu'un complexe calcium-calmoduline vienne se fixer à l'enzyme (Lowenstein *et al.*, 1992). Cela permet une réponse très rapide et à un niveau très bas qui diminue également rapidement une fois que les taux de calcium chutent. Cette réponse génère des fluctuations intermittentes qui sont idéales dans la transmission des signaux. De tels signaux franchissent rapidement les membranes cellulaires, et sont maintenant reconnus comme ayant une activité importante en tant que second messagers en physiologie cardio-vasculaire, en immunologie, dans les fonctions rénales (Mattson *et al.*, 1992), ainsi qu'en neurophysiologie (Bredt *et al.*, 1990). Il existe au moins deux isoformes de la cNOS, l'une exclusive des cellules neuronales (brain NOS : bNOS ou NOS III) et l'autre que l'on croyait jusqu'à récemment restreinte aux cellules endothéliales (endothelial cells NOS : ecNOS ou NOS I) (Dineman *et al.*, 1994). Une autre forme de l'enzyme, la NO Synthase inducible (iNOS ou NOS II) n'est pas présente dans le métabolisme basal des cellules, mais nécessite le stimulus d'un inducteur, comme les cytokines TNF- α , IL-1, IFN- γ ou lymphotinine pour être générée. L'activité enzymatique est entière dès la synthèse de l'enzyme, probablement parce qu'un complexe calcium-calmoduline lui est déjà étroitement lié (Cho *et al.*, 1992). Nous pouvons également noter qu'il existe une forte synergie entre les inducteurs mais que d'autres cytokines (IL-4, IL-5, IL-8, IL-10), certains facteurs de croissance et les glucocorticoïdes peuvent réguler négativement la NOS II (Cox et Liew, 1992). Contrairement à la réponse rapide observée lorsque l'influx de calcium conduit à la formation de NO par la NOS I, les cytokines qui activent la NOS II

agissent plus lentement, mais conduisent généralement à des concentrations plus élevées de NO. La présence d'une NO synthase mitochondriale, mtNOS, a été détectée dans des mitochondries isolées de foie de rat (Ghafourifar et Richter, 1997, 1999 ; Giulivi *et al.*, 1998). Cette mtNOS, présente sur la face interne de la mitochondrie, est encore mal définie du point de vue biochimique mais elle jouerait un rôle dans l'acidification du pH de la matrice mitochondriale et présenterait une parenté immunologique avec la NOS II. Son activité catalytique est stimulée par une augmentation de calcium intramitochondrial, faisant elle-même suite à une augmentation des taux calciques cytoplasmiques. Le NO produit réagirait avec le superoxyde généré par les complexes mitochondriaux, amenant la formation de peroxynitrite intramitochondrial, lequel induirait le relargage de cytochrome c conduisant à la peroxydation des lipides membranaires mitochondriaux et à l'apoptose (Ghafourifar *et al.*, 1999).

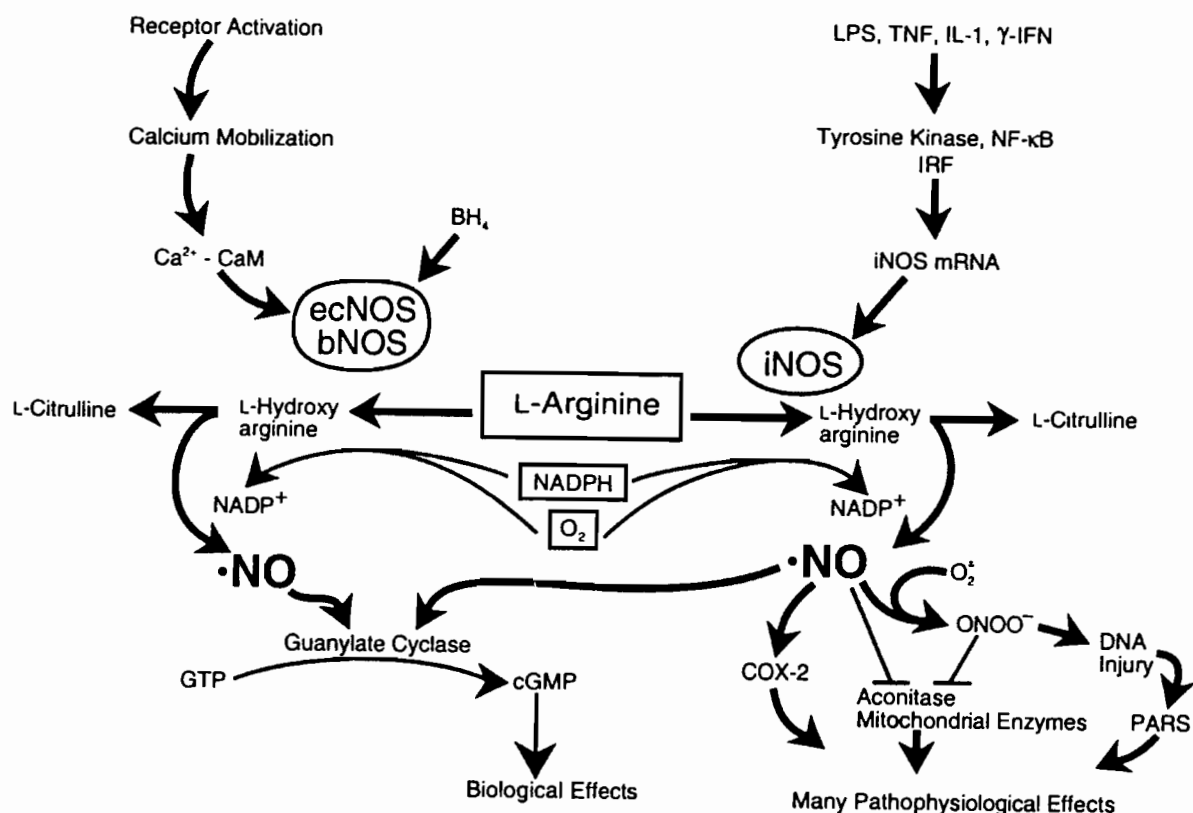


Figure 23 : Schéma général de la biosynthèse du NO par les différentes isoformes de la NO synthase ; influence de différents stimuli d'activation et conséquences sur certains effets biologiques.

3.2 – Les effets microbicides du NO sur les parasites.

Les espèces actives de l'azote, comme le NO, sont connues depuis longtemps pour leurs propriétés antimicrobiennes et ont été utilisées pendant de longues années en industrie agro-alimentaire pour empêcher que les viandes ne se gâtent à cause de bactéries (Ken *et al.*, 1926). Le premier composé utilisé a été le nitrite de sodium. Des concentrations oscillant de 0,02% à 1,5 % étaient suffisantes pour retarder la croissance d'un grand nombre de bactéries (Tan, 1941 ; Silva Mendez *et al.*, 1999). Le nitrate de sodium est également un bon conservateur, bien qu'il doive être réduit en nitrite, probablement par certaines bactéries présentes, avant qu'il ne soit actif. Les conditions légèrement acides de la viande transforment les nitrites en acide nitreux, que l'on pensait être la molécule antibactérienne. Bien que la formation de NO soit connue, l'effet bactéricide n'apparaissait qu'en conditions aérobies (Shanks *et al.*, 1962). Les auteurs de l'époque en ont donc conclu que le NO réagissait avec l'oxygène pour former un produit plus toxique.

Le fait que le NO soit produit *in vivo* dans un processus physiologique normal (Ignarro *et al.*, 1987 ; Palmer *et al.*, 1987) a conduit d'autres auteurs à rechercher son implication dans l'activité microbicide des macrophages, dépendante de la L-arginine (Hibbs *et al.*, 1988a ; Stuehr et Nathan, 1989). En effet, l'addition d'antioxydants n'empêche pas la destruction des tumeurs (Weinberg *et al.*, 1978), pas plus qu'une déficience en NADPH oxydase n'empêche les macrophages de tuer des protozoaires comme *Leishmania*, *Toxoplasma* ou *Plasmodium* (Pearson *et al.*, 1983 ; Kharazmi *et al.*, 1984 ; Sibley *et al.*, 1985). En 1990, Brune et Lapetina rapportaient que des macrophages traités à l'endotoxine synthétisaient des nitrites et des nitrates, et que l'effet cytotoxique des macrophages sur certaines cellules tumorales et sur *Cryptococcus* découlait d'un mécanisme dépendant de la L-arginine (Hibbs *et al.*, 1987b ; Granger *et al.*, 1988). Au même moment, la L-arginine était définie comme le précurseur de la synthèse du NO (Hibbs *et al.*, 1987a ; Iyengar *et al.*, 1987). Depuis lors, le NO produit par les cellules de l'immunité s'est montré capable, *in vitro* et *in vivo*, de tuer un grand nombre de microorganismes parmi les helminthes, les protozoaires, les levures, les mycobactéries, les bactéries et les virus. Chez les parasites, le NO exerce une activité cytotoxique contre des organismes extracellulaires comme *Shistosoma mansoni* (James et Glaven, 1989 ; Oliveira *et al.*, 1998 ; Hahn *et al.*, 2001), *Trypanosoma brucei sensus lato* (Vincendeau *et al.*, 1992 ; Millar *et al.*, 1999 ; Gobert *et al.*, 2000), mais aussi sur des parasites intracellulaires comme *Toxoplasma gondii* (Adams *et al.*, 1990 ; Miller *et al.*, 1999), *Plasmodium falciparum*

(Taylor-Robinson *et al.*, 1994 ; Balmer *et al.*, 2000) et différentes espèces de *Leishmania* (Green *et al.*, 1990 ; Liew *et al.*, 1991 ; Lemesre *et al.*, 1997 ; Mossalayi *et al.*, 1999).

3.3 – La régulation de la production de NO.

Il existe un revers à l'aspect de molécule microbicide majeure, car si le NO est produit de manière excessive, il est toxique pour les parasites infectieux mais le devient aussi pour les propres cellules de l'hôte infecté. La régulation de la production de NO est donc capitale et peut s'exercer à deux niveaux, l'expression de la NOS II et son activité. Le premier facteur limitant qui va intervenir dans la régulation de la production de NO est la concentration en L-arginine disponible, qui indirectement, va réguler la balance Th1/Th2 par l'équilibre entre la voie de la NOS II (destruction des leishmanies) et la voie de l'arginase (survie et développement des parasites). Un certain nombre de molécules peuvent induire l'expression du gène de la NOS II, comme les oxydants (Duval *et al.*, 1996), le glutathion (Stuehr *et al.*, 1990), l'interféron γ (Mattner *et al.*, 2000), ou le lipopolysaccharide (Panaro *et al.*, 1999), le TNF- α (Nashleas *et al.*, 1998). D'autres facteurs, dont la prostaglandine E2, l'IL-10 (Brandonisio *et al.*, 2001), le PDGF (Platelet-derived growth factor) (Kunz *et al.*, 1997), l'AMP cyclique (Mauel *et al.*, 1995), et le TGF- β (Rodrigues *et al.*, 1998), inhibent la transcription du gène de la NOS II. En plus d'une régulation de l'expression du gène de la NOS II, il existe un bon nombre de molécules qui vont agir directement sur l'activité de l'enzyme. L'oxygène O₂ est également un substrat de la NOS II qui va pouvoir augmenter son activité, de même que les cofacteurs comme le NADPH ou la tetrahydrobiopterine (Moncada *et al.*, 1991 ; Gotoh *et al.*, 1996 ; Alderton *et al.*, 2001). Le fructose-1,6-diphosphate et le glutathion vont stimuler la NOS II et empêcher sa régulation négative par le NO lui-même en formant des nitrosothiols (Mihás *et al.*, 1997 ; Tirmenstein *et al.*, 2000). Les méthylarginines et l'arginase vont, au contraire, réduire ou inhiber l'activité de la NOS II (Leiper et Vallance, 1999 ; Boucher *et al.*, 1999).

Les exemples précédents mettent en évidence la complexité de la biochimie du NO et la diversité des facteurs qui peuvent intervenir dans sa régulation. Dans le cas de l'infection leishmanienne, le parasite met en place des stratégies visant à favoriser l'action des facteurs régulant négativement la production de NO. Des molécules parasitaires, comme les GIPLs ou le LPG vont inhiber l'expression de la NOS II ou son activité (Proudfoot *et al.*, 1996 ; Bogdan et Rölinghoff, 1998, Balestieri *et al.*, 2002), ainsi que la production de cytokines activatrices et favoriser l'expression de cytokines désactivatrices du macrophage (Barral *et al.*, 1993 ;

Bogdan et Nathan, 1993 ; Stenger *et al.*, 1994 ; Carrera *et al.*, 1996 ; Sartori *et al.*, 1997 ; Rodrigues *et al.*, 1998).

3.4 – Les mécanismes cellulaires de la cytotoxicité du NO.

Le NO est souvent est souvent dénommé « arme à double tranchant » pour évoquer ses fonctions biphasiques sur de nombreuses fonctions biologiques. Cette dualité est particulièrement marquée en ce qui concerne la mort cellulaire, puisque le NO est capable d'induire les deux grands types de mort cellulaire que sont la nécrose et l'apoptose (Melino *et al.*, 1997). En outre, de nombreux travaux ont été consacrés à l'analyse des conséquences de l'exposition de cellules eucaryotes au NO sur leur mort cellulaire programmée et ont rapporté des résultats divergents, le NO activant les voies conduisant à l'entrée des cellules en apoptose ou au contraire les protégeant de l'apoptose spontanée ou induite (Dimmeler et Zeiher, 1997 ; Nicotera *et al.*, 1997 ; Brüne *et al.*, 1998a, 1998b). Le fait qu'une cellule entre en nécrose ou en apoptose est régulé par l'intensité du signal qui lui est transmis. La nécrose prédomine en réponse à une exposition à de fortes concentrations de NO, lorsque le NO peut réagir avec l'anion superoxyde O_2^- pour former le peroxynitrite (ONOO⁻). Par contre, une exposition prolongée à de faibles doses de NO induit l'apoptose (Ankarcrona *et al.*, 1995).

La nécrose et l'apoptose représentent pour une cellule deux manières de mourir qui couvrent un large spectre de changements morphologiques et physiologiques (Steller, 1995). La nécrose cellulaire apparaît comme un processus dénué de régulation, passif, et déclenché par des stimuli non-physiologiques, incluant les agents chimiothérapeutiques. La nécrose ne nécessite aucune synthèse protéique ni d'acides nucléiques. L'analyse microscopique de cellules en nécrose montre un gonflement de la cellule et des organelles, une perte du contenu des lysosomes, la formation de microvésicules, une rupture précoce de la membrane cellulaire avec extrusion du contenu cytoplasmique, et lyse de la cellule. Ce type de réaction engendre généralement un processus inflammatoire, est suivi par le recrutement de macrophages qui vont phagocyter les débris cellulaires générés. D'un autre côté, l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus hautement régulé qui requiert de l'énergie pour synthétiser les protéines effectrices et s'activer (Hengartner, 2000). Les caractéristiques ultrastructurales d'une cellule en apoptose sont une diminution du volume cellulaire, la condensation du cytoplasme et de la chromatine, une imperméabilisation de la membrane plasmique, et une fragmentation de la cellule en corps apoptotiques. Ces derniers seront éliminés par phagocytose par les cellules adjacentes sans créer de dommages inflammatoires aux cellules

environnantes. Sur le plan moléculaire, l'apoptose induite le flip-flop des résidus phosphatidyl-sérine vers la face externe de la membrane plasmique. La caractéristique moléculaire la plus marquante étant la fragmentation de l'ADN en segments oligonucléosomiques pouvant être visualisés comme une échelle de bandes lors d'une électrophorèse sur gel.

Plusieurs types cellulaires sont capables d'entrer en apoptose lorsqu'ils sont soumis à des stimuli conduisant à la production de NO, comme l'endotoxine, les cytokines, en particulier l'interféron γ , et/ou les facteurs de croissance. Par exemple, l'apoptose induite par le NO se produit aussi bien dans les macrophages humains et murins (Albina *et al.*, 1993 ; Messmer *et al.*, 1996) que dans les cellules tumorales (Xie *et al.*, 1997) et d'autres types cellulaires (Brüne, 1998 ; Bosca et Hortelano, 1999 ; Kim *et al.*, 2001). Un certain nombre d'études a également montré que des cellules tumorales co-cultivées avec des cellules produisant du NO, comme les macrophages, sont capables d'entrer en apoptose, mettant en évidence un processus important de l'activité cytotoxique des macrophages (Albina *et al.*, 1998). Ce phénomène est important car il suggère que non seulement les cellules produisant du NO qui peuvent entrer en apoptose par son biais, mais aussi que le NO peut diffuser librement à travers les membranes cellulaires pour affecter les cellules voisines (Lancaster *et al.*, 1996). Dans cette optique, un certain nombre d'études ont montré que l'addition de NO exogène, sous forme de solution saturée en NO ou de donneurs de NO, pouvait induire l'apoptose de différents types cellulaires (Fortenberry *et al.*, 1998 ; Messmer *et al.*, 1996 ; Nomura *et al.*, 1996 ; Xie *et al.*, 1997 ; Estevez *et al.*, 1999). Chez les eucaryotes unicellulaires l'existence d'un processus de mort cellulaire programmée « ancestral » est de plus en plus admis (Cornillon *et al.*, 1994 ; DosReis et Barcinski, 2001). Parmi les kinétoplastidés, le phénomène d'apoptose a déjà été décrit sur les formes épimastigotes et trypomastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Ameisen *et al.*, 1995 ; Billaut-Mulot *et al.*, 1996), chez *Plasmodium falciparum* (Picot *et al.*, 1997), sur les formes procycliques de *Trypanosoma brucei brucei* et *T. b. rhodesiense* (Welburn *et al.*, 1998, 1999). L'apoptose chez *Leishmania* a été mise en évidence tout d'abord sur des formes promastigotes ayant subi un choc thermique (Moreira *et al.*, 1996). Ces deux dernières années, différents travaux ont argumentés en faveur de l'existence d'un processus de mort cellulaire programmée ayant les caractéristiques phénotypiques de l'apoptose observées chez les eucaryotes supérieurs (Mittra *et al.*, 2000 ; Das *et al.*, 2001 ; Arnoult *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2002 ; Mukherjee *et al.*, 2002 ; Zangger *et al.*, 2002). La position intramacrophagique obligatoire de la forme amastigote du

parasite suggère l'hypothèse qu'un contact avec le NO, ou encore avec des drogues antileishmaniennes, pourrait conduire à un phénomène d'apoptose.

3.5 – Les cibles moléculaires du NO.

Bien que certaines cibles cellulaires du NO soient connues, les cibles microbiennes impliquées dans la mort cellulaire des microorganismes sont encore inconnues actuellement. Le NO sous forme radicalaire réagit principalement avec l'anion superoxyde (O_2^-), les métaux et les thiols. La réaction du NO avec l'anion superoxyde produit le peroxynitrite ($OONO^-$), une molécule très toxique et très réactive, ayant le potentiel d'oxyder de nombreuses cibles cellulaires. Les réactions du NO avec les atomes de fer intracellulaires ou les centres fer-soufre peuvent conduire à l'inactivation d'enzymes essentielles (dont la ribonucléotide réductase, l'aconitase, et l'ubiquinone réductase), à augmenter la disponibilité initiale du fer II (Fe^{2+}) pour étendre les dommages oxydatifs, et éventuellement peuvent dépler les réserves de fer cellulaires. Les réactions avec les thiols peuvent altérer des fonctions protéiques et catalyser la formation de ponts disulfures et d'autres modifications physico-chimiques. Le NO peut aussi réagir directement avec l'ADN, pouvant créer une désamination ou des *cross-linking*.

Les **hydrogénases** sont les premières cibles moléculaires du NO qui aient été décrites. Ce sont des enzymes importantes pour la photosynthèse et présentes chez de nombreux microbes. Leur inhibition par le NO est réversible à de faibles concentrations mais définitive à de fortes concentrations (Krasna et Rittenberg, 1954). Cette interaction a été découverte parce que le NO est connu pour se complexer au fer (Sidgwick, 1950) et que les hydrogénases contiennent des centres fer (Hoberman et Rittenberg, 1943). D'autres études ont montré que le NO réagit directement avec le centre fer-soufre de cette enzyme (Hyman et Arp, 1991). Plusieurs enzymes contiennent des centres fer-soufre, et on peut donc s'attendre à ce qu'elles soient sensibles à l'action du NO.

L'**aconitase** possède une double fonction au niveau cellulaire. Tout d'abord, elle intervient au niveau du cycle de Krebs en transformant le citrate en isocitrate. Elle intervient aussi dans la régulation du fer au sein de la cellule. Son rôle comme IRP (Iron Regulatory Protein) se situe dans le contrôle de la traduction de l'ARN messager (ARNm), ou en bloquant la dégradation de diverses protéines impliquées dans l'homéostasie du fer (Beinert et Kennedy, 1993). Le NO inhibe l'activité aconitase (Drapier et Hibbs, 1988) et contrôle l'activité des IRP (Weiss *et al.*, 1993). L'inhibition de l'activité aconitase a été mise en

évidence également chez des leishmanies traitées au NO (Lemesre *et al.*, 1997 ; Mauel et Ransijn, 1997) ; cela suggère qu'il existe un parallèle entre les mécanismes de cytotoxicité du NO à l'égard des cellules tumorales et ceux conduisant à l'éradication des protozoaires. Il est intéressant de constater que des cellules traitées au NO perdent aussi bien leur activité aconitase que la totalité de leurs réserves de fer (Hibbs *et al.*, 1988a). D'après les premières observations sur la nécessité de conditions aérobies pour que les nitrites inhibent les bactéries (Shanks *et al.*, 1962), le NO doit réagir avec l'anion superoxyde pour former le peroxynitrite avant de pouvoir inhiber l'aconitase (Castro *et al.*, 1994 ; Hausladen et Fridovich, 1994). En outre, l'action des peroxynitrites sur l'aconitase a pour conséquence directe d'augmenter sa sensibilité à la dégradation par le complexe multicatalytique du protéasome (Grune *et al.*, 1998). Le NO et le peroxynitrite affectent d'autres enzymes mitochondriales, comme la **superoxyde dismutase à manganèse** MnSOD, ce qui a pour effet d'augmenter la concentration de O_2^- dans la matrice mitochondriale et donc de favoriser une boucle d'amplification pour la production de peroxynitrite, d'où l'initiation de dommages mitochondriaux. Le NO et/ou le peroxynitrite peuvent alors inactiver irréversiblement les enzymes de la chaîne respiratoire (complexes I, II et III) qui contiennent des groupements Fe-S (Lizasoain *et al.*, 1996).

Le NO inactive également la **glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase** (GAPDH) en provoquant sa S-nitrosylation, ce qui résulte en une inhibition de la glycolyse et finalement un abaissement de la synthèse d'ATP. Cette altération du métabolisme énergétique cellulaire retentirait sur l'efficacité des pompes calciques, les calcium ATPases de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique, conduisant à une augmentation importante de la concentration de calcium libre ionisé intracytoplasmique. Chez *Leishmania*, une inhibition de la GAPDH a été observée sur des parasites traités avec des donneurs de NO (Mauel et Ransijn, 1997).

Les **cytochrome oxydases**. Yarbrough et ses collègues ont montré, en 1980, que l'incorporation de proline chez *Escherichia coli* était inhibée par les nitrites. Ils ont suggéré que l'effet soit dû à une interférence avec la chaîne du cytochrome. On sait maintenant que les complexes I et II de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie sont inhibés lors d'une coculture de macrophages activés et de cellules tumorales (Granger et Lehninger, 1982 ; Drapier et Hibbs, 1988). C'est la production de NO par les macrophages qui est responsable de cet effet (Hibbs *et al.*, 1988a ; Stuehr et Nathan, 1989).

La **ribonucléotide réductase** joue un rôle clé dans la synthèse d'ADN. Lorsque des cellules tumorales sont cocultivées avec des macrophages activés, la synthèse d'ADN peut

diminuer sans qu'il n'y ait mort des cellules. L'addition NO sur les cellules provoque l'inhibition de la synthèse d'ADN et de l'activité ribonucléotide réductase (Hibbs *et al.*, 1988a ; Stuehr et Nathan, 1989). Cette enzyme catalyse la réduction de nucléosides diphosphates de façon limitante pour la synthèse d'ADN. Le site actif de l'enzyme contient de nombreux groupements sulphydryles, un radical tyrosyl et un noyau fer qui sont trois cibles potentielles du NO (Elledge *et al.*, 1982). Le NO agirait en détruisant le radical tyrosyl et en réagissant avec les groupements sulphydryles de l'enzyme (Lepoivre *et al.*, 1991, 1992). L'inhibition de cette enzyme serait à l'origine de l'effet cytostatique du NO sur *Trypanosoma brucei gambiense* et *T. b. brucei* (Vincendeau *et al.*, 1992). A de faibles concentrations, par contre, le NO pourrait être important pour la synthèse d'ADN, et donc la division cellulaire (Efron *et al.*, 1991), peut-être en activant la **guanylate cyclase** (Ziche *et al.*, 1993). Cela pourrait être également vrai pour des organismes infectieux puisqu'Ovington et ses collègues ont trouvé en 1995 que l'inhibition de la synthèse de NO, par adjonction d'un analogue de la L-arginine, diminuait la production d'oocystes chez les espèces du genre *Eimeria*. Le NO et le peroxy-nitrite causent des cassures doubles ou simples brins de l'ADN, conduisant à l'activation de la **poly(ADP-ribose) polymérase** ou **PARP** (Zhang *et al.*, 1993). La PARP est une protéine nucléaire qui lie l'ADN et participe au mécanisme d'excision de bases/réparation de l'ADN. L'invalidation du gène de la PARP rend les souris résistantes à l'ischémie cérébrale via l'inhibition de la NOS II, soulignant le rôle délétère de NO dans ce système (Eliasson *et al.*, 1997). Une fois activée, la PARP catalyse le transfert de groupes ADP-ribose du NAD⁺ sur diverses protéines nucléaires incluant la PARP elle-même. Ceci entraîne une consommation du NAD⁺ dont la resynthèse conduit à un épuisement du pool d'ATP et à un déficit de l'énergie de la cellule.

Le **cytochrome P450** est un terme générique désignant un groupe particulier de protéines à noyau hème (Wrighton et Stevens, 1992). Elles sont principalement localisées dans les microsomes du foie et sont responsables de la catalyse oxydative des molécules endogènes et des agents thérapeutiques. Comme ces enzymes contiennent un noyau hème, elles fixent le NO. Des donneurs de NO ainsi que le NO dérivé de cellules activées, réduisent son activité enzymatique (Wink *et al.*, 1993). On sait que *Plasmodium falciparum* contient un cytochrome P450, mais il n'existe pas encore de données sur les effets de son inhibition par le NO.

L'**aldolase** est une enzyme qui transforme le fructose-1,6-diphosphate en dihydroxyacétone phosphate et glycéraldéhyde-3-phosphate. Le NO inhibe cette enzyme (Shanks *et al.*, 1962) et chez les mammifères, cela pourrait avoir des implications dans le

dérèglement du métabolisme des sucres observé dans les maladies systémiques, au cours desquelles les taux de cytokines induisant le NO sont augmentés.

Il a été montré récemment que le NO affecte l'activité du **protéasome 26S**, un complexe de protéases chargé de dégrader les protéines préalablement ubiquitinylées. L'accumulation de p53 dans des macrophages murins en réponse au NO, soit généré chimiquement, soit provenant de l'activation d'une NOS II endogène, résulte d'une inhibition par le NO du protéasome. Différents donneurs de NO sont capables d'inhiber *in vitro* la dégradation ATP-dépendante par le protéasome 26S de p53 polyubiquitinylée, impliquant que l'induction d'une apoptose par le NO et l'accumulation de p53 sont médiées en partie par l'inhibition du protéasome (Glockzin *et al.*, 1999). L'effet résultant du NO, via le protéasome, dépendrait en fait de la balance de dégradation entre les protéines pro- et anti-apoptotiques qui pourrait varier suivant le type cellulaire.

Le NO peut réagir avec les **groupes sulphydryls** (-SH) pour former des groupements stables appelés nitrosothiols par S-nitrosylation. Ceux-ci peuvent réagir avec d'autres groupements -SH pour former des ponts disulfures qui entraînent le relargage du NO (Mirna et Hofmann, 1969). La première conséquence serait de consommer les systèmes antioxydants de la cellule. Une autre conséquence serait la régulation d'une activité protéique, comme celle du récepteur neuronal de l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) (Lipton *et al.*, 1993). L'effet toxique des nitrosothiols a été démontré pour des souches de *Salmonella*, *Streptococcus faecium*, *Clostridium sporogenes* (Incze *et al.*, 1974), sur la forme asexuée sanguine de *Plasmodium* (Rockett *et al.*, 1991), et chez les trypanosomes africains (Mnaimneh *et al.*, 1997). Les groupements sulphydryls intracellulaires (O'Leary et Solberg, 1976) autant que membranaires (Riha et Solberg, 1971) peuvent être la cible du NO, conduisant à des effets cytostatique et cytotoxique sur les bactéries, mais aussi sur des parasites, notamment *Leishmania* (Lemesre *et al.*, 1997). Les réactions du NO avec les groupements -SH peuvent conduire à l'inactivation d'enzymes portant des thiols au niveau de leur site catalytique. Par exemple, le NO inhibe directement l'activité des **caspases** et ceci constitue très vraisemblablement un des mécanismes majeurs de son action anti-apoptotique chez les eucaryotes supérieurs. Il a tout d'abord été établi que du NO « chimique » diminuait sensiblement l'activité enzymatique de différentes caspases testées (Li *et al.*, 1997) et plusieurs études ont établi que l'exposition au NO de caspases purifiées ou recombinantes conduisait à leur inactivation (Haendeler *et al.*, 1997 ; Kim *et al.*, 1997 ; Mohr *et al.*, 1997 ; Tzeng *et al.*, 1998 ; Li *et al.*, 1999). Cette action du NO est réversible par le DTT et due très probablement à sa capacité à réagir sur la cystéine présente dans le site actif de l'enzyme par

S-nitrosylation, comme l'ont montré des expériences effectuées avec le NO, ou ses congénères redox tels que NO⁺, sur des sous-unités isolées de la caspase 3 (Haendeler *et al.*, 1997). Un autre mécanisme possible d'inactivation impliquerait l'oxydation de ces caspases (Kim *et al.*, 1997 ; Mohr *et al.*, 1997). D'autres protéases à cystéines peuvent être inhibée par le NO, et notamment des **cystéine-protéases parasitaires** qui sont essentielles au développement de *Leishmania* chez son hôte (Salvati *et al.*, 2001).

En fait, peu d'informations précises existent sur l'importance relative des différentes manières par lesquelles le NO peut tuer les parasites. Les voies biochimiques impliquées sont nombreuses et variées. A de faibles doses, le NO peut même stimuler la croissance des parasites, en activant la voie de l'arginase et la biosynthèse des polyamines (Coons *et al.*, 1990, Iniesta *et al.*, 2001, 2002), bien que ce phénomène soit réversé à haute dose. Les autres mécanismes touchés incluent la respiration et les processus nécessitant de l'énergie, le métabolisme des drogues, les voies antioxydantes (par consommation de groupes -SH), des altérations de l'ADN (dont certaines mutations non-léthales) et des dommages protéiques (autres qu'enzymatiques) via des réactions de S-nitrosylation.

3.6 – Les donneurs de NO utilisés en thérapeutique anti-leishmanienne.

Le caractère radicalaire du NO lui permet de diffuser rapidement à travers les tissus. L'idée est alors venue à certains chercheurs d'expérimenter des pommades contenant des donneurs de NO, appliquées directement sur les lésions de leishmanioses cutanées. L'intérêt est de pouvoir développer un traitement efficace et peu onéreux. Le premier essai de ce type est très récent puisqu'il date de 1997, et concerne l'utilisation réussie de glycéryl trinitrate en application cutanée chez un jeune patient atteint leishmaniose cutanée (Zeina *et al.*, 1997). D'autres équipes ont réalisé des essais avec des donneurs de NO différents comme le S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) (Lopez-Jaramillo *et al.*, 1998) ou des pommades à base de nitrite acidifié par de l'acide ascorbique ou salicylique (Davidson *et al.*, 2000). Les résultats de ces études sont parfois modestes mais ouvrent néanmoins la voie à de nouvelles formes de thérapies antileishmaniennes. D'autre part, si les traitements directs par le NO n'atteignent pas l'efficacité escomptée, des essais d'inhibition de la voie antagoniste, c'est à dire l'arginase, pourraient être envisagés.

IV – Objectifs du travail.

Dans le cas des leishmanioses, la position intramacrophagique obligatoire du parasite chez l'hôte mammifère infecté représente un exemple d'adaptation intracellulaire tout à fait étonnant. Cependant, elle rend d'autant plus difficile la mise au point de nouveaux traitements, l'étude de l'action des molécules effectrices de l'immunité ou de nouveaux médicaments sur le pathogène, ou la détermination des facteurs parasitaires qui modulent la réponse immune de l'hôte.

Durant ces dernières années, le laboratoire a concentré ses efforts sur l'obtention d'un système alternatif à l'expérimentation animale, consistant en la production continue, en conditions contrôlées, du stade intracellulaire de différentes espèces de leishmanies. La réalisation *in vitro* du cycle de développement parasitaire des leishmanies en conditions axéniques, nous a permis d'avoir accès à des formes amastigotes extracellulaires de *Leishmania* qui présentent, en regard de divers critères (morphologiques, biologiques, biochimiques et immunologiques), des propriétés biologiques analogues à celles des formes amastigotes intramacrophagiques (Lemesre Brevet N° 6458581). Grâce à ce modèle, il nous a été possible d'étudier l'activité microbicide des molécules de l'immunité protectrice (monoxyde d'azote) et chimiothérapeutique (antimoine) directement sur le stade médicalement important des leishmanies.

Lorsque la pathologie est déclarée, le traitement basique de la leishmaniose consiste en l'administration de dérivés pentavalents (SbV) de l'antimoine (Glucantime®), qui seront réduits par la cellule-hôte en dérivés trivalents (SbIII) fortement actifs. La culture *in vitro* nous a permis de sélectionner par pression médicamenteuse des formes amastigotes chimiorésistantes à la pentamidine mais aussi à un dérivé trivalent (SbIII) de l'antimoine, l'antimonio tartrate de potassium. Nous nous sommes dans un premier temps intéressé au potentiel des drogues de seconde intention que sont la pentamidine et l'amphotéricine B, sur la destruction de ces parasites résistants. Ensuite, nous avons cherché à caractériser les modalités de transmission de telles souches chimiorésistantes, en étudiant en particulier les différents paramètres, comme la stabilité du phénotype chimiorésistant, l'adaptation des parasites à leur environnement ainsi que la compétition entre souches, capables d'être modulés au cours du cycle de développement parasitaire. Enfin, disposant de modèles sensible et résistant à la principale molécule chimiothérapeutique utilisée contre la

leishmaniose, nous avons tenté d'élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la cytotoxicité de cette dernière.

Dans le modèle expérimental murin comme chez le chien ou chez l'homme, le principal mécanisme de protection de l'hôte, infecté par des leishmanies, est une réponse immunitaire à médiation cellulaire en réponse à une activation antigénique. Sous l'influence de cytokines, les macrophages activés induisent la destruction des formes amastigotes intracellulaires par la voie de la NO synthase inductible (NOS-II). L'activation de cette dernière représente l'un des principaux mécanismes conduisant à l'élimination des formes amastigotes intramacrophagiques. Afin de déterminer les effets biologiques du NO conduisant à la mort des parasites, nous avons soumis des formes amastigotes de culture axénique de *Leishmania amazonensis*, à l'action de différents donneurs synthétiques de NO (*i.e.* nitrite de sodium acidifié, albumine nitrosylée et *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine). Nous avons, tout d'abord, déterminé les paramètres biologiques de l'effet délétère de ces composés sur les leishmanies. Afin d'approfondir cette étude, nous avons cherché à mettre en évidence des molécules parasitaires ciblées par le NO, qui pourraient jouer un rôle dans le mécanisme de mort cellulaire induit chez les amastigotes de *Leishmania*. L'étude de la mort cellulaire des leishmanies induite par le NO a également été réalisée au cours d'essais d'immunisation chez le chien, hôte réservoir naturel de la maladie.

Enfin, partant du modèle de chimiorésistance *in vitro* à l'antimoine, nous avons étudié les éventuelles interactions pouvant exister entre les dérivés de l'antimoine et le NO. En effet, au cours des chimiothérapies antileishmaniennes, les deux molécules doivent coexister et peuvent influencer l'une sur l'autre. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'existence d'une résistance croisée entre l'antimoine et le NO, pouvant favoriser la sélection de formes amastigotes résistantes au NO. Un tel phénomène conduirait à l'émergence dans la nature de souches de leishmanies dont le contrôle s'avèrerait extrêmement délicat. Néanmoins, elles seraient un modèle d'étude intéressant et original, qui permettrait d'analyser les composantes moléculaires intervenant dans les mécanismes de résistance aux molécules leishmanicides et d'arriver ainsi à une meilleure compréhension des interactions hôte-parasite au cours des leishmanioses. En outre, l'expression différentielle de certaines molécules chez les formes résistantes nous permettra peut-être de définir de nouvelles cibles thérapeutiques et nous ouvre des perspectives intéressantes d'études pharmacologiques sur de nouveaux principes actifs anti-leishmaniens.

TRAVAUX PERSONNELS

Article 1

Efficacité des médicaments de seconde intention sur des formes amastigotes de *Leishmania infantum* résistantes à l'antimoine (Accepté pour publication, *Acta Tropica*).

Le traitement classique des leishmanioses consiste en l'administration de stibogluconate de sodium (Pentostam[®]) ou d'antimoniote de méglumine (Glucantime[®]). Ces molécules composées d'antimoine pentavalent vont être réduites par les macrophages de l'hôte infecté en antimoniés trivalents, qui est la forme redox de l'antimoine réellement toxique pour les leishmanies. Malheureusement, la non-réponse au traitement, en particulier dans les cas de kala azar, de leishmaniose cutanéomuqueuse et cutanée diffuse (formes les plus sévères), devient un problème grave et récurrent dans beaucoup de zones d'endémie. En outre, l'émergence de souches de leishmanies chimiorésistantes est actuellement bien démontrée. Il est donc important de pouvoir étudier le potentiel des médicaments de seconde intention, comme la pentamidine et l'amphotéricine B, très utilisés chez les patients ne répondant pas à l'antimoine, contre des parasites chimiorésistants.

Principaux résultats :

① Nous avons induit une chimiorésistance à un dérivé trivalent de l'antimoine Sb(III), en exposant directement des formes amastigotes axéniques de *Leishmania infantum*, agent étiologique de la leishmaniose viscérale, à des concentrations croissantes d'antimonio tartrate de potassium. Nous avons ainsi sélectionné et stabilisé des formes amastigotes extracellulaires ayant des indices de résistance 12, 28, 35 et 44 fois supérieurs au clone parental sauvage.

② Nous montrons que les amastigotes extracellulaires de *L. infantum* résistants au Sb(III) présentent une résistance croisée au Glucantime[®] (Sb(V)) dans un modèle d'infections macrophagiques. Les indices parasitaires respectifs sont inférieurs à 10% pour le clone sauvage et de 40, 65, 75 et 80 % pour les clones résistants.

③ Les formes amastigotes axéniques de *L. infantum* résistantes à l'antimoine ne présentent pas de résistance croisée à l'amphotéricine B ni à la pentamidine. Les clones chimiorésistants

extracellulaires ont le même degré de sensibilité à l'amphotéricine B que le clone parental sauvage. Par contre et de manière intéressante, les clones chimiorésistants sont plus sensibles à la pentamidine que le parent sauvage.

④ En position intramacrophagique, les formes amastigotes de *L. infantum* résistantes à l'antimoine sont également plus sensibles à l'action de la pentamidine que le parent sauvage.

L'obtention de formes amastigotes de *L. infantum* résistantes à l'antimoine est un outil de choix à double titre. D'une part, elles offrent la possibilité d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'acquisition d'une chimiorésistance chez le stade parasitaire médicalement important, et notamment le rôle joué par la cellule hôte dans l'efficacité du principe actif. D'autre part, elles permettent de déterminer le potentiel leishmanicide d'autres médicaments utilisés dans les cas réfractaires aux dérivés stibiés, et surtout de manager la posologie à utiliser, évitant ainsi certains effets secondaires indésirables.

Efficacy of second line drugs on antimonyl-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*

D. Sereno, P. Holzmüller, J.L. Lemesre *

Laboratoire de Biologie Parasitaire, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 34 032 Montpellier Cedex 1, France

Received 6 April 1999; received in revised form 28 July 1999; accepted 17 August 1999

Abstract

In a previous paper we have demonstrated that the induction, by direct drug pressure, of a resistance to Sb(III) antimony at physiological concentration in the amastigote stage of the parasite, led to a high cross-resistance to Sb(V) species in the form of Glucantime. In this paper, further chemoresistant clones were characterized. Axenic amastigotes of *Leishmania infantum* were adapted to survive in culture medium containing 4, 20, 30 and 120 µg/ml of potassium antimonyl tartrate Sb(III). These mutants were 12, 28, 35 and 44-fold more resistant to Sb(III) than the parental wild-type clone. They were able to resist at concentrations of Glucantime Sb(V) as high as 160 µg/ml when growing in THP-1 cells. We have investigated the efficacy of second line drugs in clinical use (pentamidine and amphotericin B) on the antimony-resistant mutants. Amphotericin B was toxic for both wild-type and chemoresistant mutants at concentrations ranging from 0.05 to 0.15 µM. Pentamidine which is extensively used when the first course of antimonial pentavalent compounds is unsuccessful, was more toxic for all the chemoresistant organisms than for the wild-type clone. In the same way, chemoresistant amastigotes growing within THP-1 cells were more susceptible to pentamidine than the wild-type clone. Our results showed that the resistance of the mutants was restricted to the antimony containing drugs and did not lead to a cross-resistance against the other clinically relevant drugs. These results confirmed that these two drugs (pentamidine and amphotericin B) are good candidates to treat pentavalent antimonial unresponsiveness. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Leishmania*; Sb(III)-resistant amastigotes; Drug resistance; Second line drugs

1. Introduction

Leishmaniasis is a significant cause of morbidity and mortality in several countries of the world. A vertebrate host is infected with flagellated extracellular promastigote forms via the bite of a sandfly. Promastigotes rapidly transform into

nonflagellated amastigotes which divide actively within the mononuclear phagocytes of the vertebrate host. The basic treatment of the disease consists in the administration of sodium stibogluconate (Pentostam®), meglumine (Glucantime®), pentamidine or amphotericin B. Treatment failure, especially in kala-azar, mucosal leishmaniasis, and diffuse cutaneous leishmaniasis is becoming a common problem in many endemic areas. In

* Corresponding author.

Leishmania-human immunodeficiency virus coinfecting patients, the first course of antimonial pentavalent compounds is unsuccessful in more than 50% of patients (Alvar et al., 1997). Immunological, physiological, or pharmacological deficiencies in the host are possible explanations for variations in clinical response (Peters et al., 1990). But there is evidence that inherent lack of susceptibility and/or the development of resistance can also contribute to parasite unresponsiveness to drugs (Grogl et al., 1992; Faraut-Gambarelli et al., 1997). In case of treatment failure, second line agents such as pentamidine or amphotericin B are extensively used. In India pentamidine is the drug in use to treat antimony unresponsive patients (Jha, 1983; Jha et al., 1991). Amphotericin B which is an effective second line drug for Indian visceral leishmaniasis, is currently proposed as an alternative first-line treatment (Russo et al., 1996).

Since the mode of action of Sb(V) drugs in *Leishmania* is poorly understood, the development of resistant cell lines in vitro may facilitate studies of the basis of resistance. These studies have been mainly carried out with the promastigote form which is not the parasite stage exposed to drugs in patients. Implication of P-glycoproteins in drug resistance in *Leishmania* promastigotes is well documented (Ullman, 1995). P-glycoproteins are involved in the multidrug resistance phenotype (MDR) in mammals and the first homologue gene identified in *Leishmania* promastigotes was *ltpgpA* and the *Leishmania major* homologue (*lmpgpA*) (Ouellette et al., 1990; Callahan and Beverley, 1991). Implication of these genes in antimonite and arsenite resistance was investigated by gene transfection of sensitive *Leishmania* promastigotes (Papadopoulos et al., 1994). Beside this, little information is available on the antimony resistance of amastigote organisms. Implication of a mechanism which could confer multidrug resistance, in particular to drugs in clinical use, could be a serious problem in the chemotherapy of leishmaniasis, due to the low number of available second line drugs. In a previous paper we have characterized Sb(III) antimonial-resistant amastigotes of *L. infantum* cultivated under axenic conditions. Our previous work demonstrated that intracellular Sb(III)-resistant amastigotes were

highly resistant to Glucantime® Sb(V), depending on the initial level of Sb(III) induced resistance (Sereno et al., 1997). In this report, using other mutants with a higher resistance index, we have evaluated the chemosusceptibility of these new mutants to the two drugs used when the first course of antimonial pentavalent was unsuccessful. Our results showed that the antimonial resistance did not induce cross-resistance to the other drugs in clinical use and thus confirmed that these two drugs are good candidates to treat cases of pentavalent antimonial unresponsiveness. Interestingly, the induction of antimony resistance in amastigotes increased the susceptibility to pentamidine. These results are of importance for the management of drug unresponsiveness in leishmaniasis.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Glucantime® (batch No. 331-2), which does not contain *m*-chlorocresol as preservative, was supplied by Rhone Poulenc Special. Potassium antimonyl tartrate trihydrate, pentamidine isethionate and amphotericin B were purchased from SIGMA.

2.2. Parasites and cultures

A cloned line of *Leishmania infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263, clone 2) was used in all experiments. Axenically-grown amastigote forms of *L. infantum* were maintained at 37°C with 5% CO₂ by weekly subpassages in a cell-free medium called MAA/20 (medium for axenically-grown amastigotes) in 25 cm² flasks as previously described (Lemesre, 1994; Lemesre et al., 1997; Sereno and Lemesre, 1997a). From a starting inoculum of 5×10^5 amastigote forms/ml, cell density of about 5×10^7 parasites/ml was obtained on day 7. MAA/20 consisted of modified medium 199 (Gibco BRL) with Hanks' salts supplemented with 0.5% soya trypto-casein (Pasteur Diagnostics, Marne la Coquette, France), 0.01 mM bathocuproine disulphonic acid, 3 mM L-cys-

teine, 15 mM D-glucose, 5 mM L-glutamine, 4 mM NaHCO₃, 0.023 mM bovine hemin, 25 mM HEPES to a final pH of 6.5, and supplemented by 20% of pretested fetal calf serum (FCS). The population of axenically-grown amastigote forms appeared homogeneous, round to ovoid, aflagellated and immobile. We and other investigators have previously shown that axenically-grown amastigotes of different *Leishmania* species clearly resembled intracellular amastigotes with regard to their ultrastructural, biological, biochemical and immunological properties (Bates, 1992; Bates et al., 1992; Bates, 1993; Lemesre, 1994). Moreover, characterized extracellular amastigotes, like intracellular ones, differed from promastigotes in a variety of biochemical characteristics, including proteinase, ribonuclease, adenine deaminase, peroxidase, glucose catabolism, nucleic acid synthesis, dehydrogenase activities, nitric oxide and drug susceptibilities (Coombs et al., 1982; Hassan and Coombs, 1985; Coombs et al., 1986; Rainey et al., 1991; Lemesre, 1994; Lemesre et al., 1997; Sereno and Lemesre, 1997a,b Sereno and Lemesre, 1997c).

2.3. Selection of antimonyl Sb(III)-resistant amastigote forms

Cloned wild-type amastigote forms of *L. infantum* (designated as LdiWT) were adapted to survive in medium containing about 0.5 µg/ml potassium antimony tartrate (SbIII). The cultures were stabilized for several subcultures before increasing the drug level (1, 2, 4, 6, 10, 20, 30, 40 and 120 µg/ml). Axenically-grown amastigotes were subjected to stepwise increasing drug pressure until cell line resistant to 4, 20, 30 and 120 µg/ml potassium antimonyl tartrate trihydrate (designated as LdiR4, Ldi R20, LdiR30 and LdiR120, respectively) were established. The cell lines selected for further studies were then cultured in MAA 20% FCS medium containing 4, 20, 30 and 120 µM potassium antimonyl tartrate trihydrate, respectively. All amastigote populations (wild-type and Sb(III)-resistant clones) were subjected to similar in vitro culture subpassages.

2.4. Viability test

To estimate the IC₅₀ values, the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) micromethod described previously (Sereno and Lemesre, 1997c) was used throughout the experiments. Results were analyzed using the mathematical model previously described (Sereno and Lemesre, 1997a).

2.5. Drug efficacy assay in THP-1

The in vitro sensitivity of *L. infantum* in a human leukaemia monocyte cell line (THP-1 cells) was evaluated according to the method described by Gebre-Hiwot et al. (1992) with modification. Briefly, THP-1 cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS. THP-1 cells in the log-phase of growth were differentiated by incubation for 2 days in medium containing 20 ng/ml phorbol myristate acetate (PMA, Sigma), inducing the differentiation and causing cells to become adherent (Tsuchiya et al., 1982). THP-1 treated cells with PMA were washed and then infected with stationary-phase extracellular amastigotes in 16 chamber Lab Teck tissue culture slides (Nunc) at a parasites: host cell ratio of 3:1 at 37°C with 5% CO₂. After 2 h incubation, non-internalized parasites were removed. Serial dilutions of each drug were made in the RPMI medium supplemented with 10% FCS and were dispensed into the wells. Medium containing the drug was changed after 3 days. After 5 days of drug exposure, wells containing adherent differentiated THP-1 cells were washed. Cells were fixed with methanol and stained with Giemsa. In order to take into account the effect of drugs on the intracellular multiplication of amastigotes and on the percentage of infected macrophages, the parasitic index was calculated $PI = ((\text{the mean number of amastigotes per macrophages in treated wells} \times \text{percentage of infected macrophages in treated wells}) / (\text{the mean number of amastigotes per macrophages in untreated wells} \times \text{percentage of infected macrophages in untreated wells})) \times 100$. Each experiment was done in duplicate.

Table 1

IC₅₀ to potassium antimonyl tartrate, pentamidine and amphotericin B of both wild-type and Sb(III) antimonial-resistant amastigotes of *L. infantum* grown under axenic condition^a

	Potassium antimonyl tartrate Sb(III)		Amphotericin B		Pentamidine	
	IC ₅₀ (μg/ml)	IR	IC ₅₀ (μM)	IR	IC ₅₀ (μM)	IR
LdiWT	4.70 ± 2.40	1	0.10	1	2.85 ± 1.5	1
LdiR4	56.04 ± 17.7	12	0.10 ± 0.05	1	0.95 ± 0.2	0.33
LdiR20	135.33 ± 22.70	28	0.14 ± 0.02	1.4	0.67 ± 0.20	0.23
LdiR30	165.30 ± 21.90	35	0.10 ± 0.05	1	0.80 ± 0.15	0.28
LdiR120	206.00 ± 30.00	44	0.06 ± 0.02	0.6	0.31 ± 0.05	0.10

^a IR = IC₅₀ of the parasites after drug pressure/ IC₅₀ of the parasites before drug pressure. Value of one experiment in triplicate.

3. Results

3.1. Characterization of the Sb(III) antimonial-resistant amastigotes and susceptibility to pentavalent antimony

The induction of Sb(III) resistance by direct exposure of axenically-grown amastigotes of *L. infantum* to potassium antimonyl tartrate trihydrate results in the selection of extracellular amastigotes expressing IR of 12 for LdiR4, of 28 for LdiR20, of 35 for LdiR30 and of 44 for LdiR120 (Table 1). In a macrophage model, chemoresistant variants were highly resistant towards Glucantime®. After 5 days exposure to 160 μg/ml of Sb(V) the parasitic indexes of LdiR4, LdiR20, LdiR30 and LdiR120 amastigotes were 40, 65, 75 and 80%, respectively whereas that of the wild-type clone was less than 10% (Fig. 1). These results clearly demonstrate that the induction of a Sb(III)-antimony resistance by direct drug pressure on amastigotes led to a high degree of Glucantime® Sb(V) resistance.

3.2. Efficacy of clinically relevant drugs on the antimony-resistant axenic amastigotes

The profiles of cross-resistance to amphotericin B and pentamidine are summarized in Table 1. All the chemoresistant clones expressed a susceptibility to amphotericin B in the range of 0.05–0.15 μM like the wild-type clone. Surprisingly LdiR4, LdiR20, LdiR30 and LdiR120 were more susceptible to pentamidine than the parental wild-type clone. A concentration of 3 μM of pen-

tamidine killed approx. 50% of wild-type axenic amastigotes of *L. infantum*. Chemoresistant mutants showed an increased pentamidine susceptibility depending on the level of resistance induced as shown by the determination of indexes of resistance (0.33, 0.23, 0.28 and 0.10 for LdiR4, LdiR20, LdiR30 and LdiR120, respectively).

3.3. Efficacy of back-up/second line drugs on the antimony-resistant intramacrophagic amastigotes

Susceptibilities to pentamidine of THP-1 intracellular growing wild-type and chemoresistant mutants of *L. infantum* were ascertained. Pen-

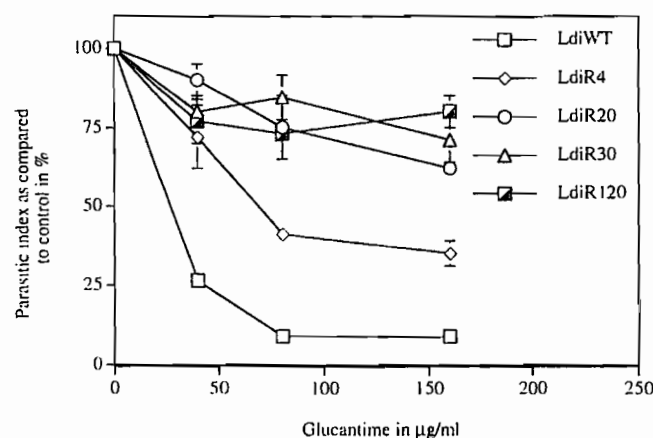


Fig. 1. Toxicity of Glucantime® against *L. infantum* wild-type and chemoresistant amastigotes in THP-1 cells. Hosts cells were infected with chemoresistant (LdiR4, LdiR20, LdiR30, LdiR120) or wild-type (LdiWT) amastigotes at a cell-parasites ratio of 1:3 in medium supplemented with 10% FCS after differentiation with PMA. Infected cells were exposed to drugs for 5 days. The parasitic index as compared to control was calculated. Results are the mean of duplicate experiments.

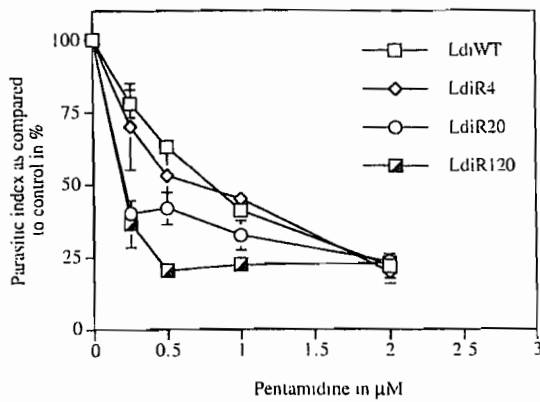


Fig. 2. Toxicity of Pentamidine against *L. infantum* amastigotes in THP-1 cells. Human cell lines were infected with wild-type (LdiWT) or chemoresistant (LdiR4, LdiR20, LdiR120) amastigotes at a cell-parasites ratio of 1:3 in medium supplemented with 10% FCS after differentiation with PMA. Infected cells were exposed to drugs for 5 days. The parasitic index as compared to control was calculated. Results are the mean of duplicate experiments.

tamidine was highly toxic for LdiR120 amastigotes with an IC_{50} value largely below 1 μ M and was less toxic for LdiWT clone (IC_{50} value of about 1 μ M) (Fig. 2). Chemoresistant mutants present an increased susceptibility to pentamidine which seems to be related to the level of antimony resistance induced.

4. Discussion

Since the amastigotes represent the clinically relevant stage of the parasite, analysis of drug efficacy or drug resistance studies must be carried out with this parasite stage. In a previous paper, we have shown that axenically-grown amastigotes could be a useful tool for the investigation of antileishmanial agents (Sereno and Lemesre, 1997a) and thus represented a powerful model to investigate drug activity of new compounds. It is also possible to evaluate the modulation of the resistance during the parasite developmental life cycle (Sereno and Lemesre, 1997b). Moreover, we have investigated the pentavalent antimony mode of action using axenically-grown amastigote of *L. infantum* (Sereno et al., 1998). The development of in vitro models of chemoresistance has greatly facilitated studies on the molecular basis of drug

resistance or drug susceptibility. Unfortunately, most of the mechanisms responsible for *Leishmania* drug resistance were characterized on the promastigote forms, mainly encountered in the insect vector (Ouellette and Papadopolou, 1993). Since the biochemical mechanisms that underly antimonial resistance in *Leishmania* field isolates are still poorly understood, the molecular and biochemical characterization of the Sb(III)-resistant amastigotes could greatly help in the understanding of the antimony resistance.

At concentration achieved in serum, 0.5–0.8 μ M (Waalkes and Devita, 1970), pentamidine has no or poor effect on wild-type axenic amastigote forms (IC_{50} value of $2.85 \pm 1.5 \mu$ M), but was toxic for wild-type amastigotes growing in THP-1 cells (IC_{50} value between 0.5 and 1 μ M). These results suggest a major role of macrophages in either metabolizing or concentrating the drug, as previously described (Berman et al., 1987). Surprisingly, pentamidine was significantly more active on chemoresistant axenically-grown amastigote forms than on wild-type ones (IC_{50} values ranging from 0.30 to 0.95 μ M for mutants and 2.85 μ M, respectively). As we have shown, a concentration of about 0.5–0.8 μ M was more toxic for LdiR120 chemoresistant axenic-amastigotes than for wild-type intracellular amastigotes, thus confirming the higher inherent sensitivity of the antimony-resistant mutant to pentamidine. In the same way a concentration of 0.25 μ M pentamidine was more toxic for LdiR20 than for LdiWT intracellular amastigotes. The observation that pentamidine had a better therapeutic index against antimony-resistant mutants than against the wild-type one is of great interest since pentamidine was considered as a very effective back-up drug for the treatment of pentavalent antimonial-resistant cases of kala-azar (Jha, 1983).

Chemoresistant or wild-type axenic amastigotes were found to be highly susceptible to amphotericin B. These results were in agreement with those obtained in a macrophage model (Berman and Wyler, 1981). Interestingly this drug, which was used to treat Pentostam[®] unresponsiveness, was highly potent against both extracellular antimony-resistant or wild-type amastigote forms at concentration below the maximal concentration achieved in serum (Atkinson and Benett, 1978).

The emergence of parasite resistance to antimonial could explain relapses in some patients after glucantime treatment (Faraut-Gambarelli et al., 1997). However, the resistance induced in these mutants does not reduce the susceptibility of the parasite to the main second line drugs in clinical use. These results suggest that P-glycoprotein analogues were not involved in the antimony-resistance of amastigotes and all the resistant clones like the wild-type one did not show immunoreactivity neither to the monoclonal antibody C219 nor to the JSB1 (data not shown). Both antibodies were directed against highly conserved, but distinct epitopes located in the cytoplasmic domain of the P-glycoprotein molecule.

A better understanding of the molecular and biochemical basis of the antimony-resistance of amastigotes could gain insight on the relation between parasite resistance and treatment failure.

References

- Alvar, J.C., Canavate, B., Gutierrez-Solar, M., et al., 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfections: the first 10 years. Clin. Microbiol. Rev. 10, 298–319.
- Atkinson, A.J., Bennett, J.E., 1978. Amphotericin B pharmacokinetics in humans. Antimicrob. Agents Chemother. 1, 271–276.
- Bates, P.A., 1992. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. Parasitology 108, 1–9.
- Bates, P.A., Robertson, C.D., Tetley, L., et al., 1992. Cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. Parasitology 105, 193–202.
- Bates, P.A., 1993. Axenic culture of *Leishmania* amastigotes. Parasitol. Today 9, 143–146.
- Berman, J.D., Wyler, D.J., 1981. An in vitro model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. J. Infect. Dis. 142, 83–86.
- Berman, J.D., Gallalee, J.V., Hansen, B.D., 1987. *Leishmania mexicana*: uptake of sodium stibogluconate (Pentostam) and pentamidine by parasite and macrophages. Exp. Parasitol. 64, 127–131.
- Callahan, H.L., Beverley, S.M., 1991. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. J. Biol. Chem. 266, 18424–18430.
- Coombs, G.H., Craft, J.A., Hart, D.T., 1982. A comparative study of *Leishmania mexicana* amastigotes and promastigotes. Enzyme activities and subcellular locations. Mol. Biochem. Parasitol. 5, 199–211.
- Coombs, G.H., Tetley, L., Moss, V.A., et al., 1986. Three-dimensional structure of the *Leishmania* amastigote as revealed by computer-aided reconstruction from serial sections. Parasitology 92, 13–23.
- Faraut-Gambarelli, F., Piarroux, R., Deniau, M., et al., 1997. In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 827–830.
- Gebre-Hiwot, A., Tadesse, G., Croft, S.L., et al., 1992. An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukemia monocyte cell line, THP-1. Acta Trop. 51, 237–245.
- Grogl, M., Thomason, T.N., Franke, E., 1992. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 47, 117–126.
- Hassan, H.F., Coombs, G.H., 1985. *Leishmania mexicana*, purine metabolizing enzymes of amastigotes and promastigotes. Exp. Parasitol. 59, 15–28.
- Jha, T.K., 1983. Evaluation of diamidine compounds (pentamidine isethionate) in the treatment of resistant cases of kala-azar occurring in north Bihar, India. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 77, 167–170.
- Jha, S.N., Singh, N.P.K., Jha, T.K., 1991. Changing responses to diamidine compounds in cases of visceral leishmaniasis unresponsive to antimonials. J. Assoc. Physicians India 39, 314–316.
- Lemesre, J.L., 1994. Methods for the culture in vitro of different stages of tissue parasites. International publication No. WO 94/26899.
- Lemesre, J.L., Sereno, D., Daulouede, S., et al., 1997. *Leishmania* spp: Nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically-grown amastigote forms. Exp. Parasitol. 86, 58–68.
- Ouellette, M., Papadopolou, B., 1993. Mechanism of drug resistance in *Leishmania*. Parasitol. Today 9, 150–153.
- Ouellette, M., Fase-Fowler, F., Borst, P., 1990. The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. EMBO J. 9, 195–291.
- Papadopolou, B., Roy, G., Dey, S., et al., 1994. Contribution of the *Leishmania* P-glycoprotein-related gene ItpgpA to oxyanion resistance. J. Biol. Chem. 269, 11980–11986.
- Peters, B.S., Fish, D., Golden, R., et al., 1990. Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical feature and response to therapy. Quat. J. Med. 77, 1101–1111.
- Rainey, P.M., Spithill, T.W., McMahon-Pratt, D., et al., 1991. Biochemical and molecular characterization of *Leishmania pifanoi* amastigotes in continuous axenic culture. Mol. Biochem. Parasitol. 49, 111–118.
- Russo, R., Lanotte, G., Serres, E., et al., 1996. Visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: treatment with high dose liposomal amphotericin B (Ambisome). J. Infect. 32, 133–137.
- Sereno, D., Lemesre, J.L., 1997a. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 972–976.
- Sereno, D., Lemesre, J.L., 1997b. In vitro life cycle of pentamidine-resistant amastigotes: stability of the chemoresis-

- tant phenotypes is dependent on the level of resistance induced. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1898–1903.
- Sereno, D., Lemesre, J.L., 1997c. Use of an enzymatic in vitro micromethod to quantify amastigote stage of axenically-grown amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Res.* 83, 401–403.
- Sereno, D., Michon, P., Brajon, N., et al., 1997. Phenotypic characterization of *Leishmania mexicana* pentamidine-resistant promastigotes: modulation of the resistance during developmental life cycle. *CR Acad. Sci.* 320, 981–987.
- Sereno, D., Cavaleyra, M., Zemzoumi, K., et al., 1998. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 3097–3102.
- Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., et al., 1982. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by phorbol diester. *Cancer Res.* 42, 1530–1536.
- Ullman, B., 1995. Multidrug resistance and P-glycoproteins in parasitic protozoa. *J. Bioenergetics Biomemb.* 27, 77–84.
- Waalkes, T.P., Devita, V.T., 1970. The determination of pentamidine (4-4'diaminodinophenoxypentane) in plasma, urine and tissues. *J. Lab. Clin. Med.* 75, 871–878.

Article 2

Etudes expérimentales sur l'évolution du phénotype de résistance à l'antimoine au cours du cycle de développement parasitaire *in vitro* de *Leishmania infantum* : implications dans la dissémination de la chimiorésistance en zone endémique (Accepté pour publication, *Acta Tropica*).

Les problèmes rencontrés lors des traitements de patients atteints de leishmaniose peuvent être liés soit à une faible chimiosensibilité du stade parasitaire présent chez l'hôte, soit à des phénomènes de chimiorésistance. Ces hypothèses mettent l'accent sur le problème des thérapies mal conduites, pouvant induire un fort degré de chimiorésistance chez les parasites, et donc avoir des répercussions dramatiques sur la propagation de telles souches dans la nature. La sélection au laboratoire, par pression médicamenteuse *in vitro*, de formes amastigotes chimiorésistantes à l'antimonio tartrate de potassium (dérivé trivalent de l'antimoine) et la possibilité de reproduire *in vitro* le cycle biologique des leishmanies, nous a permis de cerner certaines modalités de transmission des phénotypes chimiorésistants au cours du cycle de développement parasitaire.

Principaux résultats :

① L'acquisition d'indices de résistance à l'antimonio tartrate de potassium de 12, 28, 35 et 44 fois celui du clone parental sauvage par les formes amastigotes de *L. infantum* résistantes à l'antimoine, n'affecte pas leur taux de croissance, ni leur infectivité *in vitro* à l'égard de macrophages.

② Par contre, les clones résistants aux dérivés trivalents de l'antimoine sont devenus résistants à des concentrations atteignant 160 µg/ml d'antimoine pentavalent (Glucantime®) lorsqu'ils sont en situation intramacrophagique. Ce résultat renforce l'hypothèse de réduction des antimoniés pentavalents en trivalents par la cellule hôte.

③ Le caractère chimiorésistant des formes amastigotes de *L. infantum* peut être considéré comme relativement stable dans le temps. Les CI₅₀ (Concentration Inhibitrice 50 pour laquelle

le principe actif tue 50% des microorganismes) des clones chimiorésistants diminue après 3 mois de culture en absence de drogue mais leurs indices de résistance restent 2, 8, 19 et 23 fois supérieurs à celui du clone parental sauvage.

④ Le processus de différenciation en formes promastigotes *in vitro* est plus long pour les clones chimiorésistants (7-8 jours) que pour le parent sauvage (4 jours).

⑤ Le phénotype de résistance à l'antimoine est maintenu au cours du cycle de développement parasitaire *in vitro*. Les formes amastigotes résistantes au Sb(III) conservent leurs indices de résistance après 2 cycles de différenciation amastigote-promastigote-amastigote, en culture axénique mais aussi dans des macrophages traités avec 160 µg/ml de Glucantime®.

⑥ Lorsque les formes amastigotes chimiorésistantes sont mélangées avec le clone parental sauvage dans des rapports 50/50, 90/10 et 10/90, elles disparaissent au profit du parent sauvage après 2 cycles de développement parasitaire *in vitro*.

L'acquisition d'une chimiorésistance chez les formes amastigotes de *L. infantum* semble être un phénomène stable, certainement supporté par un contrôle génétique fort. Cependant, il est rassurant de constater que le coût de cette chimiorésistance est important, puisqu'en cas de compétition avec une souche sauvage, seule cette dernière semble capable de se transmettre, en éliminant vraisemblablement la seconde.

Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotype during the in vitro life cycle of *Leishmania infantum*: implications for the spread of chemoresistance in endemic areas

D. Sereno, E. Guilvard, S. Maquaire, M. Cavaleyra, P. Holzmüller, A. Ouaissi, J.L. Lemesre *

UR 008 'Pathogénie des Trypanosomatidae' Centre Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 911 Ave. Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier cedex 1, France

Received 17 May 2000; received in revised form 9 May 2001; accepted 15 May 2001

Abstract

Pentavalent antimonial unresponsiveness is an emerging problem in endemic areas and information on factors which could modulate the transmission of drug-resistant phenotypes and parasites during life cycle are warranted. Using axenic amastigotes resistant to potassium antimonyl tartrate (Sb(III)) we investigated the modulation of antimonyl resistance during the in vitro life cycle. We assessed: (i) the stability of the drug-resistant phenotype during the in vitro life cycle; (ii) the transmission of drug-resistant clones when mixed with a wild-type clone at different susceptible/chemoresistant ratios (50/50, 90/10, 10/90) after one or two in vitro life cycles. We demonstrate that: (i) mutants which were 12, 28, 35 and 44 fold more resistant to Sb(III)-antimonial than their parental wild-type, were Glucantime® Sb(V)-resistant when growing in THP-1 cells; (ii) the drug-resistant phenotype was partially retained during long-term in vitro culture (3 months) in drug free medium; (iii) the antimonyl-resistant phenotype was retained after one or more in vitro life cycles. However, when drug-resistant parasites were mixed with susceptible, mutants could not be detected in the resulting population, after one or two in vitro life cycles, whatever the initial wild-type/chemoresistant ratio. These results could be explained by the lower capacity of drug-resistant amastigotes to undergo the amastigote–promastigote differentiation process, leading probably to their sequential elimination during life cycle. Taken together, these observations demonstrate that different factors could modulate the transmission of *Leishmania* drug resistance during the parasite's life cycle. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Leishmania infantum*; Antimonyl-resistant amastigotes; Parasite's life cycle: Phenotype transmission

1. Introduction

* Corresponding author. Tel.: + 33-4-67-416220; fax: + 33-4-67-416330.

E-mail address: lemesre@melusine.mpl.ird.fr (J.L. Lemesre).

Members of the genus *Leishmania* are widely distributed worldwide and are the causative agent

of various leishmaniasis which are significant causes of morbidity and mortality in several countries. Like many other protozoan parasites, they have a complex life cycle characterized by a succession of several specialized developmental stages, each of which is essential for the completion of the life cycle. A vertebrate host is infected by flagellated extracellular promastigote forms via the bite of a sandfly. Promastigotes rapidly transform into nonflagellated amastigotes that divide actively within the mononuclear phagocytes of the vertebrate host. Developmental stages undergo changes involving morphology, the pattern of gene expression and cell division status.

Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* covers a wide belt of the palearctic region and a small part of the oriental region (extreme south of the Arabian peninsula). In Indian kala-azar, caused by *L. donovani*, a large number of parasites circulate in the peripheral blood, producing experimental infection rates in the vector (*Phlebotomus argentipes*) of up to 40% permitting human-to transmission. By contrast, in most Mediterranean kala-azar the infection rate in sandflies is generally low and both man and dogs are infected.

The basic treatment of leishmaniasis consists of the administration of pentavalent antimony in the form of sodium stibogluconate (Pentostam[®]) or meglumine (Glucantime[®]). Pentamidine or amphotericin B is currently considered as second line treatments for cases unresponsive to antimony. Unfortunately, treatment failure in man, especially of kala-azar, mucosal leishmaniasis, and diffuse cutaneous leishmaniasis is becoming a common problem in many endemic areas. In addition, the low efficacy of pentavalent antimony in treatment of patients co infected with AIDS and *Leishmania spp.* is often reported (Peters et al., 1990). Pentavalent antimony is also extensively used in the treatment of dogs, and numerous cases of unresponsiveness have been reported. There is now strong indication that treatment failure may be partly due to parasite drug resistance (Grögl et al., 1992; Osman et al., 1998), since antimony-resistant parasites have been recently isolated from unresponsive patients (Faraut-Gambarelli et al., 1997; Lira et al., 1999).

A better understanding of the factors involved in the selection of drug-resistant mutants, to try to circumvent or overcome it, is warranted. In this regard, *Leishmania* promastigote forms which can be easily cultivated in vitro has served as a prototype genus for elucidating the molecular mechanisms and the biochemical alterations that provoke drug resistance in parasitic protozoa. The main molecular mechanisms involved in drug resistance are quantitative or qualitative modification of the target molecule and changes in the membrane, resulting in decreased influx or increased efflux of the molecule (Endicott and Ling, 1989; Flintoff and Essani, 1980; Ouellette et al., 1990, 1991; Ouellette and Papadopolou, 1993; Mukhopadhyay et al., 1996; Ouellette et al., 1998a,b). Unfortunately, the mechanisms that contribute to pentavalent antimonial toxicity on the clinically relevant parasite stage (the amastigote form) are still unknown. Since pentavalent antimonials unresponsiveness is becoming a serious emerging problem, information on factors which could modulate transmission of the drug resistant phenotypes and parasites during life cycle is warranted. Such data are difficult to obtain, due to the laborious, time consuming practice and difficulty of experimentally infecting sandflies and following the parasites developmental life cycle in their invertebrate and vertebrate hosts. The complete developmental sequence of *L. mexicana* has been produced in axenic culture by manipulation of media, pH and temperature conditions (Bates, 1994; Lemesre, 1994; Sereno and Lemesre, 1997b; Sereno et al., 1997) making it possible to determine potential factors involved in the modulation of the transmission of chemoresistant parasites and phenotypes during life cycle. In a previous report, we pointed out the fact that the level of pentamidine tolerated by resistant amastigotes of *L. mexicana* after the completion of a complete developmental sequence was dependent on the induced-level of resistance demonstrating the existence of a modulation in the transmission of the resistant phenotype during its life cycle (Sereno et al., 1997). This finding could be of great significance when considering the transmission of drug-resistant parasites from host-to-host by *Phlebotominae*. We have previously shown that

the induction of Sb(III) resistance by direct drug pressure on the relevant parasite stage of *L. infantum* induced a strong cross resistance to Glucantime[®] (Sereno et al., 1998). In the present report, we have followed the susceptibility profiles of the *L. infantum* mutant either alone or in a mixed population composed of resistant and susceptible parasites during in vitro developmental sequences. These basic studies could have great impact on the understanding of the propagation of chemoresistant parasites in the field.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Glucantime[®] (batch No. 331-2), which does not contain *m*-chlorocresol as preservative, was supplied by Rhône Poulenc Specia. Potassium antimonyl tartrate trihydrate, pentamidine isethionate and amphotericin B were supplied from SIGMA (St. Louis).

2.2. Parasites and cultures

A cloned line of *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) was used in all experiments. Axenically-grown amastigote forms of *L. infantum* were maintained at 37 °C with 5% CO₂ by weekly subpassages in a cell-free medium called MAA/20 (medium for axenically-grown amastigotes) in 25 cm² flasks as previously described (Lemesre, 1994; Lemesre et al., 1997; Sereno and Lemesre, 1997a). From a starting inoculum of 5×10^5 amastigote forms/ml, a cell density of approximately 5×10^7 parasites/ml was obtained on day 7. MAA/20 consisted of modified medium 199 (Gibco BRL) with Hanks' salts supplemented with 0.5% soya trypto-casein (Pasteur Diagnostics, Marne la Coquette, France), 0.01 mM bathocuproine disulphonic acid, 3 mM L-cysteine, 15 mM D-glucose, 5 mM L-glutamine, 4 mM NaHCO₃, 0.023 mM bovine hemin, 25 mM HEPES to a final pH of 6.5, and supplemented by 20% of pre-tested fetal calf serum (FCS). The population of axenically-grown amastigote forms appeared homogeneous, round to ovoid, aflagellate and immobile. We and

other investigators have previously shown that axenically-grown amastigotes of different *Leishmania* species clearly resembled intracellular amastigotes with regard to their ultrastructural, biological, biochemical and immunological properties (Bates et al., 1992; Bates, 1993, 1994; Lemesre, 1994; Sereno and Lemesre, 1997b). Moreover, characterized extracellular amastigotes, like intracellular ones, differed from promastigotes in a variety of biochemical characteristics, including proteinase, ribonuclease, adenine deaminase, peroxidase, glucose catabolism, nucleic acid synthesis, dehydrogenase activities, nitric oxide and drug susceptibilities (Coombs et al., 1982, 1986; Hassan et al., 1985; Lemesre et al., 1997; Sereno and Lemesre, 1997a,b; Rainey et al., 1991).

2.3. Selection of antimonyl Sb(III)-resistant amastigote forms

Cloned wild-type amastigote forms of *L. infantum* (designated as LdiWT) were adapted to survive in medium containing approximately 0.5 µg/ml potassium antimony tartrate (Sb(III)). The cultures were stabilized for several subcultures before increasing the drug level (1, 2, 4, 6, 10, 20, 30, 40 and 120 µg/ml). Axenically-grown amastigotes (LdiWT) were subjected to stepwise increasing drug pressure until cell lines resistant to 4, 20, 30 and 120 µg/ml potassium antimonyl tartrate trihydrate (designated as LdiR4, LdiR20, LdiR30 and LdiR120, respectively) were established. The cell lines selected for further studies were then cultured in MAA 20% FCS medium containing 4, 20, 30 µg/ml and 120 µM potassium antimonyl tartrate trihydrate, respectively. All amastigote populations (wild-type and Sb(III)-resistant clones) were subjected to a similar number of in vitro culture subpassages.

2.4. Viability test

To estimate the IC₅₀ values, the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) micromethod already described was mainly used throughout the experiments. Results were analyzed using a mathematical model previ-

ously described elsewhere (Sereno and Lemesre, 1997a,c).

2.5. Drug efficacy assay in THP-1

The in vitro sensitivity of *L. infantum* in human leukaemia monocyte cell line (THP-1 cells) was evaluated according to the method described by Gebre-Hiwot et al. (1992) with modification. Briefly, THP-1 cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS. THP-1 cells in the log-phase of growth were differentiated by incubation for 2 days in medium containing 20 ng/ml phorbol myristate acetate (PMA, Sigma), inducing the differentiation and causing cells to become adherent (Tsuchiya et al., 1982). THP-1 treated cells with PMA were washed and then infected with stationary-phase extracellular amastigotes in eight chamber Lab Teck tissue culture slides (Nunc) at a parasite:cell ratio of 3:1 at 37 °C with 5% CO₂. After 2 h incubation, non-internalized parasites were removed. Serial dilutions of each drug were made in the RPMI medium supplemented with 10% FCS and were dispensed in wells. Medium containing the drug was changed after 3 days. After 5 days of drug exposure, wells containing adherent differentiated THP-1 cells were washed, fixed with methanol and stained with Giemsa. The diminution of the parasitic index as compared to the untreated control was calculated and expressed in percentage: $PI = 100 - [(\text{the mean number of amastigotes per macrophages in treated wells} \times \text{percentage of infected macrophages in treated wells}) / (\text{the mean number of amastigotes per macrophages in untreated wells} \times \text{percentage of infected macrophages in untreated wells})] \times 100$. Results are the mean of duplicate experiments.

2.6. Complete in vitro developmental sequence

The complete developmental life cycle of *L. infantum* in axenic cultures has previously been described (Sereno and Lemesre, 1997a; Sereno et al., 1997). Briefly, amastigote forms harvested at the stationary phase of growth (6 to 7-day-old) were inoculated at 3×10^6 parasites/ml in RPMI 20% FCS medium at pH 7.2 and 25 ± 1 °C. After

7 days of culture, metacyclic promastigotes of *L. infantum* were differentiated back into axenically growing amastigotes by inoculation of 3×10^6 parasites/ml in the MAA/20 medium, pH 6.5, raising the temperature to 37 °C in 5% CO₂. After 3 days, the IC₅₀ and index of resistance (IR) values of the newly transformed mid-log phase amastigotes were calculated. The morphological aspect of parasites was determined by microscopic examination after Giemsa staining. The complete in vitro developmental sequence of mixed (Wild-type and chemoresistant) organisms was performed in the same conditions. Briefly, stationary phase axenic amastigote populations containing different wild-type/drug-resistant parasite ratios were inoculated at 3×10^6 parasites/ml in promastigote culture conditions and after 8 days back into axenic amastigotes by inoculation into amastigote culture conditions of 3×10^6 metacyclic promastigotes. After 3 days, the IC₅₀ and index of resistance (IR) values of the newly transformed mid-log phase amastigotes were estimated.

2.7. Statistical analysis

Statistical significance was analyzed by Student's *t*-test.

3. Results

3.1. Phenotypic characterization of the Sb(III)-resistant amastigotes and susceptibility to pentavalent antimony

The induction of Sb(III) resistance by direct exposure of axenically-grown amastigotes of *L. infantum* to potassium antimonyl tartrate trihydrate resulted in the selection of extracellular amastigotes expressing the following indices of resistance IR: 12 (LdiR4), 28 (LdiR20), 35 (LdiR30) and 44 (LdiR120) (Table I). Cross-resistance profiles were previously characterized according to their cross-resistance status to pentamidine and amphotericin B (Sereno et al., 2000). Resistant amastigote clones were able to grow in long-term culture conditions in the presence of their respective Sb(III)-antimony concen-

tration. The acquisition of the drug resistance phenotype did not affect the growth rate of the axenic amastigote parasites (data not shown). In a macrophage model, chemoresistant variants of LdiR120 were able to proliferate at the same rate as the wild-type clone as demonstrated by the determination of the amastigote numbers per macrophages after 5 days of infection. These were not significantly different (14.20 ± 5.20 and 9.98 ± 2.76 for wild-type and LdiR120, respectively). Intracellular Sb(III)-resistant mutants were significantly resistant against increasing concentrations of Glucantime®. After 5 days of exposure to 160 µg/ml of Sb(V), the parasitic indices were reduced by about 60, 35, 25 and 20% for LdiR4, LdiR20, LdiR30 and LdiR120, respectively whereas that of the wild-type clone was more than 90% (Fig. 1). These results clearly demonstrated that the induction of Sb(III)-antimony resistance by direct drug pressure on axenically-grown amastigotes led to a high degree of Glucantime® Sb(V)-resistance in intracellular amastigotes.

3.2. Stability of the antimonyl-resistant phenotypes in absence of drug pressure

Before evaluating the potential transmission of the chemoresistant phenotypes during their in vitro life cycle, the stability of the antimony resis-

tance was analyzed after 2 and 3 months of culture in drug-free medium. As shown in Fig. 2 the antimony susceptibility of LdiWT was stable during the time course of the experiment. The IC₅₀ values for LdiR4, LdiR20, LdiR30 and LdiR120 decreased gradually during the time course of the experiment, although they could be considered as chemoresistant cell lines since their IR values determined after 3 months of culture in drug-free medium were the following: 2, 8, 19 and 23, respectively.

3.3. Comparison of the amastigote-promastigote differentiation rates between wild-type and chemoresistant clones

As shown in Fig. 3, when axenically-grown amastigotes were allowed to differentiate under promastigote culture conditions and in the absence of Sb(III) antimony, about 96% of LdiWT parasites were transformed into promastigotes after 3 days. The transformation reached 100% after 4 days. A large delay was observed in the differentiation process of axenically-grown LdiR4, LdiR30 and LdiR120 mutants (Fig. 3). Indeed, after 4 days of differentiation, only about 50% of drug-resistant mutants had transformed into promastigotes whatever the level of resistance. The differentiation process of the mutants was complete after 7 days.

Table 1

Transmission of the antimony Sb(III) resistance during life cycle of *L. infantum*

	AxAma ^a		APA-1 ^b		APA-2 ^c	
	IC ₅₀ µg/ml	IR	IC ₅₀ µg/ml	IR	IC ₅₀ µg/ml	IR
LdiWT	4.70 ± 2.40	1	2.86	1	2.44	1
LdiR4	56.04 ± 17.70	12	12.9	5	19.54	8
LdiR20	135.33 ± 22.70	28	71.06	25	71.63	29
LdiR30	165.30 ± 21.90	35	120.00	42	161.45	66
LdiR120	206.00 ± 30.00	44	155.32	54	213.68	87

The effective concentration of Sb(III) (µg/ml) that inhibits the growth of parasites by 50% was determined as described in Section 2. IR: Index of resistance: IC₅₀ before drug pressure/IC₅₀ after drug pressure.

^a IC₅₀ and IR of axenic amastigotes to potassium antimonyl tartrate Sb(III) after drug pressure.

^b IC₅₀ and IR of axenic amastigotes to potassium antimonyl tartrate Sb(III) after one in vitro life cycle.

^c IC₅₀ and IR of axenic amastigotes to potassium antimonyl tartrate Sb(III) after two in vitro life cycles.

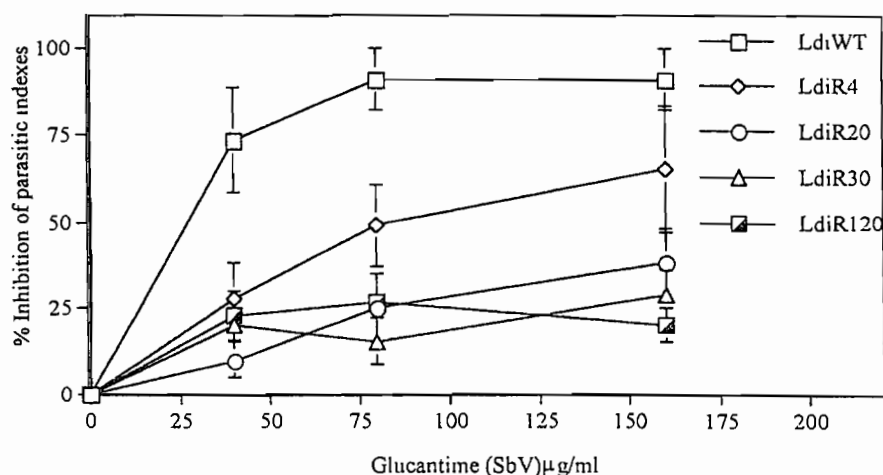


Fig. 1. Toxicity of Glucantime[®] against *L. infantum* wild type and chemoresistant amastigotes in THP-1 cells. Host cells were infected with chemoresistant (LdiR4, LdiR20, LdiR30, LdiR120) or wild-type (LdiWT) amastigotes at a cell-parasites ratio of 1:3 in medium supplemented with 10% FCS after differentiation with PMA. Infected cells were exposed to drugs for 5 days. Results are the mean of duplicate experiments.

3.4. Transmission of the antimonyl-resistant phenotypes during in vitro developmental life cycle

For the first time, it was possible to follow antimony-resistant phenotypes of *L. infantum* during in vitro transformation of axenically-cultured amastigotes into promastigotes and then back into amastigotes. Interestingly, the levels of antimony resistance were retained when stationary phase chemoresistant amastigotes of LdiR4, LdiR20, LdiR30 and LdiR120 were differentiated into promastigotes and then back into amastigotes (Table 1). After the completion of a second in vitro life cycle, resulting amastigotes expressed IC_{50} values of 19.54, 71.63, 161.45 and 213.68 µg/ml for LdiR4, LdiR20, LdiR30 and LdiR120, respectively. These results demonstrate the stability of the Sb(III)-resistant phenotypes after two in vitro life cycles, whatever the level of resistance induced. The Glucantime Sb(V)-resistance of intracellular amastigotes was also retained after one in vitro life cycle. As shown in Fig. 4, after the in vitro differentiation of LdiR120 mutants, the intracellular amastigotes were still resistant to SbV species in the form of Glucantime[®]. A concentration of 160 µg/ml of Glucantime[®] induced an 80% reduction in the parasite index in the case of LdiWT and only 20% in the case of LdiR120, thus demonstrating the

ability of these parasites to maintain their drug resistance phenotype.

3.5. Transmission of the antimony-resistance of mixed population (wild-type and drug-resistant parasites) during in vitro developmental life cycle

We have: (i) determined the drug susceptibility profile of a mixed population containing three different wild-type/chemoresistant ratios (i.e. 50/

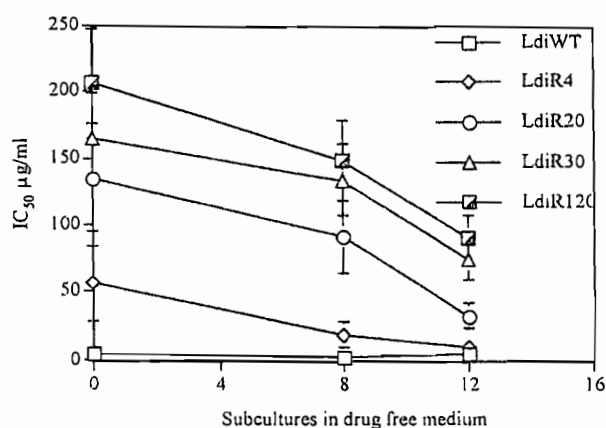


Fig. 2. Stability of the IC_{50} value for Sb(III)-antimonyl resistant amastigotes of *L. infantum* (LdiR4, LdiR20, LdiR30 and LdiR120) and of the wild type (LdiWT). Amastigotes were cultured in drug-free medium for different periods. Each point represents the mean IC_{50} values of one independent experiment in triplicate.

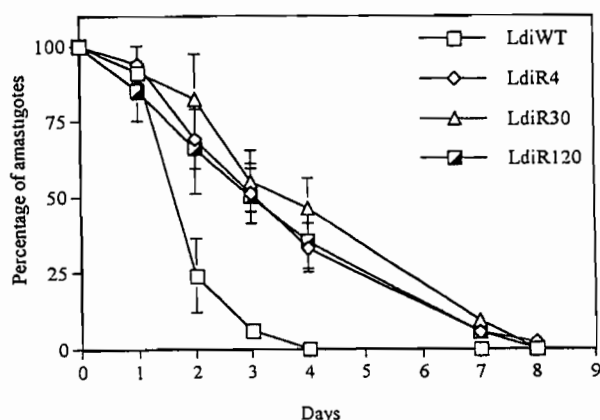


Fig. 3. Differentiation of wild-type (LdiWT) and Sb(III)-resistant axenically-grown amastigote forms (LdiR4, LdiR20, LdiR30, LdiR120) into promastigote ones, in the absence of potassium antimonyl tartrate (SbIII). Parasites were stained with Giemsa. Differentiation was monitored by counting 300 cells for each point. Results were expressed as a mean value of amastigote percentages.

50, 90/10, 10/90); (ii) followed the presence of the drug-resistant clones (i.e. LdiR30 or LdiR120) in these populations after one or two in vitro life cycles. As shown in Fig. 5A and Fig. 6A, significant differences in chemosusceptibility-profiles were obtained, according to the wild-type/drug-resistant ratio. A biphasic profile typical of mixed populations with different drug responses was monitored in the case of a mixed population containing 50% of wild-type and 50% of drug-resistant parasites either LdiR30 or LdiR120. Fur-

thermore, when the wild-type/drug-resistant ratio was of 10/90 or 90/10, the chemosusceptibility-profile determined was that of the clone in the majority in the culture medium. As shown in Figs. 5A and 6A, when the wild-type/drug-resistant ratio was 90/10 the profile was that of wild-type parasites when the ratio was 10/90 the chemosusceptibility profile was close to that of antimony-resistant amastigote. The behaviour of the mixed population was then followed after the completion of one or two in vitro life-cycle (i.e. axenic amastigotes–promastigotes–axenic amastigotes). In the case of wild-type/LdiR30 mixed populations (Fig. 5B), all the chemosusceptibility profiles obtained after one or two in vitro life cycle were close to that of wild-type parasites, whatever the initial ratio (Fig. 5B and C). As summarized in Fig. 6B, when the initial wild-type/LdiR120 ratio was 50%/50% or 90%/10%, the chemosusceptibility profile obtained after one in vitro life cycle was close to that of wild-type parasites. When a population of amastigote organisms containing 10% of wild-type parasites and 90% of LdiR120 mutants was allowed to differentiate into promastigotes and then back into amastigotes, a significant decrease in antimony-resistance was observed. Nevertheless, chemoresistant amastigotes seem to be still present in the population as shown by the chemosusceptibility profile (Fig. 6B). However, after a second developmental sequence, a profile close to that of the wild-type one was ascertained,

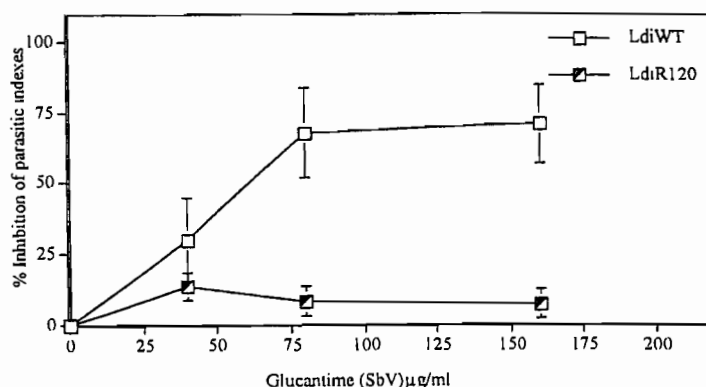


Fig. 4. Toxicity of Glucantime[®] against *L. infantum* wild type and LdiR120 chemoresistant amastigotes in THP-1 cells. Host cells were infected with chemoresistant (LdiR120) or wild-type (LdiWT) amastigotes which have performed an in vitro differentiation into promastigotes and then back into axenic amastigotes. THP-1 cells were infected at a cell-parasite ratio of 1:3 in medium supplemented with 10% FCS after differentiation with PMA. Infected cells were exposed to drugs for 5 days. Results are the mean of duplicate experiments.

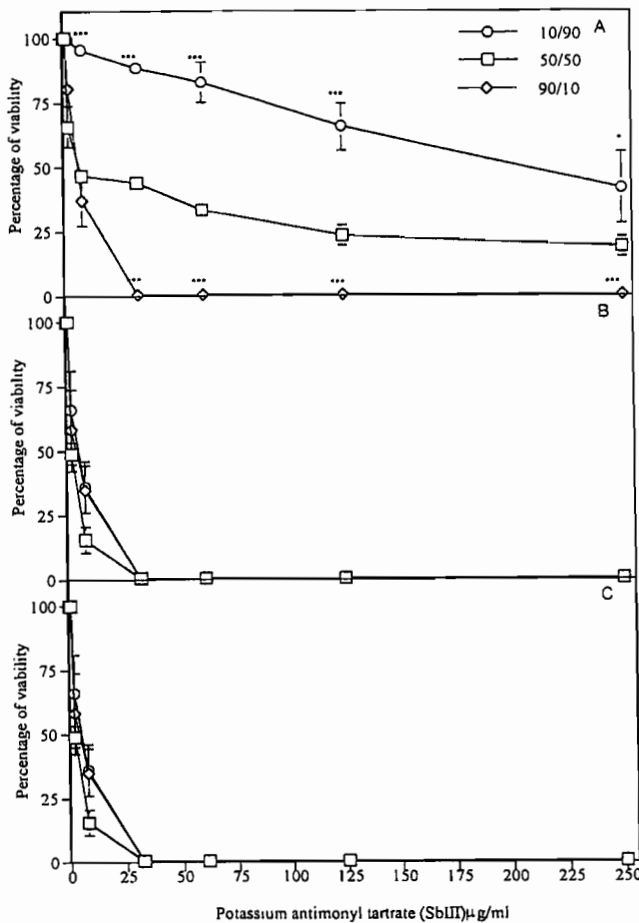


Fig. 5. Chemosusceptibility profile of mixed wild-type/LdiR30 parasites at different ratios: (A) Chemosusceptibility profile of the initial axenic amastigote mixed population; (B) Chemosusceptibility profile of the axenic amastigote mixed population after one in vitro differentiation into promastigotes and then back into amastigotes; (C) Chemosusceptibility profile of the axenic amastigote mixed population after a second in vitro differentiation into promastigotes and then back into amastigotes. Results are representative of two triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

suggesting that the population contained less than 10% of drug-resistant organisms (Fig. 6C).

4. Discussion

A major obstacle to the treatment, prevention and eradication of parasitic diseases in humans has been and continues to be drug resistance, a problem that has been particularly identified with *malaria*. The worldwide emergence of malarial

parasites resistant to the actions of chloroquine and other antimalarial drugs has severely inhibited the ability to treat and control these infections (Warhurst, 1989). For leishmaniasis even if pentavalent antimonials (Pentostam® and Glucantime®) have been in clinical use since 1940, they continue to be considered as first line drugs to treat leishmaniasis. However, pentavalent unresponsiveness is becoming a serious emerging problem and information on factors which could modulate transmission of the drug-resistant phe-

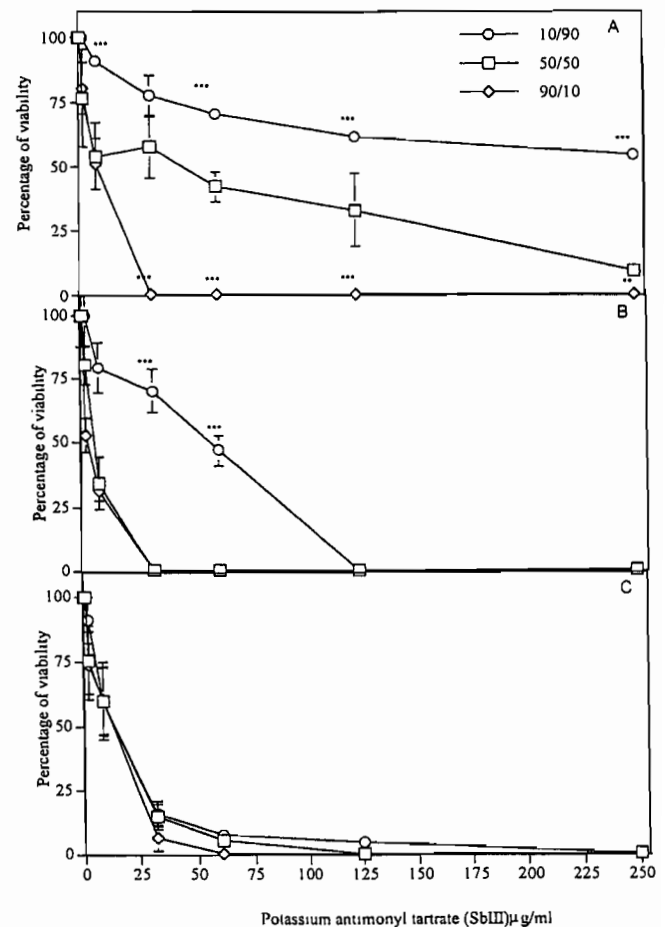


Fig. 6. Chemosusceptibility profile of mixed wild-type/LdiR120 parasites at different ratios: (A) Chemosusceptibility profile of the initial axenic amastigote mixed population; (B) Chemosusceptibility profile of the axenic amastigote mixed population after one in vitro differentiation into promastigotes and then back into amastigotes; (C) Chemosusceptibility profile of the axenic amastigote mixed population after a second in vitro differentiation into promastigotes and then back into amastigotes. Results are representative of two triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

notype throughout the parasite life cycle is warranted. These basic studies are of importance since dogs which are considered as the reservoir of the Mediterranean visceral leishmaniasis are currently treated with antimonials. Numerous cases of relapses are noticed, suggesting therefore that a selection of drug-resistant parasites during the treatment could occur and then be transmitted to man. In Indian kala-azar, selection of drug-resistant organisms could take place in man and a man to man transmission of drug-resistant parasites has to be taken into account. These important data are difficult to obtain, due to the difficulty of experimentally infecting sandflies and following the development life cycle of the parasite in their invertebrate host. However, the complete developmental sequence of *L. mexicana* has been achieved in axenic culture by manipulation of media, pH and temperature conditions (Bates, 1994; Lemesre, 1994; Sereno and Lemesre, 1997b; Sereno et al., 1997) making it possible to determine the potential factors involved in the modulation of the transmission of chemoresistant phenotype during its life cycle.

In terms of population structure, *Leishmania* appears to be basically clonal but some evidence suggests that some genetic exchange could occur (Tibayrenc et al., 1990; Tibayrenc, 1995, 1998). However, in endemic areas, the probability of such an event is extremely low. Thus, the spread of a chemoresistant phenotype in the field depends mainly on the capacity of such parasites to be readily transmitted from host to host without alteration of their drug-resistant phenotype rather than being due to genetic exchange between susceptible and resistant strains. In the present study, we have shown that in the absence of Sb(III) antimony, all mutants were able to perform an in vitro life cycle, allowing us to determine the stability of the antimony-resistant phenotype during several rounds of in vitro differentiation. All the mutants expressed a stable phenotype of antimony resistance when one or two in vitro life cycles were performed. These results were quite different from those previously reported when, selecting pentamidine-resistant amastigotes of *L. mexicana*, only the highly pentamidine-resistant clones retained their phenotypes during developmental life cycle (Sereno and Lemesre, 1997b).

Our results demonstrate that the acquisition of the chemoresistance could have some impact on parasite fitness which could influence some other important biological properties involved in the regulation of parasite proliferation and differentiation events. The acquisition of the drug resistance phenotype did not affect their growth rates. In parasitic diseases, the life cycle is essential to parasite survival and instrumental to the propagation of the disease. After the ingestion of a bloodmeal containing amastigote-infected macrophages by a sandfly, parasites are released by the rupture of the host cells during the feeding process. Shortly after engorgement, the bloodmeal is encased by a peritrophic membrane secreted by the abdominal midgut cells (Gemetchu, 1974). This membrane retains the developing promastigotes during the first 72 h. It is apparent that, as the bloodmeal is digested during the first 3–4 days, the parasites are normally confined by the peritrophic membrane. As digestion proceeds, the membrane breaks up and free-swimming promastigotes escape, either anteriorly through the broken membrane, or posteriorly to colonize the pylorus and ileum of the sandfly. Since the promastigote form is the parasite stage able to survive in the sandfly, the amastigote-promastigote differentiation process is a key event for the survival of the parasite in the insect vector. Impairment in this process could have a deleterious impact on efficiency transmission. In this report we have shown that the differentiation process is significantly altered by the acquisition of the antimony-resistance phenotype, suggesting that the mechanism of antimony resistance substantially interact with the amastigote-promastigote transformation process of the parasite. Therefore, we could hypothesize that this impairment in the transformation process that occurs in drug-resistant amastigotes could influence the ability of these parasites to optimally accomplish their developmental life cycle in the sandfly, and consequently to be efficiently transmitted to the vertebrate host. Multiple bloodfeeding by sandflies (Dhanda and Gill, 1982; Guzman et al., 1994) or the ingestion of host macrophages carrying mixed parasite populations (Pratlong et al., 1989) have already been reported. Another inter-

esting observation reported in this study was the lower capacity of drug-resistant organisms to be propagated when they were mixed with wild-type cells. We suggest that drug-resistant organisms are sequentially eliminated from culture medium during the differentiation process.

These observations strongly suggest that for *Leishmania* different factors could modulate the transmission of *Leishmania* drug resistance during the parasite's life cycle and thus the spread of drug resistance in endemic areas. These factors are: (i) the stability of the phenotype during the parasite's life cycle; (ii) the ability of drug-resistant parasites to optimally accomplish the complete developmental sequence; and (iii) the occurrence of mixed parasites populations. However, some other factors which have not been assessed in this study, should be studied like the capacity of promastigotes to infect macrophages and the capacity of amastigotes to resist to macrophages microbicidal compounds. Taken together, our observations suggest that these factors could modulate the spread of *Leishmania* drug resistance in endemic areas.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Institut de Recherche pour le Développement (IRD Institute) and the Conseil Regional of Languedoc Roussillon. We thank P. Agnew for revision of the manuscript.

References

- Bates, P.A., Robertson, C.D., Tetley, L., et al., 1992. Cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology* 105, 193–202.
- Bates, P.A., 1994. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology* 108, 1–9.
- Bates, P.A., 1993. Axenic culture of *Leishmania* amastigotes. *Parasitol Today* 9, 143–146.
- Coombs, G.H., Craft, J.A., Hart, D.T., 1982. A comparative study of *Leishmania mexicana* amastigotes and promastigotes. Enzyme activities and subcellular locations. *Mol. Biochem. Parasitol.* 5, 199–211.
- Coombs, G.H., Tetley, L., Moss, V.A., et al., 1986. Three-dimensional structure of the *Leishmania* amastigote as revealed by computer-aided reconstruction from serial sections. *Parasitology* 92, 13–23.
- Dhanda, V., Gill, G.S., 1982. Double blood meals by *Phlebotomus argentipes* and *P. papatasi* in two villages of Maharashtra. *Indian J. Med. Res.* 76, 840–842.
- Endicott, J.A., Ling, V., 1989. The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. *Ann. Rev. Microbiol.* 58, 137–171.
- Faraut-Gambarelli, F., Piarroux, R., Deniau, M., et al., 1997. In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 41, 827–830.
- Flintoff, W.F., Essani, K., 1980. Methotrexate-resistant chinese hamster ovary cells contain a dihydrofolate reductase with an altered affinity for methotrexate. *Biochemistry* 19, 4321–4327.
- Gebre-Hiwot, A., Tadesse, G., Croft, S.L., et al., 1992. An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukemia monocyte cell line, THP-1. *Acta Trop.* 51, 237–245.
- Gemetchu, T., 1974. The morphology and fine structure of the midgut and peritrophic membrane of the adult female, *Phlebotomus longipes* Parrot and Martin (Diptera: Psychodidae). *Ann. Trop. Med. and Parasitol.* 68, 111–124.
- Grögl, M., Thomason, T.N., Franke, E., 1992. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 117–126.
- Guzman, H., Waters, L.L., Tesh, R.B., 1994. Histologic detection of multiple blood meals in *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: psychodidae). *Entomol. Soc. Am.* 31, 890–897.
- Hassan, H.F., Coombs, G.H., et al., 1985. *Leishmania mexicana*, purine metabolizing enzymes of amastigotes and promastigotes. *Exp. Parasitol.* 59, 15–28.
- Lemesre, J.L., 1994. Methods for the culture in vitro of different stages of tissue parasites. International publication No. WO 94/26899.
- Lemesre, J.L., Sereno, D., Daulouède, S., et al., 1997. *Leishmania spp.*: Nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically-grown amastigote forms. *Exp. Parasitol.* 86, 58–68.
- Lira, R., Sundar, S., Makharia, A., et al., 1999. Evidence that the high incidence of treatment failures in Kala-Azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J. infect. Dis.* 180, 564–567.
- Mukhopadhyay, R., Dey, S., Xu, N., et al., 1996. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10383–10387.
- Osman, O.F., Oskam, L., Zijlstra, E.E., et al., 1998. Use of the polymerase chain reaction to assess the success of visceral leishmaniasis treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92, 397–400.
- Ouellette, M., Fase-Fowler, F., Borst, P., 1990. The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *EMBO. J.* 9, 1027–1033.

- Ouellette, M., Papadopolou, B., 1993. Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. Parasitol. Today 9, 150–153.
- Ouellette, M., Hettema, E., Wust, D., et al., 1991. Direct and inverted DNA repeats associated with P-glycoprotein gene amplification in drug-resistant *Leishmania*. EMBO. J. 10, 1009–1016.
- Ouellette, M., Haimeur, A., Grondin, K., et al., 1998a. Amplification of ABC transporter gene *pgpA* and of other heavy metal resistance genes in *Leishmania tarentolae* and their study by gene transfection and gene disruption. Methods Enzymol. 292, 182–193.
- Ouellette, M., Légaré, D., Haimeur, A., et al., 1998b. ABC transporters in *Leishmania* and their role in drug resistance. Drug Resistance Updates 1, 43–48.
- Peters, B.S., Fish, D., Golden, R., et al., 1990. Visceral Leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical feature and response to therapy. Quat. J. Med. 77, 1101–1111.
- Pratlong, F., Portus, M., Rispail, P., et al., 1989. Présence simultanée chez le chien de deux zymodèmes du complexe *Leishmania infantum*. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 64, 312–314.
- Rainey, P.M., Spithill, T.W., McMahon-Pratt, D., et al., 1991. Biochemical and molecular characterization of *Leishmania pifanoi* amastigotes in continuous axenic culture. Mol. Biochem. Parasitol. 49, 111–118.
- Sereno, D., Lemesre, J.L., 1997a. Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. Antimicrob. Agents and Chemother. 41, 972–976.
- Sereno, D., Lemesre, J.L., 1997b. *In vitro* life cycle of pentamidine-resistant amastigotes: stability of the chemoresistant phenotypes is dependent on the level of resistance induced. Antimicrob. Agents and Chemother. 41, 1898–1903.
- Sereno, D., Lemesre, J.L., 1997c. Use of an enzymatic *in vitro* micromethod to quantify amastigote stage of axenically grown amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. Parasitol. Res. 83, 401–403.
- Sereno, D., Michon, P., Brajon, N., et al., 1997. Phenotypic characterization of *Leishmania mexicana* pentamidine-resistant promastigotes: modulation of the resistance during developmental life cycle. C. R Acad. Sci. 320, 981–987.
- Sereno, D., Cavaleyra, M., Zemzoumi, K., et al., 1998. Axenically-grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an *in vitro* model to investigate the pentavalent antimony mode of action. Antimicrob. Agents and Chemother. 42, 3097–3102.
- Sereno, D., Holzmüller, P., Lemesre, J.L., 2000. Efficacy of second line drugs on antimony-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. Acta Trop. 74, 25–31.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Ayala, F.J., 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structure of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Nalgeria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma*, and its medical and taxonomical consequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2414–2418.
- Tibayrenc, M., 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. Advances in Parasitology 36, 47–115.
- Tibayrenc, M., 1998. Beyond strain typing and molecular epidemiology: integrated genetic epidemiology of infectious diseases. Parasitol. Today 14, 323–329.
- Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., et al., 1982. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by phorbol diester. Cancer Res. 42, 1530–1536.
- Warhurst, D.C., 1989. Current status and evolution of antimalarial drug resistance. J. Chemother. Suppl. 4, 407–410.

Article 3

La croissance *in vitro* de formes promastigotes de *Leishmania amazonensis* est dépendante des interactions entre souches

(Accepté pour publication, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*).

La pentamidine est une molécule fortement utilisée pour le traitement de la leishmaniose, en particulier dans les cas d'échec à la thérapie par les dérivés stibiés ou de rechute après chimiothérapie. Des changements au niveau du kinétoplaste, des activités métaboliques, de la structure membranaire ont été décrits chez les formes promastigotes de *Leishmania* résistantes à la pentamidine. Cependant, ces résultats ne renseignent en rien sur d'éventuelles différences d'aptitude à se développer entre des souches sauvages et résistantes. Dans cette étude, nous avons étudié le comportement de formes promastigotes de *L. amazonensis*, ne différant les unes des autres que par leur degré de chimiorésistance à la pentamidine, lorsqu'elles devaient partager le même environnement. Nous nous sommes focalisés sur l'influence que pouvaient avoir ces souches les unes sur les autres au niveau de leurs développements respectifs.

Principaux résultats :

- ① La croissance *in vitro* des formes promastigotes de *L. amazonensis* est dépendante du degré de chimiorésistance à la pentamidine. En effet, le clone parental sauvage produit plus de cellules en phase stationnaire de croissance que le clone résistant à 5 μM de pentamidine, qui lui-même en produit plus que le clone résistant à 20 μM .
- ② Nous montrons également que plus le degré de chimiorésistance d'une souche augmente, moins elle est capable de proliférer en présence d'une souche moins résistante qu'elle. Les promastigotes résistants à 20 μM de pentamidine ne se divisent pas en présence de formes résistantes à 5 μM , ni du parent sauvage.
- ③ La croissance de la souche résistante à 20 μM de pentamidine est cependant meilleure en présence de parasites chimiorésistants à 5 μM que de parasites sauvages. De même, les

promastigotes résistants à 5 μM prolifèrent plus en présence de parasites résistants à 20 μM que du parent sauvage. Enfin, le parent sauvage produit plus de cellules en présence de parasites fortement chimiorésistants (20 μM de pentamidine) que faiblement chimiorésistants (5 μM de pentamidine).

Nos résultats montrent clairement qu'il existe une différence de croissance entre une souche seule et des mélanges de souches ne différant que par leur degré de chimiorésistance. De telles interactions peuvent se produire lors d'infections multiples et donc influencer sur le nombre de parasites sensibles et résistants qui vont se disséminer dans l'organisme infecté et être transmis au cours du cycle de développement parasitaire.

In Vitro Growth of *Leishmania amazonensis* Promastigotes Resistant to Pentamidine Is Dependent on Interactions among Strains

P. AGNEW,^{1*} P. HOLZMULLER,² Y. MICHALAKIS,¹ D. SERENO,² J. L. LEMESRE,² AND F. RENAUD¹

Centre d'Etudes sur le Polymorphisme des Microorganismes (CNRS/IRD UMR 9926)¹ and
Laboratoire de Biologie Parasitaire,² IRD, 34032 Montpellier Cedex 01, France

Received 24 October 2000/Returned for modification 28 November 2000/Accepted 12 March 2001

The in vitro growth of promastigote cells of *Leishmania amazonensis* was found to strongly depend on interactions among strains that differed in their pentamidine resistance. In particular, the growth of resistant strains was reduced when they shared the same environment with a less-resistant strain.

The aim of this experiment was to test whether closely related strains of *Leishmania amazonensis* promastigote cells, which differed only in their resistance to pentamidine, had an influence upon each other's in vitro growth when they shared the same environment. This approach contrasts with that normally used, where different strains grow in total isolation of one another. Our design has the advantage of allowing interactions among strains to be tested on the basis of their different drug resistance. The existence of such interactions would indicate that mechanisms giving rise to resistance have repercussions in addition to those which can be deduced from comparing strains grown in isolation from one another. Such interactions among strains could occur during mixed infections and strongly influence the relative numbers of sensitive and resistant cells produced.

Resistance to pentamidine in promastigote cells of *L. amazonensis* is known to entail changes in their kinetoplasts (1), metabolic activity (2), and membrane structure (3). However, these studies do not report any evident differences in the in vitro growth of resistant and sensitive strains. The current experiment tested whether the in vitro growth of a wild-type strain (LaWTCL1) and that of descendent strains resistant to 5 μ M pentamidine (LaR5CL1) or 20 μ M pentamidine (LaR20CL1) were influenced by being in each other's presence or not. The three strains used were each derived from a single wild-type cell (WHO designation, MHOM/BR/76/LTB-012). Each strain was maintained in identical conditions, only differing in exposure to pentamidine (Pentamidine Isethionate; Sigma), and for an equivalent period. Consequently, we could directly attribute any differences among lines to differences stemming from their strength of resistance to pentamidine and could eliminate all possibility that differences may have been due to any preexisting genetic variation among the strains being compared.

Promastigote cultures were maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ by weekly subpassages in medium RPMI 1640 (Gibco-BRL), buffered with 25 mM NaHCO_3 (pH 7.2) and supplemented with 20% heat-inactivated fetal calf serum (FCS). Each subculture was initiated with 5×10^5 parasites/ml of medium, with cells for the next subculture being harvested 6 days later at the end of the

logarithmic growth phase. Strains LaR5CL1 and LaR20CL1 were first stabilized for six subcultures in medium containing 0.05 μ M pentamidine before the drug concentration was increased in a stepwise manner until cell lines were resistant to the desired concentrations. The resistance index for these strains (IR: 50% inhibitory concentration [IC_{50}] after drug pressure/ IC_{50} before drug pressure) were 35 and 59, respectively, and were determined as described previously (7). The IC_{50} before drug pressure was 0.48 ± 0.13 μ M pentamidine (6). Strains LaR5CL1 and LaR20CL1 were then cultured in RPMI 20% FCS medium containing 5 and 20 μ M pentamidine, respectively. During this process each strain, including LaWTCL1, experienced approximately 50 subcultures. Thus, differential exposure of the strains to laboratory conditions is unlikely to explain our results.

Before the experimental assay, the effects of drug contamination were minimized by washing the resistant strain twice in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2) and passing the strains through two subcultures in the absence of pentamidine. Strain LaWTCL1 experienced the same treatment.

The experimental assay itself involved growing promastigote cells in a 1-ml multiwell plate (Nunc) that was vertically divided into two equal volumes of 0.5 ml by a porous insert (pore size, 0.22 μ m). This membrane allowed the free passage of the growth medium but prevented cells on each side of the divide from coming into direct physical contact. Thus, different pairwise combinations of strains could be grown on either side of the membrane and a strain's growth could be compared to that when it grew on both sides of the membrane, i.e., it grew in its own presence.

At the beginning of each assay, both halves of the well were seeded with 5×10^5 cells of a particular strain. Each of the nine possible pairwise combinations of strains were replicated three times. The number of cells at stationary phase (day 7 of the experiment) in each half of a well was estimated with a counting chamber and light microscope. We report data based on the identity of the strain in the upper half of a growth chamber. Equivalent analyses based upon the strain in the lower half of a growth chamber are very similar and reveal that the growth of strains was not influenced by its physical position within a growth chamber.

The results of the experiment are reported in Table 1. The leading diagonal of the table shows the number of cells produced by each strain when it grew in its own presence. The

* Corresponding author. Mailing address: CEPIM, CNRS/IRD UMR 9926, IRD, 911 Ave. Agropolis, 34032 Montpellier Cedex 01, France. Phone: 33-4-67-41-62-70. Fax: 33-4-67-41-62-99. E-mail: agnew@cepm.mpl.ird.fr.

TABLE 1. Number of stationary-phase cells produced by each strain as a function of the identity of the other strain in the environment

Other strain	No. of stationary-phase cells (SE) ^a produced by strain		
	LaWTCL1	LaR5CL1	LaR20CL1
LaWTCL1	23.96 (2.01)	3.96 (1.07)	2.28 (0.46)
LaR5CL1	10.18 (0.84)	20.06 (1.10)	3.43 (0.69)
LaR20CL1	14.19 (2.01)	6.72 (0.94)	16.97 (1.72)

^a Values are in millions of cells.

wild-type strain LaWTCL1 produced more cells than the strain resistant to 5 μ M pentamidine (LaR5CL1), which in turn produced more cells than the strain resistant to 20 μ M pentamidine (LaR20CL1). This trend for fewer cells to be produced as the strength of drug resistance increased, however, was not statistically significant (one-way analysis of variance, $F_{2,6} = 4.237$, $P = 0.071$).

When strains of differing resistance were paired in the same environment, there was a clear evidence that some form of interaction occurred among the strains that led to fewer cells being produced (comparison of mixed versus pure treatments, Welsh corrected one-way analysis of variance $F_{1,21,341} = 50.813$, $P < 0.001$). This effect was not simply due to being in the presence of another strain, since the relative decrease in cell production was greater as the resistance increased; the mean production values in a mixed versus pure environment were as follows: LaWTCL1, 50.0%; LaR5CL1, 24.3%; and LaR20CL1, 16.0%.

Interestingly, the number of cells produced in a mixed environment did not just depend on the resistance of the strain being measured but also upon the resistance of the other strain in its environment (two-way analysis of variance $F_{4,18} = 30.018$, $P < 0.001$). As a strain's strength of resistance increased, its ability to grow in the presence of a less-resistant strain was reduced. This effect increased as the difference in the strength of resistance among strains increased. Thus, the most-resistant strain, LaR20CL1, failed to grow well in the presence of either of the two less-resistant strains but did marginally better when paired with the resistant strain LaR5CL1. Equally, LaR5CL1 grew better in the presence of LaR20CL1 than the wild-type strain LaWTCL1. Finally, LaWTCL1 also produced more cells in the presence of the more resistant LaR20CL1 than when paired with the less-resistant LaR5CL1. Our ability to eliminate genetic variability among the strains of origin as a possible confounding factor means that we can be confident in attributing the source of these interactions to each strain's strength of pentamidine resistance.

There are two direct observations that can be made from our results. First, the growth of pure and mixed pairwise combinations of strains were markedly different. Second, the growth of strains in a mixed combination was determined by their relative strengths of drug resistance. This suggests that the mechanisms responsible for pentamidine resistance have an important role in determining how these strains influenced their environment or were influenced by it.

A possible interpretation of these results is that each strain secretes something into its environment which inhibits the growth of competitors (or non-self strains) but not itself. This would explain why each strain grew less well in mixed rather than pure treatments. The pattern of our results would additionally suggest

that the mechanisms responsible for pentamidine resistance either reduced the amount of product secreted or made the strain more sensitive to the secreted products of others. This type of effect is found in interactions among closely related strains of antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria. These bacteria contain plasmids which produce antibiotics (colicins) that can be used to kill off rival strains in the local environment (5). Individual strains are resistant to the colicin they produce but differentially resistant to colicins secreted by other strains (4); an effect only evident when different strains share the same environment. Different mechanisms of resistance have different consequences for the cell and its ability to persist in the presence of other strains. For example, increased colicin resistance due to altered translocation pathways can disrupt the integrity of the cell membrane and make it more sensitive to changes in its environment (8). Pentamidine resistance is also known to alter the membrane structure of *L. amazonensis* promastigote cells (3). This may similarly make such cells more sensitive to changes in their environment due to the presence of different strains.

Promastigote cells are known to secrete and to be sensitive to a diverse range of products in their environment. This raises the possibility for interactions to exist among strains; our results indicate that pentamidine resistance is one such factor capable of creating such interactions. The situations in which different strains may come into contact and interact includes multiple infections, when sampled material contains strains of different origin, or when a mutation gives rise to sensitive cells within a resistant population. Our results suggest that interactions among sensitive and resistant strains would lead to the resistant strain being rapidly replaced by the sensitive strain. Such a mechanism would limit the establishment and persistence of resistant strains in the absence of the drug concerned. Further studies allowing for the possibility of such interactions among strains may help shed valuable light on how targets of drug action and mechanisms of resistance influence the biological properties of resistant cells.

This study was funded by the French governmental agencies, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and the Institut pour la Recherche et Développement (IRD).

We thank L. S. Young and anonymous reviewers for comments on earlier versions of the manuscript. Various revisions of the text were clarified by the aid of Guy Ness.

REFERENCES

1. Bassellin, M., M. A. Badet-Denisot, and M. Robert-Gero. 1998. Modification of kinetoplast DNA minicircle composition in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Acta Trop.* 70:43–61.
2. Bassellin, M., M. A. Badet-Denisot, F. Lawrence, and M. Robert-Gero. 1997. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type, pentamidine-treated, and pentamidine-resistant *Leishmania*. *Exp. Parasitol.* 85:274–282.
3. Bassellin, M., and M. Robert-Gero. 1998. Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity, and lipophosphoglycan expression in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Parasitol. Res.* 84:78–83.
4. Feldgarden, M., and M. A. Riley. 1999. The phenotypic and fitness effects of colicin resistance in *Escherichia coli* K-12. *Evolution* 53:1019–1027.
5. Riley, M. A., and D. M. Gordon. 1999. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol.* 7:129–133.
6. Sereno, D., and J. L. Lemesre. 1997. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for the investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:972–976.
7. Sereno, D., and J. L. Lemesre. 1997. In vitro life cycle of pentamidine-resistant amastigotes: stability of the chemoresistant phenotypes is dependent on the level of resistance induced. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1898–1903.
8. Webster, R. E. 1991. The *tol* gene products and the import of macromolecules into *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5:1005–1011.

Article 4

La perte de virulence des formes promastigotes de *Leishmania amazonensis* résistantes à la pentamidine est corrélée à une augmentation de la mort par apoptose lors de leur différenciation en formes amastigotes (En préparation).

La pentamidine est une molécule antileishmanienne couramment utilisée dans les cas de non-réponse aux dérivés de l'antimoine. La sélection par pression médicamenteuse *in vitro* de formes promastigotes de *L. amazonensis*, nous a permis d'étudier leur comportement au cours du cycle de développement parasitaire *in vitro*. En effet, l'acquisition d'une chimiorésistance à la pentamidine entraîne des modifications importantes pour le parasite (changements dans la composition des mini-cercles de l'ADN kinétoplastique, dans la biosynthèse des polyamines, dans la fluidité membranaire et le métabolisme des lipides, et dans l'expression du lipophosphoglycane). Ces perturbations dans le métabolisme basal des leishmanies résistantes à la pentamidine pourraient avoir des conséquences importantes sur leur capacité à se transmettre, c'est à dire à réaliser leur cycle biologique.

Principaux résultats :

① Les deux clones LaR5Cl1 et LaR15Cl1, résistants respectivement à 5 et 15 μ M de pentamidine, ne sont pas plus résistants à la lyse par le complément que le clone parental sauvage. La métacyclogénèse des formes promastigotes résistantes n'est donc pas augmentée.

② Les formes promastigotes résistantes à la pentamidine se différencient en amastigotes plus rapidement que la souche sauvage, de manière dépendante du degré de chimiorésistance. Par contre, les formes amastigotes issues des promastigotes chimiorésistants semblent incapables de proliférer.

③ Les promastigotes chimiorésistants ont une capacité d'attachement aux macrophages *in vitro* supérieure à celle des promastigotes sauvages, et dépendante du degré de chimiorésistance. De même, leur capacité d'invasion des macrophages est plus élevée que

celle des parasites sauvages, ce qui conduit à un nombre plus important de parasites par macrophage pour un temps de contact donné.

④ Curieusement, les amastigotes différenciés de promastigotes à l'intérieur des macrophages semblent incapables d'y survivre. Une conséquence directe de ce phénomène est la capacité réduite des parasites résistants à la pentamidine à produire des lésions dans le modèle expérimental murin, par rapport à la souche sauvage.

⑤ Les formes amastigotes issues de promastigotes résistants à la pentamidine présentent des caractéristiques ultrastructurales et moléculaires de cellules en apoptose.

⑥ Les souris infectées montrent que la composition antigénique des promastigotes sauvages et résistants à la pentamidine sont similaires, mais que l'immunogénicité des antigènes des parasites chimiorésistants est diminuée (profils antigéniques plus simples). Le même résultat est observé lorsque les souris sont testées sur des extraits antigéniques de formes amastigotes issues respectivement des promastigotes sauvages et chimiorésistants.

Nos résultats mettent en évidence l'existence d'une mort cellulaire ayant certaines caractéristiques phénotypiques de l'apoptose des eucaryotes supérieurs, chez les protozoaires du genre *Leishmania*. Ce suicide cellulaire semble être induit par un stress lié à la perturbation du cycle de développement parasitaire chez des formes sélectionnées *in vitro* pour leur résistance à la pentamidine. En outre, l'induction d'un processus apoptotique semble avoir des conséquences dramatiques sur la présentation d'antigènes parasitaires au système immunitaire de l'hôte, et pourrait constituer un mécanisme d'échappement pour les leishmanies. Néanmoins, l'analyse des mécanismes moléculaires qui régulent ce phénomène pourrait ouvrir la voie vers des études pharmacologiques de nouveaux composés thérapeutiques antileishmaniens.

***Leishmania amazonensis* : Decreased virulence of
Pentamidine-Resistant Promastigotes Correlates With
Increased Death of Differentiating Amastigotes by Apoptosis**

SERENO D¹, HOLZMULLER P¹, LECARDINAL A¹, ZEMZOUMI K¹, DUTOIT S²,
OUAISSI A¹ and LEMESRE J.L^{1*}

1 UR 008 Pathogénie des Trypanosomatidés, IRD (Institut de Recherche pour le Développement), B.P. 64501, 911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier cedex 5, France.

3 INSERM U422, Place de Verdun, 59 045 Lille, France.

Running title: Avirulent clone of pentamidine resistant *L. amazonensis* with apoptotic phenotype

Corresponding author: Jean-Loup LEMESRE, UR 008 Pathogénie des Trypanosomatidés, IRD (Institut de Recherche pour le Développement), B.P. 64501, 911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France.

Fax: 33 (0)4 67 41 63 30

Tel: 33 (0)4 67 41 62 20

Email: lemesre@mpl.ird.fr

Abstract

We have previously developed *in vitro* protocols allowing to select *Leishmania* species and developmental stages with various levels of pentamidine resistance. In the present study we selected *in vitro* two *L. amazonensis* promastigote clones exhibiting resistance to 5 μ M and 15 μ M pentamidine (LaR5CL1 and LaR15CL1, respectively) and compared their behaviours (complete developmental sequence achieved in axenic cultures, interaction of promastigotes with macrophages in term of attachment, internalization and intracellular survival as well as *in vivo* infectivity) to those of wild-type parasites (LaWTCL1). The data obtained indicated that the velocity of promastigote to amastigote differentiation was substantially greater in the case of drug-resistant parasites compared to the wild-type parental clone. Interestingly, the amastigotes derived from chemoresistant promastigotes lost dramatically their capacity to proliferate as amastigotes *in vitro*, unlike those of LaWTCL1. Furthermore, a significant increase in the ability of resistant stationary phase promastigotes to adhere specifically to and to enter resident mouse macrophages was observed comparatively to that of the corresponding wild type clone. Surprisingly, the intracellular multiplication and/or survival of LaR5CL1 and LaR15CL1 within the host cell were significantly reduced when compared to wild-type parental clone. In the same way, *in vivo* challenge infections in BALB/c mice using either LaR5CL1 or LaR15CL1 promastigotes showed increased delay in the appearance of lesions and significantly reduced lesion sizes, compared with mice infected with wild-type parasites. In fact, examination of amastigotes derived from chemoresistant promastigotes growing *in vitro*, showed for the first time the occurrence of massive parasite death with cytoplasmic and nuclear morphological features and DNA fragmentation pattern characteristic of apoptosis. The model we have developed could be a useful tool to explore the role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival of *Leishmania*. Further manipulations of these parasites will allow the possible identification of the suicide programme machinery.

Introduction

Leishmaniasis is a significant cause of morbidity and mortality in several countries worldwide. The disease is caused by a group of kinetoplastid protozoan parasites transmitted by a blood-feeding dipteran vector of the sub-family *phlebotominae*. Within the insect vector, the parasite replicates as non-infective promastigote which transforms into an infective metacyclic one. In the mammalian host, the infective promastigotes invade the macrophages and differentiate into amastigotes which are the proliferative forms within the vertebrate host. The subsequent success of a *Leishmania* infection is dependent on the ability of the parasite, initially in the promastigote form and later in the amastigote one to adhere specifically to, to enter macrophages and to survive within an antigen-presenting cell that has evolved to kill invading microbes.

The invasion of the host macrophage and tissues depends upon complex processes including ligand-receptor interactions and the production of proteases which degrade extracellular matrix components (4, 5). Much work has focused on the identification of promastigote and macrophage surface molecules involved in the recognition processes. The two major surface glycoconjugates, lipophosphoglycan (LPG) and gp63 have been shown to play a key role in the attachment of promastigotes to macrophages (1). The macrophage complement receptors (CR3 and CR1), the mannose-fucose receptor, the receptor for advanced glycosylation end products and the fibronectin receptors were found to play a role in the parasite-cell adhesion phenomenon (16, 20, 26, 30).

Like many other parasitic protozoan, *Leishmania* preadapts itself to the survival in the next phase of its life cycle. Indeed, the differentiation of promastigotes into intracellular amastigotes correlates with their ability to develop means by which they could survive environmental extremes such as toxic metabolites and acidic pH of the host cell phagolysosomes (3, 8, 19), allowing them to establish infections in mammalian hosts. Studies on the basic cellular function of these organisms led to the identification of several membrane proteins and enzymes which are essential for the parasite survival in its hosts (21). However, investigations are still in progress to better understand the molecular basis of virulence in *Leishmania* parasites. An interesting approach was based on the use of avirulent strains to elucidate basic mechanisms of virulence. For example,

the use of an avirulent LPG-deficient *L. major* clone in BALB/c mice challenge infection has revealed that LPG could be among the potential virulence factors (18, 25).

In the present report, we have selected *in vitro*, in a step by step drug pressure protocol, *L. amazonensis* promastigote clones exhibiting two pentamidine resistance levels (LaR5CL1, LaR15CL1, respectively) and examined their *in vitro* and *in vivo* behaviours. Reproducing complete *in vitro* developmental sequence, we demonstrate that the development in promastigotes of resistance to pentamidine *in vitro* leads to a failure not to differentiate into amastigotes but to proliferate as axenic amastigotes. During *in vitro* infectivity experiments, we showed that, even if binding and internalization of drug-resistant promastigotes by macrophages were substantially enhanced, their *in vitro* intracellular survival was significantly reduced when compared to the parental wild-type clone. Taken together, these results might explain the reduced size and increased delay of appearance of lesions observed in mice challenged with the mutant promastigotes when compared to mice inoculated with the wild-type clone. Morphological and biochemical analysis revealed that a high proportion of amastigotes derived from LaR5CL1 and LaR15CL1 promastigotes died by apoptosis. This may suggest the existence of a programmed cell death machinery (PCD) in the vertebrate stage of the parasite which is activated in a high proportion of fully differentiated amastigotes derived from pentamidine-resistant promastigotes. The implications of these novel findings are discussed.

Materials and Methods

Parasite cultures and *in vitro* developmental life sequences in axenic condition.

Promastigote cultures of *L. amazonensis* (MHOM/BR/76/LTB-012) were maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ by weekly subpassages in medium RPMI 1640 (Gibco BRL), buffered with 25 mM HEPES, 2 mM NaHCO_3 (pH 7.2) and supplemented with 20% heat-inactivated fetal calf serum (FCS). Axenically-grown amastigote forms of *L. amazonensis* were maintained at $32 \pm 1^\circ\text{C}$ by weekly subpassages of 5×10^5 parasites/ml in a cell-free medium called MAA/20 (medium for axenically-grown amastigotes) in 25 cm² flasks. MAA/20 consisted of modified medium 199 (Gibco BRL) with Hanks balanced salt solution supplemented with 0.5 % soya tryptocasein (Pasteur Diagnostics, France), 0.01 mM bathocuproine disulphonic acid, 3 mM L-cysteine, 15 mM D-glucose, 5 mM L-glutamine, 4 mM NaHCO_3 , 0.023 mM bovine hemin, 25 mM HEPES to a final pH of 6.5, and supplemented with 20 % of FCS. The population of axenically-grown amastigote forms appeared homogeneous, round to ovoid, aflagellate and immotile. They have morphological, biochemical and biological characteristics similar to those of *in vivo* isolated amastigote forms (13, 14, 22).

Transformation experiments were initiated with 3×10^6 parasites/ml. Metacyclic promastigotes of *L. amazonensis* harvested at the stationary phase of growth were differentiated into axenically growing amastigotes by passages in the MAA/20 medium, pH 6.5, raising the temperature to $32 \pm 1^\circ\text{C}$ (13). Morphological aspect of parasites was determined by microscopic examination after Giemsa staining. Results were expressed as a mean value of the percentage of differentiation.

Selection of pentamidine-resistant promastigotes. Cloned wild-type promastigote forms of *L. amazonensis* (designated LaWTCL1) were adapted to survive in medium containing 0.5 μM pentamidine (Pentamidine isethionate, Sigma, St Louis, Mo.). The cultures were stabilized for six subcultures in medium containing the same pentamidine concentration, before increasing the drug level. Promastigote forms were subjected to stepwise increasing drug pressure until cell lines resistant to 5 and 15 μM pentamidine (designated clones LaR5CL1, LaR15CL1, respectively) were established. Susceptibility of the clones was determined by using a viability test described previously (22). Both cell lines selected for further studies were then cultured in RPMI 20% FCS medium

containing 5 and 15 μ M pentamidine, respectively. All promastigote populations (wild type and drug-resistant clones) were subjected to similar *in vitro* culture subpassages (about 50 subcultures), which is known to decrease the efficiency of metacyclogenesis.

Complement-mediated lysis

Resistance to complement-mediated lysis by normal human serum was determined using protocol already described (4). Briefly, stationary phase promastigote populations were treated for 1 h at 25°C with increasing concentrations (2.5%, 5% and 10%) of normal human serum and heat-inactivated human serum as control. To estimate the percentages of viability, the MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) micromethod yet described was used (22).

Evaluation of infection in mice. Stationary phase promastigotes (6-7 days old) of clones LaR5CL1, LaR15CL1 and LaWTCL1 were washed twice in 0.01 M phosphate-buffer saline (PBS; pH 7.2). 5×10^7 parasites were inoculated subcutaneously into the right hind footpads of female BALB/c mice (6 to 8 weeks old, 6 animals per group), the left paw serving as control. The course of infection was monitored by measuring at the times designated in Results section the increase in footpad thickness, compared to the uninfected left footpad, with a direct-reading vernier caliper. After 10 weeks of infection, mice were sacrificed and sera were collected.

***Leishmania*-macrophage interactions.** *In vitro* infection of mouse peritoneal macrophages with promastigote forms was performed as described before (11). Briefly, 2.5×10^5 normal resident peritoneal exudate cells from BALB/c mice in RPMI 1640 medium (Gibco BRL) with 10% heat-inactivated FCS, 5 U heparin per ml, 25 mM HEPES, 200 U per ml penicillin and 200 μ g per ml Streptomycin were allowed to adhere to 12 mm diameter glass coverslips placed into 24-well culture plates (NUNC, Roskilde, Denmark) at 37°C in 5% CO₂. After 4 h incubation, the non-adherent cells were removed by washing and the remaining macrophages were infected with stationary phase promastigote forms (6-7 days old) at an approximate 5:1 parasites/cell ratio. After 1 h incubation, the wells were rinsed with RPMI 1640 medium to remove free parasites and cultures were left at 37°C for additional periods (24, 48 and 72 h). To study the attachment of stationary phase promastigotes to macrophages, parasites were added to the wells containing macrophages at a ratio of 2 promastigotes/cell and their binding and

internalization were examined after 15, 30, 45 and 60 min incubation periods. At each time point, coverslips were fixed with methanol and stained with Giemsa. For each experiment, over 500 cells were counted in duplicate to determine the number of parasites per macrophage and the percentage of infected macrophages.

Preparation of parasite lysates and immunoblotting. Promastigotes at the stationary phase of growth and amastigotes derived from promastigotes growing *in vitro* at 3-days differentiation were collected by centrifugation at 2000 x g and 4 °C for 10 min, and washed three times by resuspension in PBS (pH 7.2) and further centrifugation. Pelleted parasites were solubilized in a lysis buffer containing 50 mM Tris and 0.1 % Triton X-100, pH 8 and left 20 min at 4 °C. Detergent extract was then centrifuged at 5000 x g for 20 min at 4 °C to remove cell debris, and the supernatant was used. Protein concentration was determined according to Bradford method using bovine serum albumin (Sigma) as standard. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out under reducing conditions in 1-mm-thick 10% polyacrylamide slab gels according to Laemmli (12). Wells were loaded 15 µg of protein. Western blot analyses were performed as previously described (27). Briefly, protein samples resolved by SDS-PAGE were electrophoretically transferred to 0.45 µm pore size nitrocellulose membrane (Amersham) and subsequently blocked in Tris buffered saline (TBS- 10 mM Tris, HCl, 150 mM NaCl, pH 7.2) containing 5 % fat milk powder (TBSm). The membranes were incubated overnight at 4 °C with normal and immune mouse sera, respectively, diluted 1:300 in TBSm. After three (5-min) washes in TBSm, the bound antibodies were detected with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma) diluted in TBSm, for 2 h. After new cycles of washes, the immune complexes were revealed by addition of H₂O₂ and 4-chloro-1-naphtol. The reaction was stopped with deionized water.

Transmission electron microscopy. Amastigote forms of *L. amazonensis* were fixed in 0.1 M Sorensen phosphate buffer (pH 7.2) containing 2.5% glutaraldehyde for 2 h at 4°C, washed twice in 0.175 M Sorensen phosphate (pH 7.2) and post fixed in 0.1 M Sorensen phosphate-buffer (pH 7.2) with 1% (w/v) OsO₄ for 1 h at room temperature. The samples were dehydrated in ethanol and embedded in araldite resin. Ultrathin

sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined on Hitachi electron microscope.

DNA agarose gel electrophoresis. Qualitative analysis of DNA fragmentation was performed as previously described (7) by agarose gel electrophoresis of DNA extracted from 5×10^8 recently transformed amastigotes. Cells pellets were incubated in lysis buffer (10 mM Tris, 10 mM EDTA, 1% Triton X100, pH7.4) for 30 min at 4°C. The mixture were then submitted to proteolysis (Proteinase K, 2 µg/ml final concentration, Boehringer Mannheim) for 2 h at 50°C and lysates centrifuged at 18000 x g for 30 min at 4°C. DNA from supernatants, purified by the phenol-chloroform extraction method, was precipitated in the presence of 0.5 M NaCl (final concentration) and one volume isopropanol. After washing by 70% ethanol, DNA was air-dried, dissolved in 10 µl distilled water and electrophoresed in the presence of 1 µl migration buffer (40 mM Tris, 20 mM Natrium acetate, 1 mM EDTA, pH 8 (TAE) 50% glycerol) on 2% agarose gel in TAE buffer for 2 h at 100V. DNA was then visualised under UV light after gel staining with ethidium bromide.

Statistical analysis. This was performed by the student's t-test. The level of significance was indicated when appropriate (*P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001). At least three experiments in triplicate were performed.

Results and Discussion

Course of *in vitro* developmental life cycle of *Leishmania* wild-type and resistant parasites. In a first step we have selected pentamidine-resistant promastigotes of *L. amazonensis* using the protocols we have described in previous reports (23, 24). Resistance indexes (IRs: IC₅₀ after drug pressure/IC₅₀ before drug pressure) of 34 for clone LaR5CL1 and 54 for clone LaR15CL1 were determined after drug selection. Both resistant promastigote clones were able to grow in long-term cultures in the presence of their respective pentamidine concentrations. Using the LaR5CL1, LaR15CL1 and the wild type parental clone, we reproduced their complete developmental sequence in axenic culture by manipulation of appropriate culture conditions (13, 23, 24). During the drug resistance acquisition, chemoresistant promastigotes grew more slowly than the wild-type ones. However, after drug resistance stabilization, both resistant and sensitive promastigotes exhibited a similar doubling time and their viability was not affected (data not shown), suggesting they differentiated in a similar manner. In order to examine the efficiency of metacyclogenesis, complement-mediated lysis experiments were performed on wild-type and LaR15CL1 stationary phase promastigotes. As shown in Fig. 1A, when they were treated with increasing concentrations of human serum, no significant difference of percentages of stationary phase promastigote viability was observed between chemoresistant and wild-type clones, demonstrating that they were developmentally similar with respect to the proportions of metacyclic forms. Reproducing *in vitro* the developmental sequence from promastigote to amastigote in axenic cultures, both resistant promastigote clones were fully differentiated into axenic amastigotes in the absence of pentamidine (Fig. 1B). However, the velocity of phenotypic transformation in the case of LaR5CL1 and LaR15CL1 appeared greater than that from the parental wild-type parasites. Indeed, after 24 h of incubation more than 50% of the mutant populations were differentiated into amastigote forms, whereas only a minor fraction (<20%) of the parental clone had achieved morphological transformation. Although the differentiation rates of the various clones were similar and reached 100% at later incubation periods (e.g, 72 and 96 h), the differences were still statistically significant after 48 h of culture. Interestingly, the capacity of promastigotes to undergo rapid phenotypic transformation seemed to be related to the level of

chemoresistance induced. Indeed, at 24 h of incubation, the rate of LaR15CL1 morphological transformation was significantly higher than that of LaR5CL1.

The capacity of the parasites to proliferate under established axenic culture condition was also examined during the transition from promastigote to amastigote but also after the first extracellular amastigote subculture. As shown in Fig. 2, during the differentiation process, parasites derived from the wild-type promastigote clone proliferated substantially leading to an increase in amastigote numbers. In contrast, resulting LaR5CL1 and LaR15 CL1 parasites exhibited a striking pattern of growth. Indeed, low levels of growth were observed for both LaR5CL1 and LaR15CL1 amastigotes (about 75 and 90 % of inhibition, respectively). It is unlikely that the growth arrest could have resulted from the density of parasites, since the initial promastigote inoculums were of the same order as those used for the wild-type clones. Another possible factor acting on the parasite proliferation could be the conditioned medium. In order to investigate this, we carried out complementary experiments in which resulting viable amastigotes were resuspended at day 4 at concentrations equal to $3 \times 10^6/\text{ml}$ in fresh MAA/20 medium. As shown in Fig. 2, this led to a re-growth of amastigotes-derived from wild-type promastigote clones whereas resulting amastigotes derived from LaR5CL1 and LaR15 CL1 parasites failed to proliferate. These results were consistent with the finding that proliferation and differentiation processes during *Leishmania* developmental life cycle are essential to the parasite survival and instrumental to the propagation of the disease.

Uptake, internalization and intracellular survival during interactions of *Leishmania* wild-type and mutants promastigotes with murine macrophages. We first examined the capacity of the mutants and the wild-type parental clone to bind to the cell. In order to minimize the parasite internalization, we allowed the parasites and macrophages to interact at a ratio of 2 stationary phase promastigotes/cell for periods ranging from 15 min to 1h. As shown in Fig. 3, although the percentages of macrophages with attached promastigotes were comparable at different incubation times between clones (Fig. 3A), the drug-resistant cell lines presented higher rates of attachment to host cell (LaR5CL1>LaR15CL1>wild type) as demonstrated by the number of parasites attached to macrophage (Fig. 3B). Moreover, the ability of the different promastigote populations to invade macrophages was also examined by determining the percentage of infected macrophages and the number of internalized

parasites per cell. As shown in Fig. 4A, the percentage of drug-resistant parasites-infected macrophages remained higher than those observed with wild-type parasite-infected cells over the incubation periods. Furthermore, the number of LaR5CL1 and LaR15CL1 mutants taken up by macrophages remained always higher than that observed with wild-type parasites (Fig. 4B).

The survival of stationary phase promastigotes in the host cell were investigated at an approximate 5:1 parasite/cell ratio after 24-h, 48-h and 72-h incubation periods. Surprisingly, a significant decrease in the percentage of infected macrophages was observed in the case of LaR5CL1 or LaR15CL1 parasites (Fig. 5A). Furthermore, infection with resistant promastigotes showed an important reduction in the number of intracellular amastigotes when compared to wild type parental clone (Fig. 5B). These observations suggest that the mutants have lost part of the original cellular invasiveness capacity of the parental clone.

Course of wild-type and mutants of *L. amazonensis* infection in mice. In order to assess more accurately the loss of virulence of the mutants, we conducted *in vivo* challenge infections in BALB/c mice using LaR5CL1, LaR15CL1 and the parental wild-type clone. As shown in Fig. 6, the lesions in BALB/c mice infected with *L. amazonensis* wild-type promastigotes rapidly increased in size, reaching a maximum (about 8 mm) by 10 weeks of infection. In contrast, footpad lesions only began to appear after the 6th week, after challenge infection, and were significantly smaller in BALB/c mice infected with the mutant LaR5CL1 when compared to mice inoculated with the wild-type clone. The mice which received LaR15CL1 promastigotes failed to establish infection as demonstrated by the absence of apparent signs of lesion development. These data support the notion of LaR5CL1 and LaR15CL1 promastigotes have lost the virulence phenotype of the parental wild-type clone. The different virulence characteristics of the stationary promastigote populations were not due to differences in the number of metacyclics present since we demonstrated above that they were developmentally similar with respect to the proportion of metacyclic forms. Moreover the infectivity of chemoresistant promastigotes gradually decreased as a function of the level of resistance induced. This data strongly supports the hypothesis that the loss of infectivity was directly related to the drug resistance induced.

Amastigotes derived from LaR5CL1 and LaR15CL1 promastigotes present ultrastructural and molecular features of apoptosis. In an attempt to understand the molecular events leading to the amastigote growth arrest, cells were subjected to morphological analyses and DNA fragmentation. As shown in Fig. 7A, transmission electron microscopy analysis shows that amastigotes derived from LaR5CL1 promastigotes are undergoing morphological changes typical of apoptosis when compared to the amastigotes derived from the wild-type parental clone (Fig. 7B). These include distinctive margination and condensation of chromatin also observed in the case of LaR15CL1 (Fig. 7A insert), increase in lipid bodies, and many intracytoplasmic electron-dense deposits which are in certain cases inclosed inside cytoplasmic vesicles. It is likely that these large electron dense material might correspond to amastigote corpses engulfed by living parasites. Previously published data have suggested the presence of an autophagy in the case of certain trypanosomes (28). Furthermore, it is well documented that dying cells are usually cleared by macrophages in tissues where rapid turnover occurs (10). Therefore, it is possible that *Leishmania* parasite might have developed similar practice to prevent an inflammatory response that could be detrimental for both the host and the parasite. Although, we have originally described the existence of an apoptosis phenotype in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes (2), we did not keep attention to the possible ways of elimination of dead cells. Indeed, careful examination of electron microscopy pictures of *T. cruzi* epimastigotes undergoing apoptosis showed the presence of intracellular electron dense material inside vesicles resembling those observed in the case of *Leishmania* amastigotes (Fig. 7C). DNA fragmentation into oligonucleosomal-sized pieces was readily visible in the case of amastigotes derived from LaR5CL1 and LaR15CL1 promastigotes (Fig. 8, lanes 3 and 4, respectively). In the case of amastigotes derived from the wild-type promastigotes, the fragmentation was barely detected (Fig. 8, lane 2). These results indicated that the selective pentamidine pressure had induced the emergence of parasites which following the transition from promastigotes to amastigotes activate a putative intrinsic cell-suicide programme leading to the growth suppression of the cells that fail to progress through the *Leishmania* life cycle.

The experimental findings in the model of *T. cruzi* and recent observations in the case of *L. amazonensis* promastigotes and *Trypanosoma brucei* (2, 15, 29), indicated that the cell death program and machinery required to induce apoptosis are likely to be present in these unicellular organisms. However, up to now no evidence indicating the

presence of an apoptotic phenotype in the vertebrate stage of the parasite has been reported. In our knowledge, this is the first report showing that, indeed, PCD also exists in vertebrate stage of *Leishmania* parasites (e.g. amastigotes). The phenotype expression of the cell suicide programme in the model we have developed, is dependent upon drug selection combined to the use of external factors (culture conditions) which permit the triggering of the differentiation process.

Analyses of the antibody responses of LaR5CL1 or LaWTCL1-infected mice. Sera from each group of infected mice were examined by Western blot analyses for antibodies to the total extracts of either wild-type promastigotes or mutants. Surprisingly, sera from mice infected with LaR5CL1 promastigotes, when reacted against total extracts from either wild-type or mutant parasites, revealed only a major band of about 43 kDa molecular mass (Fig. 9B, lanes 4, 5 and 6). In contrast, the same antigens when reacted against sera from mice infected with the wild-type parental clone, revealed a larger number of polypeptides of molecular mass 79, 62, 45, 43 and 24 kDa, respectively (Fig. 9A, lanes 1, 2 and 3). These results suggest that, although the chemoresistant promastigotes have antigenic constitution similar to the wild-type parasites, the immune system of the host recognized only minor set of antigenic components following challenge infection with drug-resistant promastigotes. In order to clarify what role parasites undergoing apoptosis could play in the restricted recognition of antigenic components by the host immune system, the Western blots were performed using amastigote antigens. The immunoreactive profiles obtained when sera from wild-type infected mice were reacted against total extracts from amastigotes derived from resistant or wild-type promastigotes were significantly different from those observed when using promastigote total extracts. Sera from mice infected with parental wild-type clone revealed a large number of wild-type amastigote antigens having molecular mass of 65, 63, 60, 51, 45, 43, 38, 30 and 20 kDa, respectively (Fig. 9C, lane 1) whereas only three weaker bands of 63, 45 and 43 kDa could be visualized when mutant amastigotes were used as antigen (Fig. 9C, lanes 2 and 3). Moreover, amastigote antigens from wild-type clone when reacted against sera from LaR5CL1 infected mice revealed a minor set of antigenic components (63, 43 and 38 kDa) which were weakly expressed by the mutant amastigote antigens when compared to the parental wild-type clone (Fig. 9D, lanes 4, 5 and 6). Collectively these results suggested that the weaker bands observed when antigens from parasites undergoing apoptosis reacted with sera from the LaR5

infected mice may represent amastigote components that are readily degraded and consequently not efficiently presented to the immune system in the case of resistant parasites. The major bands observed for both wild-type and drug-resistant organisms should be immunodominant. Consequently in apoptotic and/or dying parasites, due to the failure to grow/persist as amastigotes, an immune response to the other components, seen for the wild-type parasites does not fully develop in the case of the drug-resistant parasites.

In summary, our data provide, for the first time, evidence that the PCD programme also exists in the vertebrate stage of *Leishmania* parasite, and thus could be operational *in vivo*. Interestingly, apoptotic phenotype seems to be restricted to a subpopulation of amastigotes. The switch to a non dividing population would ensure the maintenance of a low parasitaemia inside macrophages, without death of the host. Evidence is presented linking the decreased virulence of pentamidine resistant promastigotes to their programmed cell death as intracellular amastigotes.

The restricted recognition of the antigenic components of parasites undergoing apoptosis by the host immune system might be explained by a relative immunological silent state of macrophages following the ingestion of apoptotic amastigote forms, which is well known in the case of apoptotic mammalian cell ingestion by macrophages (6). An alternate explanation is supported by the data obtained. We suggest that in apoptotic and/or dying amastigotes, some antigenic components are readily degraded, will not persist due to the failure of parasites to survive inside macrophages and thus will not be efficiently presented to the host immune system. Only an immune response to the immunodominant antigens could be fully developed in the case of drug-resistant promastigotes.

In mammalian cells much work have been devoted to the understanding of intracellular mechanisms of PCD and their control (9, 10). The model we have developed could be a useful tool to explore, at the molecular level, the genes and their polypeptide products responsible for the acquisition of the apoptotic phenotype.

References

1. **Alexander, J., and D. G. Russel.** 1992. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv. Parasitol.* **31**: 175-254.
2. **Ameisen, J. C., T. Idziorek, O. Billaut-Mullot, J. P. Tissier, A. Potentier, and A. Ouaisi.** 1995. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implication for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell. Death. Differ.* **2**: 285-300.
3. **Antoine, J. C., E. Prina, C. Jouanne, and P. Bongrand.** 1990. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect & Immun.* **58**:779-787.
4. **Bandyopadhyay, P., D.K. Ghost, A. De, K.N. Ghost, P.P. Chaudhuri, P. Das, and A. Bhattacharya.** 1991. Metacyclogenesis of *Leishmania* spp : species-specific *in vitro* transformation, complement resistance, and cell surface carbohydrate and protein profiles. *J. Parasitol.* **77**:411-416.
4. **Chang, K. P.** 1983. Cellular and molecular mechanism of intracellular symbioses in leishmaniasis. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* **14**: 267-305.
5. **Chang, K.P., G. Chaudhuri, and D. Fong.** 1990. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Ann. Rev. Microbiol.* **44**: 499-529.
6. **Cohen, J. J.** 1993. Apoptosis. *Immunol. Today.* **14**: 126-130.
7. **Estaquier, J., T. Idziorek, F. De Bels, F. Barré-Sinoussi, B. Hutrel, A. M. Aubertin, A. Venet, M. Methali, E. Muchmore, P. Michel, M. Girard, and J. C. Ameisen.** 1994. Programmed cell death and AIDS: the significance of T-Cell apoptosis in pathogenic and non pathogenic primate lentiviral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 9431-9435.

8. Glaser, T.A., J. E. Baatz, G.P. Kreishman, and A. J. Mukkada. 1988. pH homeostasis in *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **85**: 7602-7606.
9. Jacobson, M. D. 1997. Apoptosis: Bcl-2-related proteins get connected. Current. Biology. **7**: R277-R281.
10. Jacobson, M. D., M. Weil, and M. C. Raff. 1997. Programmed cell death in animal development. Cell. **88**: 347-354.
11. Kweider, M., J. L. Lemesre, F. Darcy, J.P. Kusnierz, A. Capron, and F. Santoro. 1987. Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65,000-dalton surface antigen. J. Immunol. **138**: 299-305.
12. Laemli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**: 680.
13. Lemesre, J. L. May 1994. Methods for the culture *in vitro* of different stages of tissue parasites. International publication N° WO 94/26899.
14. Lemesre, J.L., D. Sereno, S. Daulouède, B. Veyret, N. Brajon, and P. Vincendeau. 1997. *Leishmania* spp: Nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically-grown amastigote forms. Exp. Parasitol. **86**: 58-68.
15. Moreira, M. E., H. A. Del Portillo, R. V. Milder, J. M. Balanco, and M. A. Barcinski. 1996. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. J. Cell. Physiol. **167**: 305-313.
16. Mosser, D. M., and L. A. Rosenthal. 1993. *Leishmania*-macrophages interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. Sem. Cell. Biol. **4**: 315-322.

- 17. Mukkada, A. J., J. C. Maede, T. Glaser, and P. V. Bonventre.** 1985. Enhanced metabolism of *Leishmania donovani* amastigote at acidic pH: an adaptation for intracellular growth. *Science*. **229**: 1099-1101.
- 18. Opat, A., K. Ng, G. Currie, E. Handman, and A. Bacic.** 1996. Characterization of lipophosphoglycan from a ricin-resistant mutant of *Leishmania major*. *Glycobiology*. **6**: 387-397
- 19. Panaro, M. A., M. Panunzio, E. Jirillo, A. Marangi, and O. Brandonosio.** 1995. Parasite escape mechanisms: the role of *Leishmania* lipophosphoglycan on the human phagocyte functions. A review. *Immunopharmacol & Immunotoxicol*. **17**: 595-605.
- 20. Rizvi, F.S, A. Ouaisi, B. Marty, F. Santoro, and A. Capron.** 1988. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a fibronectin-like molecule. *Eur. J. Immunol*. **18**: 473-476
- 21. Schneider, P., C. Bordier, and R. Etges.** 1992. Membrane proteins and enzymes of *Leishmania*. *Subcell. Biochem*. **18**: 39-72
- 22. Sereno, D., and J. L. Lemesre.** 1997. Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob. Agents & Chemother*. **41**: 972-976.
- 23. Sereno, D., and J. L. Lemesre.** 1997. *In vitro* life cycle of pentamidine-resistant amastigotes: stability of the chemoresistant phenotypes is dependent on the level of resistance induced. *Antimicrob. Agents & Chemother*. **41**: 1898-1903.
- 24. Sereno, D., P. Michon, N. Brajon, and J. L. Lemesre.** 1997. Phenotypic characterization of *Leishmania mexicana* pentamidine-resistant promastigotes: modulation of the resistance during developmental life cycle. *C. R. Acad. Sci*. **320**: 981-987.

- 25. Shankar, A., T. K. Mitchen, L. R. Hall, S. J. Turco, and R. G. Titus.** 1993. Reversion to virulence in *Leishmania major* correlates with expression of surface lipophosphoglycan. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**:207-216
- 26. Talamas-Rohana, P., S. D. Wright, M. R. Lennartz, and D. G. Russel.** 1990. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150, 95 and LFA-1 family of Leukocyte integrins. *J. Immunol.* **144**: 4817-4824.
- 27. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **76**: 4350-4354
- 28. Vickerman, K., and B. P. Eyden.** 1973. Some problems in interpreting electron micrographs of trypanosomes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **67**:275.
- 29. Welburn, SC., M. A. Barcinski, and G. T. Williams.** 1997. Programmed cell death in trypanosomatids. *Parasitol. Today.* **13**: 22-26.
- 30. Wilson, M.E., and R.D. Pearson.** 1986. Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. *J. Immunol.* **136**: 4681-4688.

Legends to figures

FIG. 1. (A) Efficiency of metacyclogenesis of *L. amazonensis* promastigote populations. Wild-type and LaR15CL1 stationary phase promastigotes were treated with increasing concentrations of human serum. Results are given as a mean percentage of viability.

(B) Kinetic of morphological transformation of *L. amazonensis* wild-type (LaWTCL1) and both pentamidine-resistant promastigotes (LaR5CL1 and LaR15CL1) under axenic-amastigotes culture conditions. The parasite forms were determined after Giemsa staining as described in Materials and Methods section. Results are given as a mean percentage of differentiation.

FIG. 2. *In vitro* growth curves of *L. amazonensis* wild-type (LaWTCL1) and pentamidine-resistant amastigote clones (LaR5CL1 and LaR15CL1) in axenic cultures. After 4 day culture, amastigotes were resuspended at a concentration of 3×10^6 parasites per ml in fresh medium. This led to the re-growth of the wild-type parasite culture. Each point represent the mean value of triplicate determination +/- SD.

FIG. 3. Comparative binding of *L. amazonensis* wild-type (LaWTCL1) and both pentamidine-resistant clones (LaR5CL1 and LaR15CL1) to monolayer of mice peritoneal macrophages. (A) The percentage of macrophages with at least one parasite attached. (B) The mean number of promastigotes attached per macrophage. The value represent the mean of one experiment from two independent assays carried out in duplicate.

FIG. 4. Comparative internalization of *L. amazonensis* wild type (LaWTCL1) and both pentamidine-resistant clones (LaR5CL1 and LaR15CL1) by mice peritoneal macrophages. (A) The percentage of macrophages with at least one parasite internalized. (B) The mean number of promastigotes per macrophage. The value represent the mean of one experiment from two independent assays carried out in duplicate.

FIG. 5. Comparative intracellular survival of *L. amazonensis* wild-type (LaWTCL1) and both pentamidine-resistant clones (LaR5CL1 and LaR15CL1). (A) The percentage

of infected macrophages showing at least one intracellular amastigotes. (B) The mean number of amastigotes per macrophage. The value represent the mean of one experiment from two independent assays carried out in duplicate.

FIG. 6. Course infection of *L. amazonensis* wild type (LaWTCL1) and both pentamidine-resistant clones (LaR5CL1 and LaR15CL1) in BALB/c mice. 5×10^7 stationary-phase promastigotes were injected in the left hind footpad of mice. Each point represents the mean difference in size $\pm$ SD, between infected and uninfected foot pad of 6 mice per group at each time point. The asterisk indicate statistically significant difference ($P < 0.001$) between mice injected with LaWTCL1 or pentamidine-resistant clones, respectively.

FIG. 7. Transmission electron microscopy analysis showing chemoresistant axenic amastigotes death by apoptosis. Wild-type, LaWTCL1 (B), chemoresistant clones LaR5CL1 (A) and LaR15CL1 (A, insert) amastigotes recently differentiated (day 3) were analysed. Arrows show nuclear chromatin and cytoplasmic features typical of apoptosis; arrowhead shows electron dense material inside vesicles. (C) *T. cruzi* epimastigotes undergoing apoptosis showing electron dense granules inside vesicles.

FIG. 8. DNA fragmentation analysis. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from 5×10^8 amastigotes from 3-days differentiation, LaWTCL1 (lane 2), LaR5CL1 (Lane3), LaR15CL1 (Lane 4).

FIG. 9. Immunoreactivity of total extracts of wild-type (lanes 3 and 4), LaR5CL1 (lanes 2 and 5) and LaR15CL1 (lanes 1 and 6) promastigotes (A and B) and total extracts from amastigotes harvested at 3-days differentiation derived from wild-type (lanes 1 and 4), LaR5CL1 (lanes 2 and 5) and LaR15CL1 (lanes 3 and 6) promastigotes (C and D) with either sera from mice infected with the wild-type promastigotes (LaWTCL1) (A and C) or sera from mice infected with pentamidine-resistant promastigotes (LaR5CL1) (B and D).

Figure 1

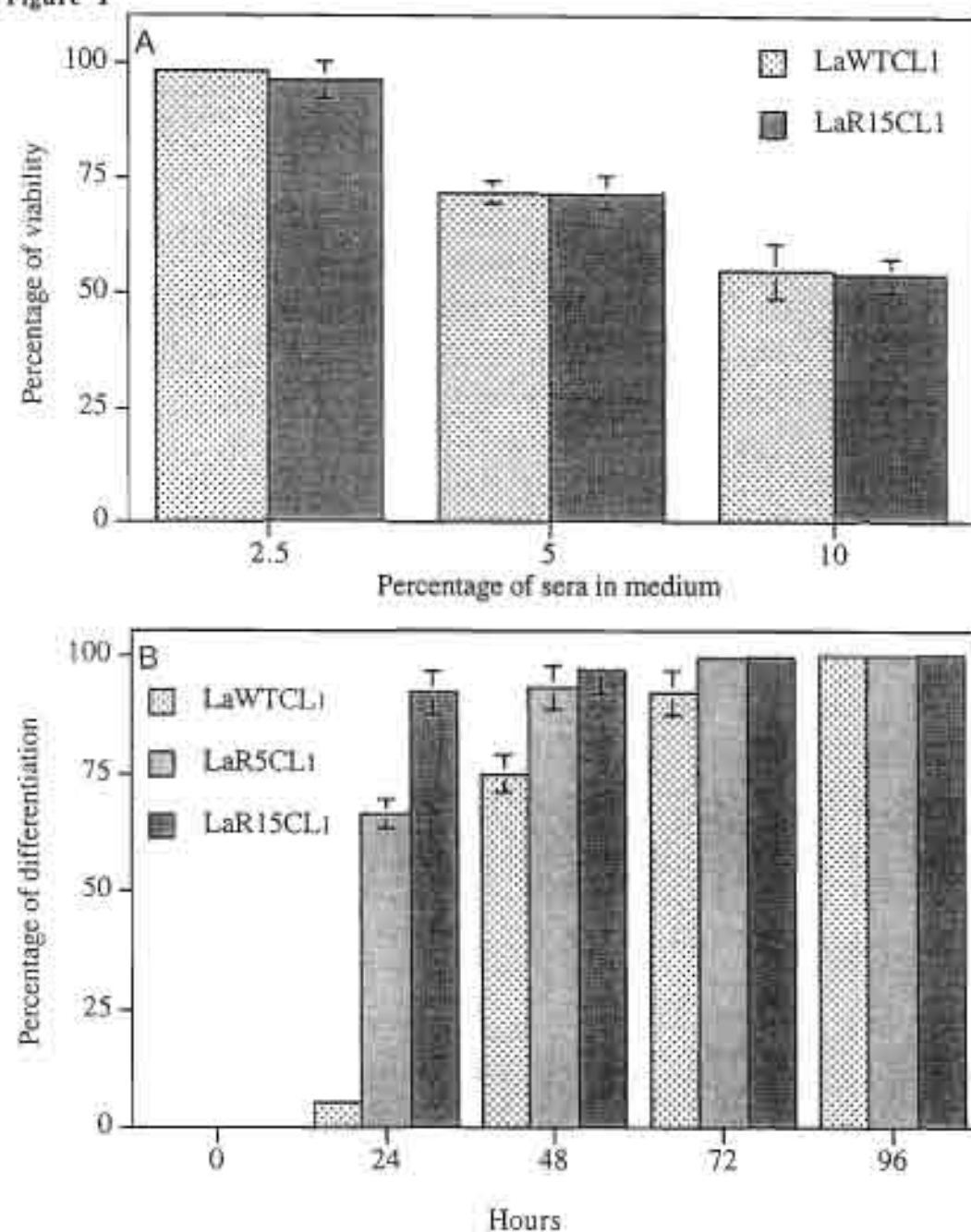


Figure 2

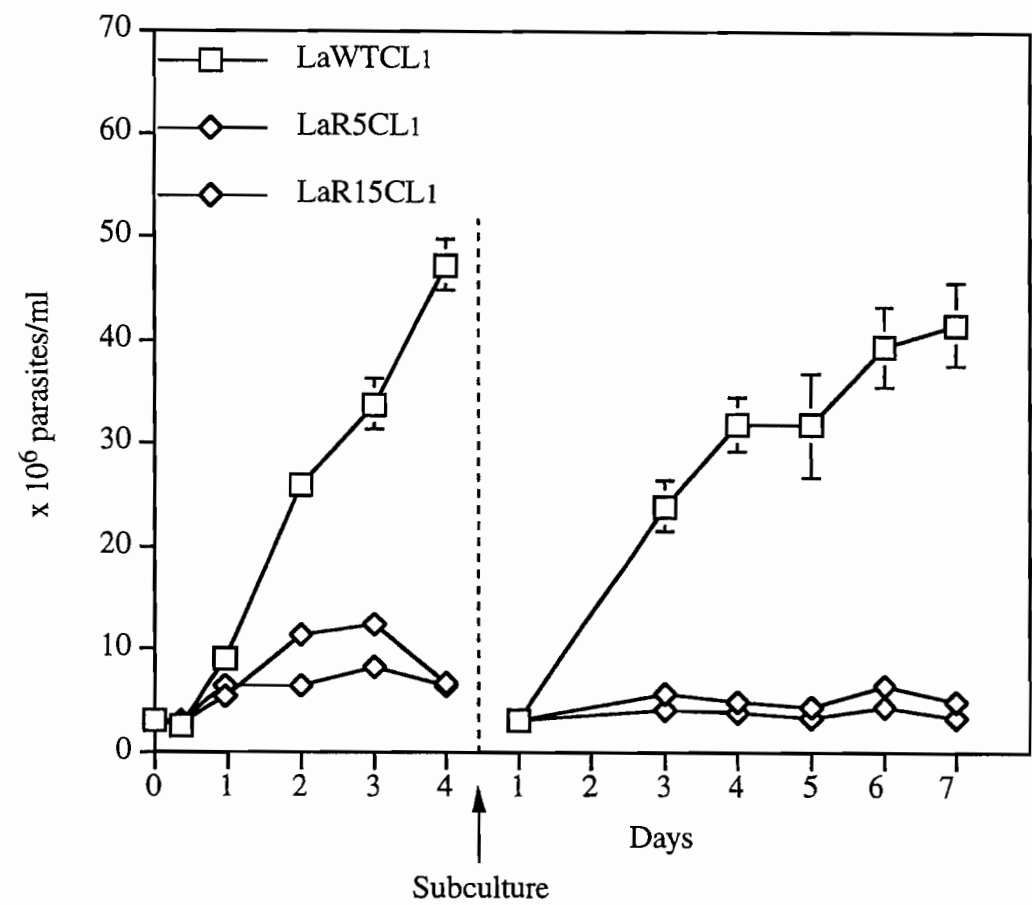


Figure 3 A & B

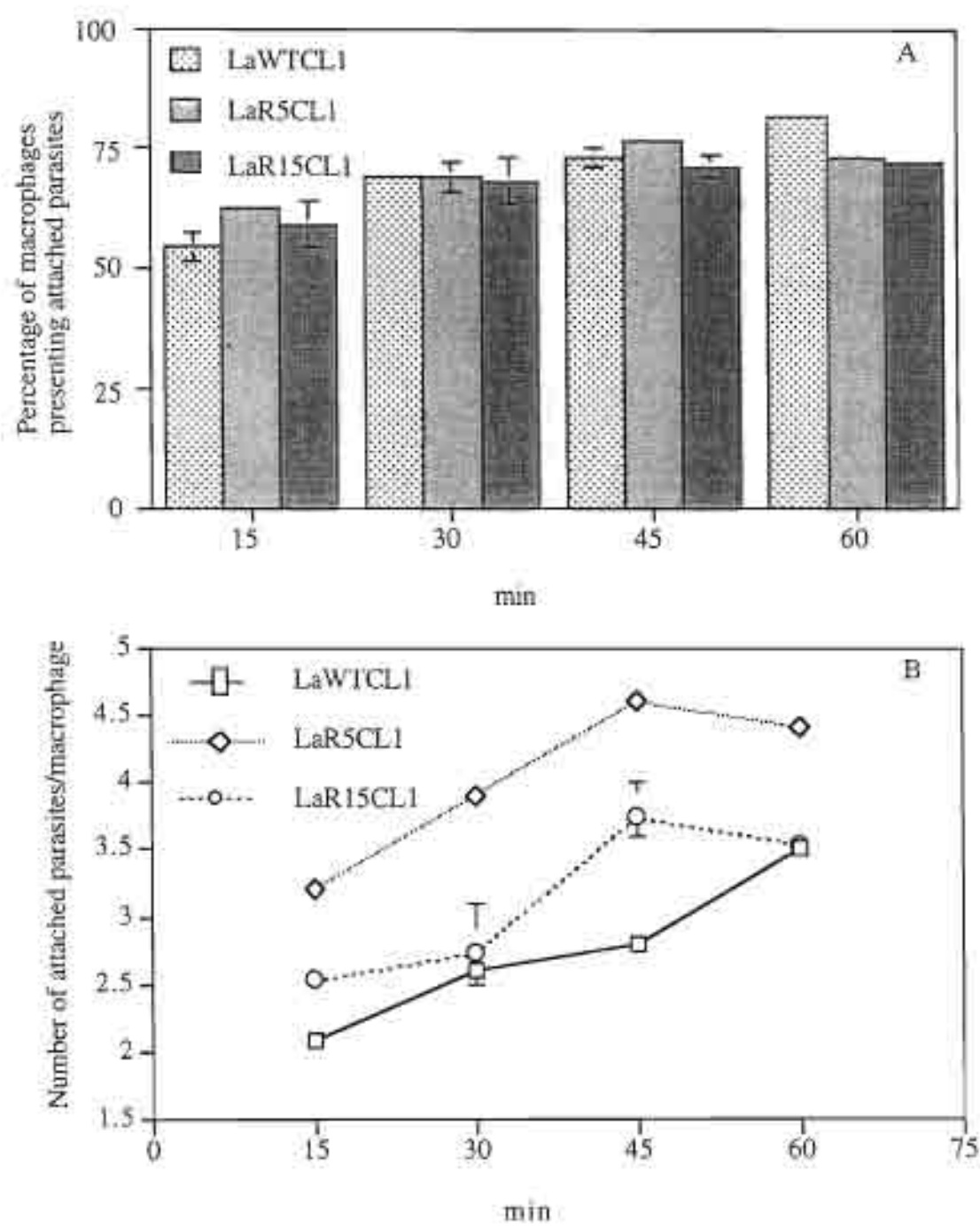


Figure 4 A & B

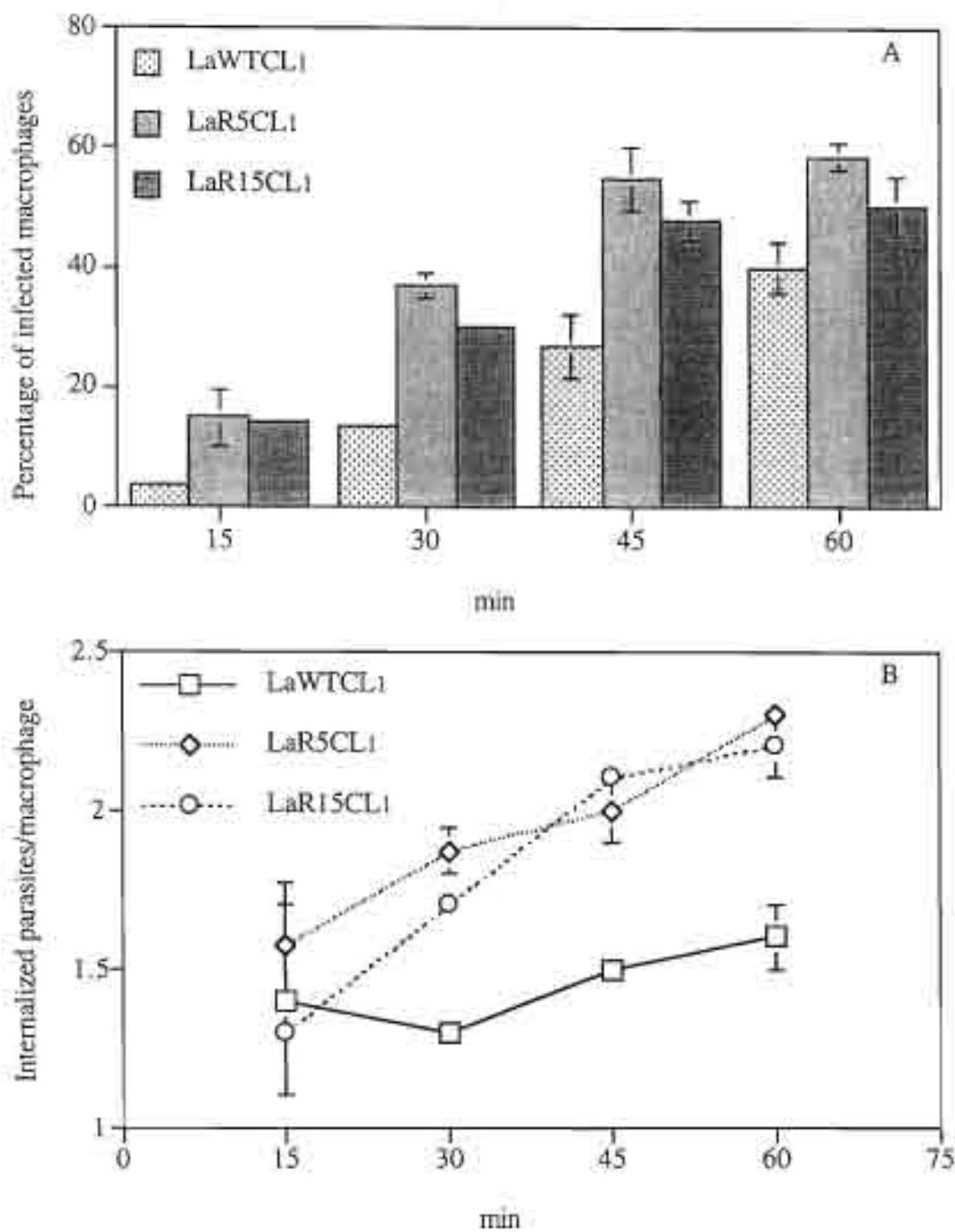


Figure 5 A & B

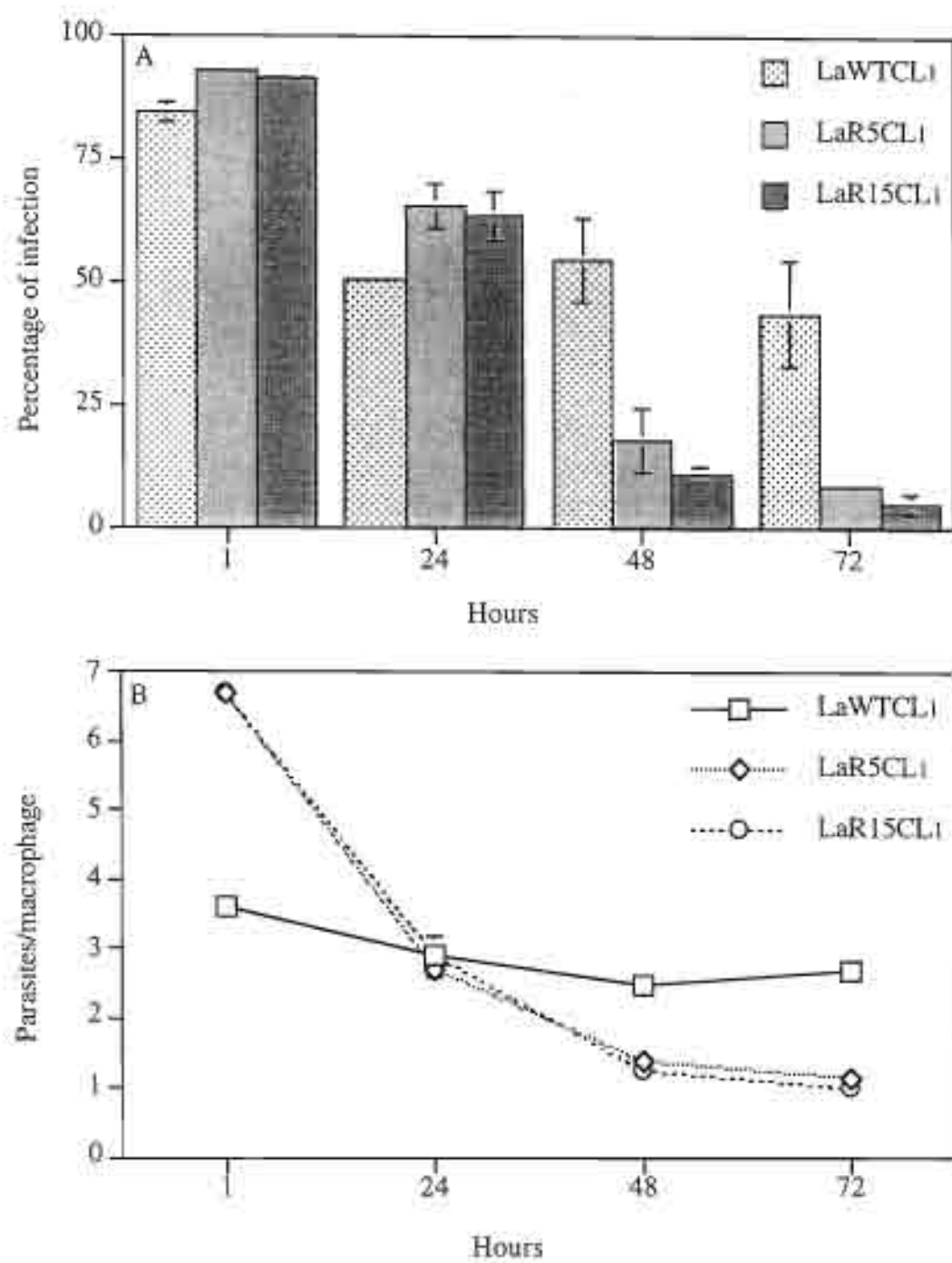


Figure 6

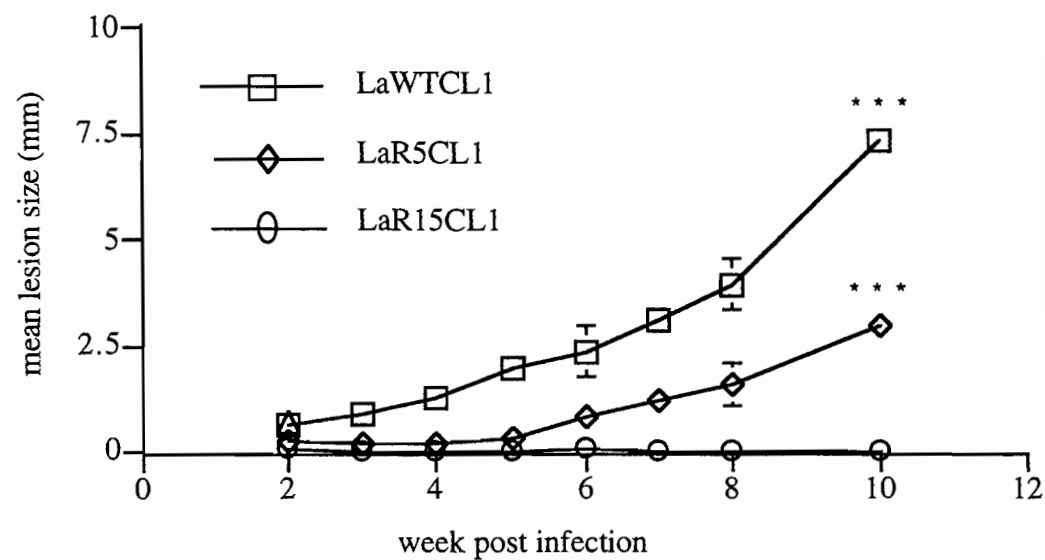


Figure 7

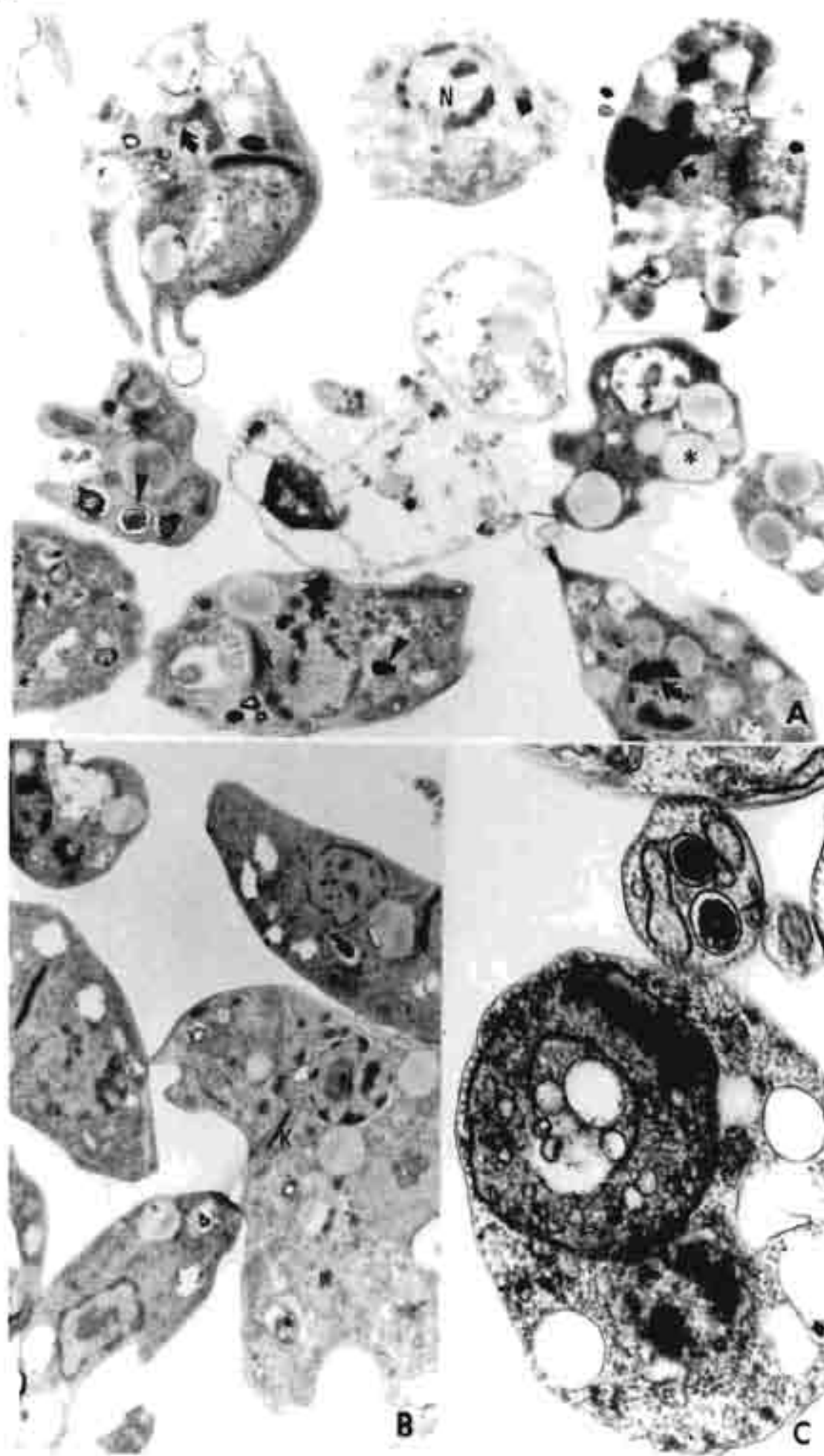


Figure 8

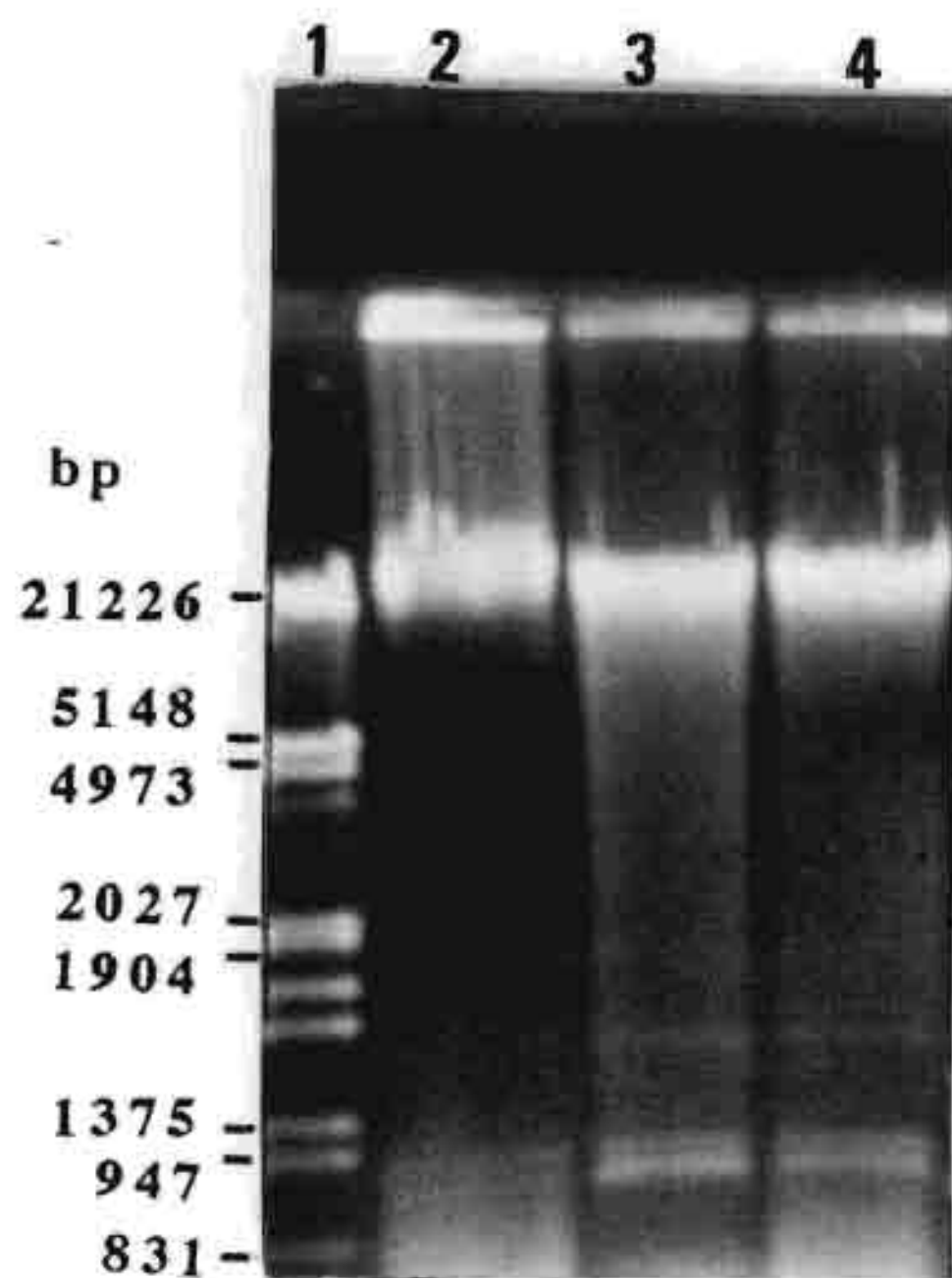
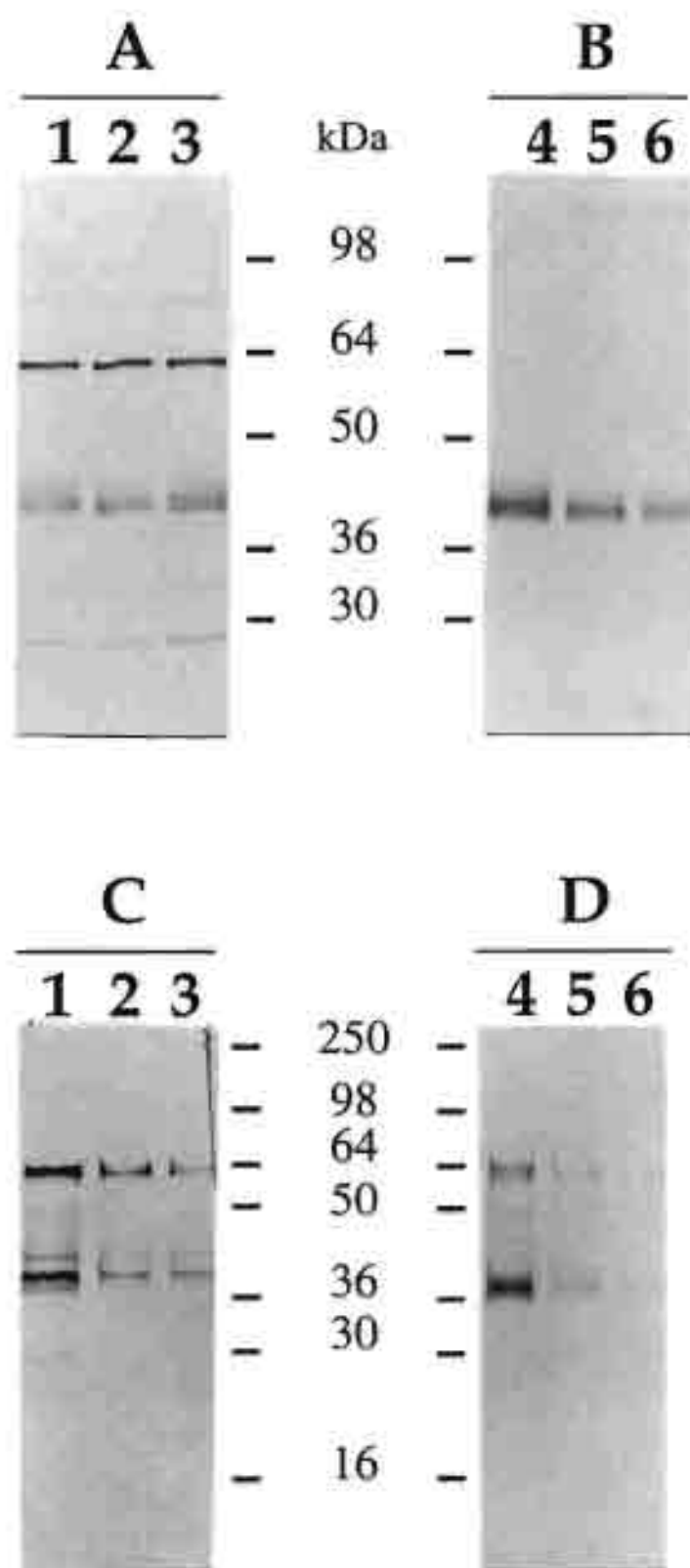


Figure 9



Article 5

Induction par l'antimoine de la fragmentation de l'ADN des formes amastigotes de *Leishmania infantum* (Accepté pour publication, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*).

Le traitement classique des leishmanioses consiste en l'injection de dérivés pentavalents de l'antimoine. De nombreux arguments sont en faveur d'une réduction par la cellule hôte de l'antimoine pentavalent Sb(V) en antimoine trivalent Sb(III) qui est hautement toxique pour les leishmanies. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la cytotoxicité de l'antimoine trivalent restent à déterminer. A travers l'analyse de l'ADN des parasites, notre étude a consisté à déterminer le type de mort cellulaire induite par l'antimonio tartrate de potassium [Sb(III)]. Une caractérisation de la ou des voies métaboliques impliquées dans cette mort cellulaire a été envisagée.

Principaux résultats :

① L'utilisation combinée de différentes techniques (analyse de l'ADN par électrophorèse en gel d'agarose, cytométrie de flux après marquage avec la sonde YOPRO-1 ou TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling), TUNEL *in situ*), nous a permis de montrer que les dérivés trivalents de l'antimoine étaient capables d'induire chez les formes amastigotes de *L. infantum*, une mort cellulaire caractérisée par une fragmentation de leur ADN en oligonucléosomes, événement tardif de l'ensemble des voies métaboliques du processus d'apoptose.

② Nous montrons à l'aide d'inhibiteurs spécifiques que l'activation d'endonucléases responsables de cette fragmentation, n'est sous le contrôle ni de caspases (protéases de l'apoptose), ni de protéases appartenant au complexe multicatalytique du protéasome.

La mise en évidence d'une mort cellulaire chez un protozoaire (eucaryote inférieur) tel que *Leishmania* ayant les caractéristiques phénotypiques de l'apoptose des eucaryotes supérieurs mais empruntant des voies métaboliques différentes, ouvre des perspectives intéressantes sur la découverte d'un phénomène de mort cellulaire programmée ancestral. Par

ailleurs, l'existence d'un processus de suicide cellulaire chez les leishmanies et la compréhension des mécanismes qui le régulent, pourraient aider à définir de nouvelles stratégies thérapeutiques, en particulier chez les mutants chimiorésistants.

Antimonial-Mediated DNA Fragmentation in *Leishmania infantum* Amastigotes

DENIS SERENO,¹ PHILIPPE HOLZMULLER,¹ ISABELLE MANGOT,¹ GÉRARD CUNY,³
ALI OUAISSI,² AND JEAN-LOUP LEMESRE^{1*}

Laboratoire de Biologie Parasitaire,¹ CJF-INSERM N°96/04,² and Laboratoire de Parasitologie
et Entomologie Moléculaire,³ Centre IRD (Institut de Recherche pour le Développement),
34032 Montpellier Cedex 1, France

Received 30 November 2000/Returned for modification 25 January 2001/Accepted 2 April 2001

The basic treatment of leishmaniasis consists in the administration of pentavalent antimonials. The mechanisms that contribute to pentavalent antimonial toxicity against the intracellular stage of the parasite (i.e., amastigote) are still unknown. In this study, the combined use of several techniques including DNA fragmentation assay and in situ and cytofluorometry terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling methods and YOPRO-1 staining allowed us to demonstrate that potassium antimonyl tartrate, an Sb(III)-containing drug, was able to induce cell death associated with DNA fragmentation in axenic amastigotes of *Leishmania infantum* at low concentrations (10 µg/ml). This observation was in close correlation with the toxicity of Sb(III) species against axenic amastigotes (50% inhibitory concentration of 4.75 µg/ml). Despite some similarities to apoptosis, nuclease activation was not a consequence of caspase-1, caspase-3, calpain, cysteine protease, or proteasome activation. Altogether, our results demonstrate that the antileishmanial toxicity of Sb(III) antimonials is associated with parasite oligonucleosomal DNA fragmentation, indicative of the occurrence of late events in the overall process of apoptosis. The elucidation of the biochemical pathways leading to cell death could allow the isolation of new therapeutic targets.

Leishmaniasis is a significant cause of morbidity and mortality in several countries. A vertebrate host is infected with flagellated extracellular promastigote forms via the bite of a sand fly. Promastigotes are rapidly transformed into nonflagellated amastigotes dividing actively within the mononuclear phagocytes of the vertebrate host. The basic treatment consists in the administration of sodium stibogluconate (Pentostam), meglumine (Glucantime), pentamidine, or amphotericin B. Treatment failure, especially for kala-azar, mucosal leishmaniasis, and diffuse cutaneous leishmaniasis is becoming a common problem in many areas where leishmaniasis is endemic. Immunological, physiological, or pharmacological deficiencies in the host are possible explanations for variations in clinical response (29). But there is evidence that inherent lack of susceptibility and (or) the development of resistance can also contribute to parasite unresponsiveness to drugs (13, 18, 23, 28, 39, 40). The mode of action of pentavalent antimonials remains poorly understood (3, 4, 5). An in vivo metabolic conversion of pentavalent antimonial [Sb(V)] into trivalent ones [Sb(III)] was suggested more than 50 years ago by Goodwin and Page (15, 16). This hypothesis was supported by the high toxicity of trivalent antimony against both parasite stages of different *Leishmania* species (10, 14, 26, 31, 34). Recently, we and other investigators have shown that axenically grown amastigotes of *Leishmania* represent a powerful model to investigate drug activity on the active and dividing population of the mammalian parasite stage (7, 34). We have shown that potassium antimonyl tartrate [containing Sb(III)] was gener-

ally more toxic than pentavalent antimony [Sb(V)] for both parasite stages of different *Leishmania* species and demonstrated that the extracellular amastigotes of *Leishmania infantum* were the *Leishmania* species most susceptible to Sb(III) (35). Moreover, in vitro-selected Sb(III)-resistant axenic amastigotes expressed a strong cross-resistance to meglumine when growing in THP-1 cells (37). A stage-specific susceptibility of amastigotes towards antimonials has also been proposed. This hypothesis is based on the assumption that amastigotes of *Leishmania donovani* are able to reduce pentavalent antimonial into a trivalent one (11, 12).

There are now increasing numbers of reports of single-celled organisms that kill themselves by a mechanism whose activation is not obligatory but can be used in threatening situations (i.e., apoptosis) (2). Drugs, toxins, and physical injuries could also provoke apoptosis in mammalian cells (1, 9, 41). Interestingly, arsenite-mediated apoptosis has been characterized and extensively studied in mammalian cells (8, 20, 24, 43, 44). As antimonials share several chemical properties with arsenicals, trivalent antimonial-mediated apoptosis has been studied and reported in NB4 and NB4R4 cells (27). In order to more precisely clarify the mode of action of antimonials against the amastigote forms of *L. infantum*, we have investigated the type of cell death induced by antimonials.

In this study, we demonstrate that the cell death mediated by antimonials presents some features previously shown to be induced by heat shock in the promastigote forms of *Leishmania amazonensis* (25), by antibiotic G418 in the epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* (1), and by reactive oxygen species in *Trypanosoma brucei* (30, 45). Trivalent antimonials (tartar emetic) species were able to kill amastigotes with a cell death phenotype presenting some homologies with the programmed cell death observed in metazoans (i.e., DNA fragmentation).

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Biologie Parasitaire, IRD, 911 Av. Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France. Phone: (33) 04 67 41 62 20. Fax: (33) 04 67 54 78 00. E-mail: Lemesre@mpl.ird.fr.

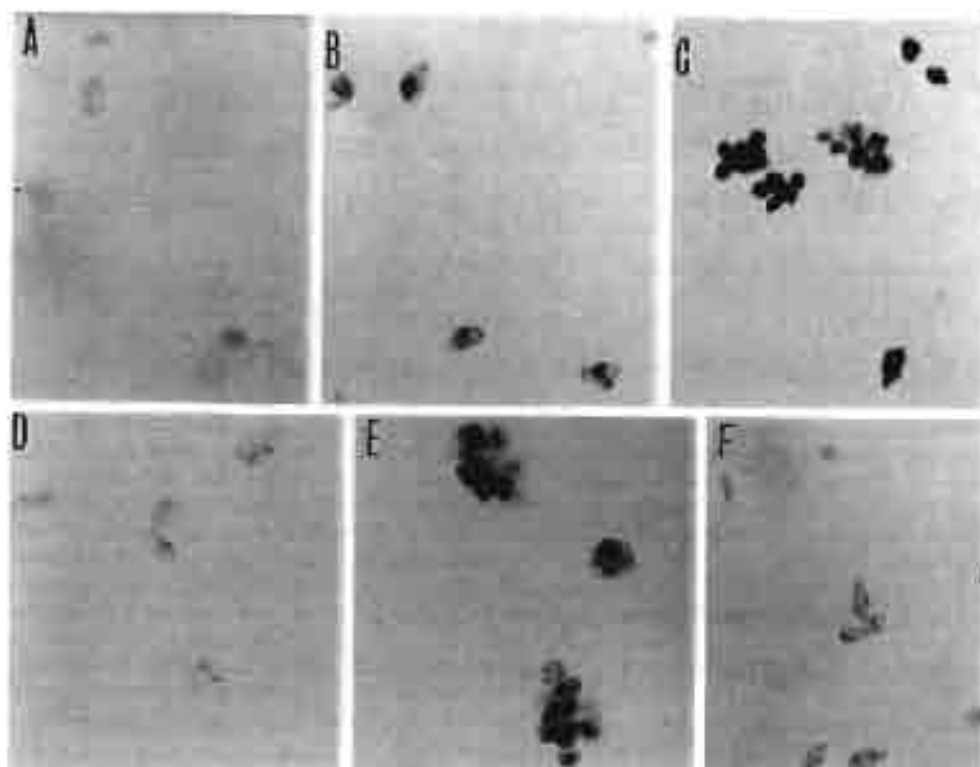


FIG. 1. In situ analysis of *L. infantum* axenic amastigote DNA fragmentation (TUNEL). Shown are positive-control untreated wild-type amastigotes (A), wild-type untreated parasites whose DNA was digested by DNase I for 10 min (B), wild-type parasites treated with 10 µg of potassium antimonyl tartrate [Sb(III)] per ml for 24 h (C), with 160 µg of meglumine [Sb(V)] per ml for 24 h (D), or with 1 mg of gentamicin per ml for 24 h (E), and LdbR120 mutants treated with 50 µg of potassium antimonyl tartrate [Sb(III)] per ml for 24 h (F). DNA fragmentation was determined using the TUNEL method and analyzed under a microscope at a magnification of $\times 1,600$.

The term apoptosis, which was originally defined purely on morphological grounds, has been recently redefined as "caspase-mediated cell death with associated apoptotic morphology" (32, 42). Our study suggests that nuclease activation does not depend on caspase-1, caspase-3, calpain, cysteine protease, or proteasome activation. These results suggest that the cell death pathway involved in antimonial toxicity should be different from those involved in metazoan apoptosis. The implication of these observations on the antimonial mode of action is discussed.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Meglumine (Glucamine, batch no. 351-2, which does not contain *m*-chlororesol as preservative) was supplied by Rhéno Paulens Spécia. 2-DEVD-CMK, Z-VAD-FMK, calpain I inhibitor, E-64 [2S,3S]-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-3-methylbutane ethyl ester, lactacystin, potassium antimonyl tartrate trihydrate, gentamicin, and amphotericin B were supplied from Sigma.

Parasites and cultures. A cloned line of *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) was used in all experiments. Axenically grown amastigote forms of *L. infantum* were maintained at 37°C with 5% CO₂ by weekly subpassages in a cell-free medium called MAA/20 (medium for axenically grown amastigotes) in 25-cm² flasks as previously described (25, 26, 43, 44). From a starting inoculum of 5×10^5 amastigote forms/ml, cell density of about 5×10^7 parasites/ml was obtained on day 7. MAA/20 consisted of modified medium (59 (Gibco BRL) with Hanks' balanced salt solution supplemented with 0.5% soy tryptone-egg (Pantur Diagnostics, Marné la Coquette, France), 0.01 mM bathocuproine disulphonic acid, 3 mM L-cysteine, 15 mM D-glucose, 5 mM L-glutamine, 4 mM NaHCO₃, 0.023 mM bovine hemin, and 25 mM HEPES to a final pH of 6.5 and supplemented by 20% preselected fetal calf serum (21, 22, 33, 36).

Selection of antimonyl Sb(III)-resistant amastigote forms. Cloned wild-type amastigote forms of *L. infantum* (designated as LdbWT) were subjected to step-wise increasing drug pressure until cell lines resistant to 120 µg of potassium antimonyl tartrate trihydrate per ml were established. Fifty-percent-inhibitory concentrations were determined using the microtiter method previously described (34, 35, 37). All amastigote populations (wild-type and Sb(III)-resistant clones) were subjected to similar *in vivo* culture subpassages.

In situ TUNEL assay. DNA fragmentation was analyzed *in situ* using a colorimetric detection system (Promega, Madison, Wis.). Slides containing treated and untreated infected macrophages and axenic amastigotes were fixed for 20 min with formaldehyde (4%, Sigma), washed with phosphate-buffered saline (PBS) (0.01 M, pH 7.2), and stored at -20°C until used. The terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) protocol involved a 10-min preincubation period with terminal transferase (TdT) buffer. The reaction was carried out in a 50-µl final volume with terminal transferase (0.5 µl) and biotinylated dUTP (0.5 µl) in 1× TdT buffer containing CuCl₂. After 60 min of incubation at 37°C in humidified chambers, slides were washed with 0.01 M PBS, pH 7.2, and the reaction was stopped by incubation of the slides in 2× SSC (1× SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate) for 15 min. The endogenous peroxidase was blocked by incubation of the slides in 0.3% hydrogen peroxide for 5 min. After being washed, the slides were incubated for 30 min in a solution of streptavidin-horseradish peroxidase (1/500). Then peroxidase activity was revealed using the peroxidase substrate (hydrogen peroxide) and the chromogen diaminobenzidine. After an extensive washing in PBS, the preparations were analyzed using a microscope at a magnification of $\times 1,100$. Apoptotic nuclei were visualized and appeared dark brown.

Flow cytometry analysis using TUNEL assay. DNA fragmentation was analyzed by cytofluorimetry using the apoptosis detection system (Promega). Briefly, 3×10^5 to 5×10^6 axenic amastigotes were washed twice with PBS (0.01 M) and fixed with methanol-free formaldehyde (1%) for 20 min at 4°C followed by 70% ethanol, which makes cells permeable in the TUNEL procedure. The fixed cells were washed with TdT buffer and incubated in the presence of terminal transferase (0.5 µl) and biotinylated dUTP (0.5 µl) in TdT buffer.

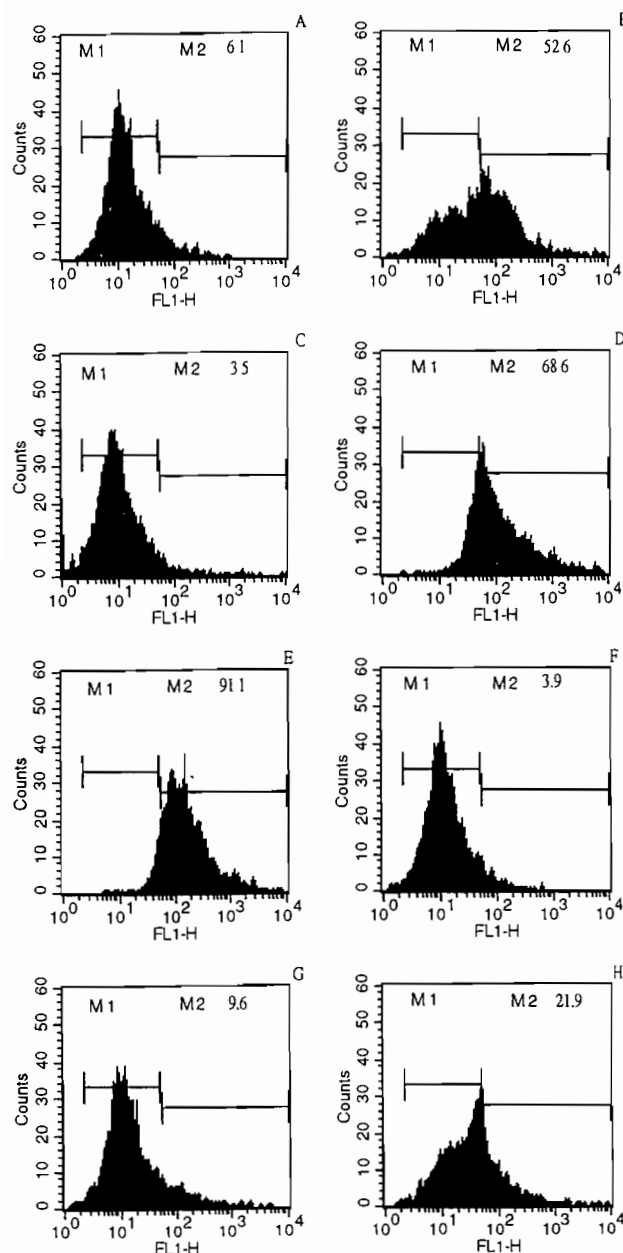


FIG. 2. Cytofluorometry (TUNEL) analysis of the antimonial-induced DNA fragmentation in axenic amastigotes. Results are shown for untreated wild-type parasite control (A) and wild-type amastigotes incubated for 24 h with medium in the presence of 2 mg of geneticin per ml (B), 2 mg of geneticin per ml without terminal transferase enzyme (negative control) (C), 10 and 50 µg of potassium antimonyl tartrate [Sb(III)] per ml (D and E, respectively), or 160 µg of meglumine [Sb(V)] per ml (F). Results for untreated LdiR120 amastigotes (G) and LdiR120 amastigotes incubated in medium containing 50 µg of potassium antimonyl tartrate per ml (H) are shown. After the incubation period, parasites were processed by the TUNEL technique and analyzed on a FACScan (Becton Dickinson). The increase in FL1 fluorescence intensity was monitored. The percentage of apoptotic cells which corresponds to an increase of FL1 fluorescence (M2) is indicated for each experimental condition.

containing CoCl_2 . After 30 min of incubation at 37°C, the biotin-labeled cells were stained with avidin-fluorescein isothiocyanate. The DNA was stained with 1 µg of propidium iodide per ml before analysis on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Ivry, France).

Flow cytofluorometry analysis using YOPRO-1. The percentage of apoptotic cells was quantitated by flow cytofluorometry analysis using the impermeant DNA intercalating YOPRO-1 (YP) as previously described (19). Briefly, 10^6 *L. infantum* axenic amastigotes were incubated with 10 µM YP for 10 min. Cells were immediately analyzed on the FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) using an argon-ion laser tuned to 488 nm. Green cell fluorescence, gated on forward and side-light scatter, was collected using a band-pass filter (525 ± 10 nm) and displayed using a logarithmic amplification (FL-1).

DNA agarose gel electrophoresis. Qualitative analysis of DNA fragmentation was performed as previously described (1) by agarose gel electrophoresis of DNA extracted from 5×10^6 amastigotes. Cell pellets were incubated in lysis buffer (10 mM Tris, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, pH 7.4) for 30 min at 4°C. The mixture was then submitted to proteolysis (proteinase K, 20-µg/ml final concentration, Boehringer Mannheim) for 2 h at 50°C, and lysates were centrifuged at $18,000 \times g$ for 30 min at 4°C. DNA from supernatants, purified by the phenol-chloroform extraction method, was precipitated in the presence of 0.5 M NaCl (final concentration) and 1 volume of isopropanol. After a washing by 70% ethanol, DNA was air dried and dissolved in 10 µl of distilled water and 10 µg of DNA from Sb(III)-treated and untreated parasites was electrophoresed in the presence of 1 µl of migration buffer (40 mM Tris, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 8.5 [Tris-borate-EDTA], 50% glycerol) on a 2% agarose gel in Tris-borate-EDTA buffer for 2 h at 100 V. DNA was then visualized under UV light after gel staining with ethidium bromide.

RESULTS

Antimonial-mediated DNA fragmentation on axenic amastigotes of *L. infantum*. When LdiWT axenic amastigotes were treated with 10 µg of trivalent antimonials per ml for 24 h (50% inhibitory concentration after 3 days, about 4.75 µg/ml), DNA fragmentation could be detected via the evaluation of endonuclease activity, by using the TUNEL method (Fig. 1C), compared to control untreated parasites, for which DNA fragmentation was not detected (Fig. 1A). Nuclei of Sb(III)-treated parasites were stained dark brown as observed with positive control (Fig. 1B). Geneticin was also able to promote DNA fragmentation on axenic amastigotes of *L. infantum* at a concentration of 1 mg/ml (Fig. 1E). By contrast, nuclei of the chemoresistant mutants (LdiR120) treated with 50 µg of Sb(III) antimonials per ml were not labeled by the TUNEL technique (Fig. 1F) like the nuclei of wild-type parasites treated with 160 mg of meglumine Sb(V) (Fig. 1D). These results were confirmed using the flow cytometry TUNEL assay. First, geneticin at a concentration of 2 mg/ml induced apoptosis-like changes as shown by the increase in yellow-green fluorescence intensity gated on FL1 (Fig. 2B), unlike what is seen for the untreated cells (Fig. 2A). The specificity of the reaction was monitored by performing a negative control on the geneticin-treated amastigotes (Fig. 2C). Wild-type amastigotes incubated in the presence of 10 or 50 µg of Sb(III) per ml expressed a large increase in the FL1 fluorescence (Fig. 2D and E) compared to the untreated control (Fig. 2A). LdiR120 mutants treated with 50 µg of Sb(III) per ml showed only a slight increase in FL1 fluorescence compared to untreated parasites LdiR120 (Fig. 2G and H). These results strongly suggest that trivalent antimonials were able to readily induce DNA fragmentation on the clinically relevant stage of the parasite. To confirm this observation, a YOPRO-1 staining method was used to monitor the Sb(III)-mediated cell death. YOPRO-1 has been shown to permit the cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) in mammalian

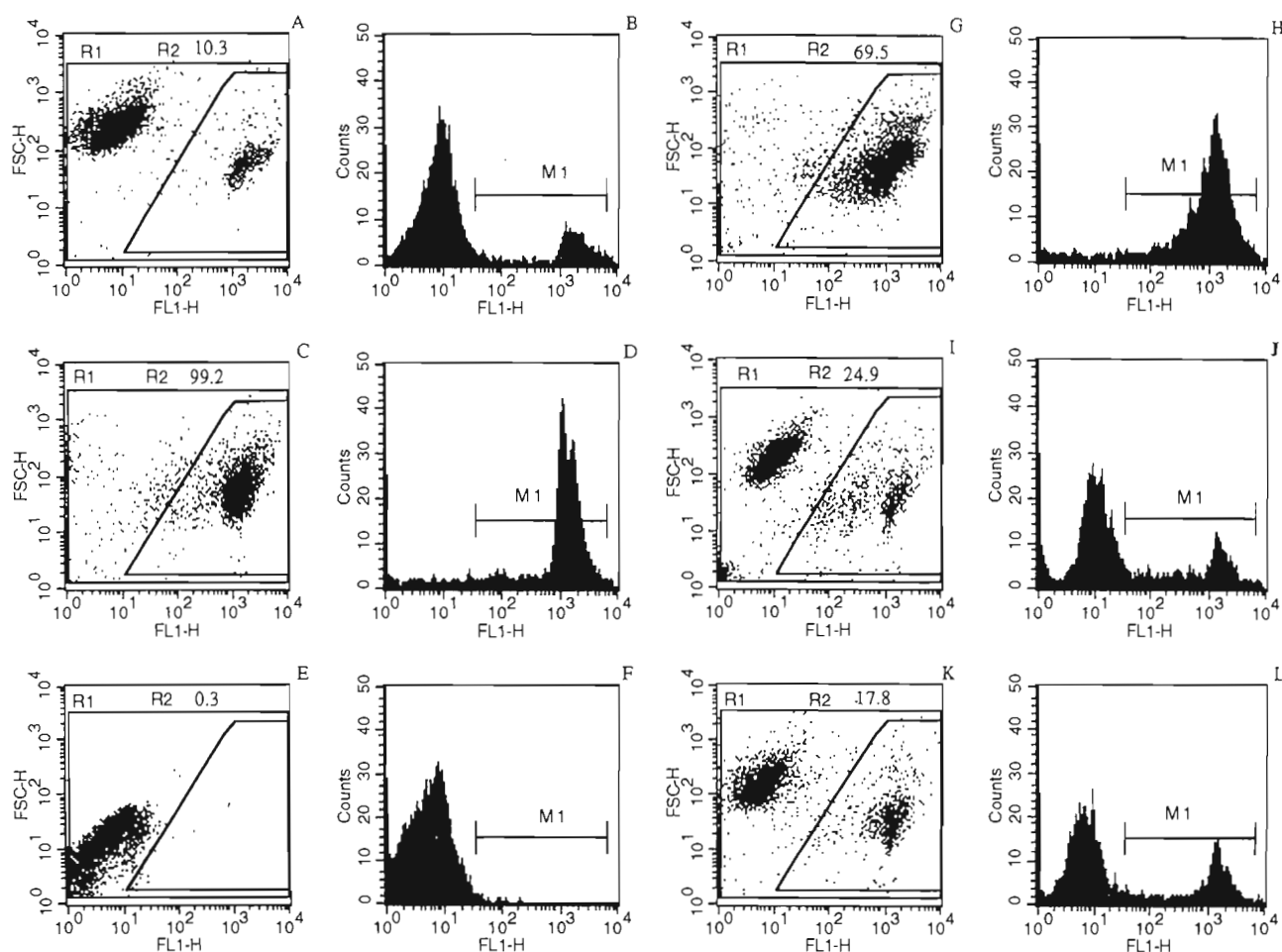


FIG. 3. Analysis of the antimonial-induced death of axenic amastigotes using the cytofluorometry YOPRO-1 differential-staining technique. Parasites were incubated in the absence (A and B) or presence of 2 mg of gentamicin per ml (C and D), for 10 min in the presence of saponin (E and F), for 24 h in medium containing 50 μ g of potassium antimonyl tartrate per ml (G and H) and in the presence of 160 μ g of meglumine [Sb(V)] for 24 h (I and J) or for 5 days (K and L). The percentages of cells presenting apoptosis-like changes and corresponding to both reduced forward scatter and high fluorescence intensity (R2) are indicated in each experimental condition. M1 (panels B, D, F, H, J, and L), peak of fluorescence intensity.

cells (19). It has been used by Ameisen et al. (1) for monitoring the complement-induced apoptosis-like changes in *T. cruzi* epimastigotes. As shown in Fig. 3C and D, cells submitted to gentamicin-mediated cell death were easily distinguished from living (Fig. 3A and B) or necrotic (Fig. 3E and F) ones by using the combined analysis of their different patterns of forward and side-light scatter properties and YOPRO-1 staining. Susceptible wild-type amastigotes of *L. infantum* treated with 50 μ g of Sb(III) per ml expressed the cytofluorometry features of gentamicin-treated cells. More than 60% of the parasite population presents apoptotic-like features (Fig. 3G and H). The apoptosis-like death which has been shown to occur in Sb(III)-treated amastigotes using either the TUNEL technique or YOPRO-1 staining was also detected by monitoring the genomic DNA status of treated versus untreated parasites. As shown in Fig. 4 (lane 1), DNA fragmentation into fragments of about 200 bp, close to the oligonucleosome-sized fragment observed during apoptosis, was readily visible in the case of the

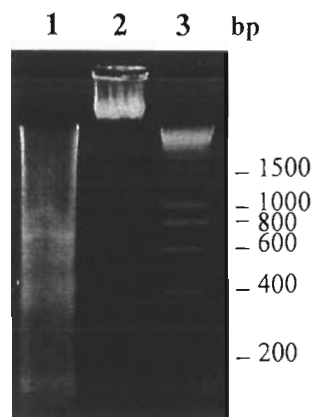


FIG. 4. Oligonucleosomal-DNA fragmentation analysis. Agarose gel electrophoresis of DNA is shown. Lane 1, Sb(III)-treated LdiWT (50 μ g/ml for 24 h); lane 2, untreated LdiWT amastigote parasites; lane 3, molecular size markers.

Sb(III)-treated amastigotes. No fragmentation was detected in the case of the untreated LdiWT amastigotes (Fig. 4, lane 2).

The results presented so far demonstrate that cell death in amastigote forms of *L. infantum* could be associated with endonuclease activity, which is responsible for the DNA fragmentation that occurs as a result of apoptosis. In mammalian cells, cysteine proteases of the caspase family, Ca^{2+} -sensitive calpains, or proteasome can initiate cell death. However, we report that inhibitors of caspase-3 (inhibitory peptide Z-DEVD-CMK, 5 μM) and caspase-1 (inhibitory peptide Z-VAD-FMK, 5 μM), calpain (calpain I inhibitor, 20 μM), cysteine proteases [E-64, (2S,3S)-trans-epoxy-epoxysuccinyl-L-leucylamido-3-methylbutane ethyl ester, 20 μM] or proteasome (lactacystin, 10 μM) were without effect on cell death brought about by trivalent antimonial on axenic amastigotes of *L. infantum* (data not shown).

DISCUSSION

Apoptosis-like changes have been reported for *T. cruzi* in response to conditioned medium or the antibiotic G418 (1). A shift in the distribution of elongation factor 1- α (EF-1 α) to a nuclear localization was reported as one of the changes accompanying cell death (6). In *L. amazonensis*, apoptosis-like changes were reported in response to heat shock (25). In this study, we demonstrate that antimonials in clinical use were able to induce cell death with features of apoptosis (i.e., DNA fragmentation) on the clinically relevant stage of *L. infantum*.

The combined use of several techniques including YOPRO-1 staining, DNA fragmentation assay and in situ and cytofluorimetry TUNEL methods demonstrated that the toxicity of Sb(III) species against axenic amastigotes is associated with oligonucleosomal DNA fragmentation, indicative of the occurrence of late events in the overall process of apoptosis. The death, mediated by Sb(III) species on axenic amastigotes, is massive even after a short incubation period (1 day) and at low concentration (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). These observations were in agreement with previous reports showing a relatively high efficacy of trivalent antimonials against axenic amastigotes of various *Leishmania* species (12, 13, 37, 38). We show that meglumine has no effect either on the viability (37) or on the DNA status of axenic amastigotes, suggesting that macrophages probably play an important role in pentavalent antimonial toxicity against intracellular amastigotes.

The biochemical pathways that mediate or regulate the endonuclease activity in trypanosomatids are still unknown. In multicellular organisms, protease activation is an important component of the cell death process (17). Recent studies have demonstrated that in *T. brucei brucei* reactive oxygen species initiate a Ca^{2+} -dependent sequence of events associated with endonuclease activity which culminates in cell death (30). In order to clarify more precisely the implication of protease in the DNA fragmentation induced by antimonials, we used several inhibitors. Although inhibitors of some caspases were not tried, the inhibitors used are known at least to block the caspases directly and indirectly responsible for the activation of endonuclease activity (caspase-1 and caspase-3). The lack of involvement of calpains, proteasome, and cysteine proteases suggests that some specific proteins, distinct from those in metazoans, are involved in the cell death promoted by antimo-

nials as has been suggested for *T. brucei brucei* (30). Finally, as antimonials have been in clinical use since 1940 and continue to be the mainstay of antileishmanial therapy, it could be reasonably assumed that a better understanding of the mechanisms that regulate the cell death in chemoresistant mutants may help us to design new therapeutic strategies against *Leishmania* parasites.

REFERENCES

1. Ameisen, J. C., T. Idziorek, O. Billaut-Mulot, J. P. Tissier, A. Potentier, and A. Ouaissi. 1995. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*). Implication for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Differ.* 2:285-300.
2. Ameisen, J. C. 1996. The origin of programmed cell death. *Science* 272:1278-1279.
3. Berman, J. D. 1988. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. *Rev. Infect. Dis.* 10:560-586.
4. Berman, J. D., D. Waddell, and B. D. Hanson. 1985. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27:916-920.
5. Berman, J. D., J. V. Gallalee, and J. M. Best. 1987. Sodium stibogluconate (pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem. Pharmacol.* 36:197-201.
6. Billaut-Mulot, O., R. Fernandez-Gomez, M. Loyens, and A. Ouaissi. 1996. *Trypanosoma cruzi* elongation factor 1- α . nuclear localization in parasites undergoing apoptosis. *Gene* 174:19-26.
7. Callahan, H. L., A. C. Portal, R. Devereaux, and M. Grögl. 1997. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:818-822.
8. Chen, Y. C., S. Y. Lin-Shiau, and J. K. Lin. 1998. Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 177:323-333.
9. Cohen, J. J. 1993. Apoptosis. *Immunol. Today* 14:126-130.
10. Coombs, G. H., J. A. Craft, and D. T. Hart. 1982. A comparative study of *Leishmania mexicana* amastigotes and promastigotes. Enzyme activities and subcellular locations. *Mol. Biochem. Parasitol.* 5:199-211.
11. Ephros, M., A. Bitnun, P. Shaked, E. Waldman, and D. Zilberstein. 1999. Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:278-282.
12. Ephros, M., E. Waldman, and D. Zilberstein. 1997. Pentostam induces resistance to antimony and the preservative chlorocresol in *Leishmania donovani* promastigotes and axenically grown amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1064-1068.
13. Faraut-Gambarelli, F., R. Piarroux, M. Deniau, B. Giusano, P. Marty, G. Michel, B. Faugère, and H. Dumon. 1997. In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:827-830.
14. Gebre-Hiwot, A., G. Tadesse, S. L. Croft, and D. Frommel. 1992. An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukemia monocyte cell line THP-1. *Acta Trop.* 51:237-245.
15. Goodwin, L. G., and J. E. Page. 1943. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem. J.* 22:236-240.
16. Goodwin, L. C. 1995. Pentostam (sodium stibogluconate): a 50-year personal reminiscence. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89:339-341.
17. Green, D., and G. Kroemer. 1998. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* 8:267-271.
18. Grögl, M., T. N. Thomason, and E. Franke. 1992. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47:117-126.
19. Idziorek, T., J. Estaquier, F. De Bels, and J. C. Ameisen. 1995. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J. Immunol. Methods* 185:249-258.
20. Larochette, N., D. Decnudin, E. Jacobot, C. Brenner, I. Marzo, S. A. Susin, N. Zamzami, Z. Reed, and G. Kroemer. 1999. Arsenite induces apoptosis via direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Exp. Cell Res.* 249:413-421.
21. Lemesre, J. L. May 1994. Methods for the culture in vitro of different stages of tissue parasites. International publication no. WO 94/26899.
22. Lemesre, J. L., D. Sereno, S. Daulouède, B. Veyret, N. Brajon, and P. Vincendeau. 1997. *Leishmania* spp: nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically-grown amastigote forms. *Exp. Parasitol.* 86:58-68.
23. Lira, R., S. Sundar, A. Makharia, R. Kenney, A. Gam, E. Saraiva, and D. Sacks. 1999. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J. Infect. Dis.* 180:564-567.

24. Ma, D. C., Y. H. Sun, K. Z. Chang, X. F. Ma, S. L. Huang, Y. H. Bai, J. Kung, Y. G. Liu, and J. J. Chu. 1998. Selective induction of apoptosis of NB4 cells from G2+M phase by sodium arsenite at lower doses. *Eur. J. Haematol.* 61:27-35.
25. Moreira, M. E., H. A. Del Portillo, R. V. Milder, J. M. Balanco, and M. A. Barcinski. 1996. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J. Cell. Physiol.* 167:305-313.
26. Mottram, J. C., and G. H. Coombs. 1985. *Leishmania mexicana*: enzyme activities of amastigotes and promastigotes and their inhibition by antimonials and arsenicals. *Exp. Parasitol.* 59:151-160.
27. Müller, S., W. H. Miller, and A. Dejean. 1998. Trivalent antimonials induce degradation of the PML-RAR α oncoprotein and reorganization of the promyelocytic leukemia nuclear bodies in acute leukemia NB4 cells. *Blood* 92:4308-4316.
28. Ouellette, M., and B. Papadopoulos. 1993. Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. *Parasitol. Today* 9:150-153.
29. Peters, B. S., D. Fish, R. Golden, D. A. Evans, A. D. M. Bryceson, and A. J. Pinching. 1990. Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical features and response to therapy. *Q. J. Med.* 77:1101-1111.
30. Ridgley, E. L., Z. H. Xiong, and L. Ruben. 1999. Reactive oxygen species activate a Ca²⁺-dependent cell death pathway in the unicellular organism *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochem. J.* 340:33-40.
31. Roberts, W. L., J. D. Bernan, and P. M. Rainey. 1995. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1234-1239.
32. Samali, A., B. Zhivotovsky, D. Jones, S. Nagata, and S. Orrenius. 1999. Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ.* 6:495-496.
33. Sereno, D., and J. L. Lemesre. 1997. In vitro life cycle of pentamidine-resistant amastigotes: stability of the chemoresistant phenotypes is dependent on the level of resistance induced. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1898-1903.
34. Sereno, D., and J. L. Lemesre. 1997. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:972-976.
35. Sereno, D., and J. L. Lemesre. 1997. Use of an enzymatic in vitro micro-method to quantify amastigote stage of axenically grown amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Res.* 83:401-403.
36. Sereno, D., P. Michon, N. Brujon, and J. L. Lemesre. 1997. Phenotypic characterization of *Leishmania mexicana* pentamidine-resistant promastigotes: modulation of the resistance during developmental life cycle. *C. R. Acad. Sci.* 320:981-987.
37. Sereno, D., M. Cavaleira, K. Zemzoumi, S. Maquaire, A. Ouassii, and J. L. Lemesre. 1998. Axenically-grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:3097-3102.
38. Sereno, D., G. Roy, J. L. Lemesre, B. Papadopoulos, M. Ouellette. 2001. DNA transformation of *Leishmania infantum* axenic amastigote and their use in drug screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1168-1173.
39. Ullman, B. 1995. Multidrug resistance and P-glycoproteins in parasitic protozoa. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27:77-84.
40. Ullman, B., E. Carrero-Valenzuela, and T. Coons. 1989. *Leishmania donovani*: isolation and characterization of sodium stibogluconate (Pentostam)-resistant cell lines. *Exp. Parasitol.* 69:157-163.
41. Vaux, D. L., and A. Strasser. 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2239-2244.
42. Vaux, D. L. 1999. Caspases and apoptosis—biology and terminology. *Cell Death Differ.* 6:493-494.
43. Wang, T. S., C. F. Kuo, K. Y. Jan, and H. Hunng. 1996. Arsenite induces apoptosis in chinese hamster ovary cells by generation of reactive oxygen species. *J. Cell. Physiol.* 169:256-268.
44. Watson, R. W., H. P. Redmond, J. H. Wang, and D. Bouchler-Hayes. 1996. Mechanisms involved in sodium arsenite-induced apoptosis of human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 60:625-632.
45. Welburn, S. C., M. A. Barcinski, and G. T. Willinms. 1997. Programmed cell death in trypanosomatids. *Parasitol. Today* 13:22-26.

Article 6

L'effet cytotoxique de donneurs de NO sur les formes amastigotes de *Leishmania amazonensis* est corrélé avec la modulation des activités protéasiques des parasites

(Soumis pour publication, *Parasitology*).

Le monoxyde d'azote (NO) est considéré actuellement comme la principale molécule microbicide synthétisée par les macrophages activés. Des donneurs de NO ont d'ailleurs été utilisés pour soigner des leishmanioses cutanées murines et humaines. Les progrès de la culture cellulaire et notamment la mise au point au laboratoire de cultures axéniques des formes amastigotes de différentes espèces de leishmanies, nous ont permis d'étudier les effets biologiques de trois donneurs de NO qui miment les différents états du NO lors de sa biosynthèse dans la cellule hôte. Le nitrite de sodium acidifié NaNO_2 représente la forme radicalaire du NO généré par la NO synthase, l'albumine nitrosylée NO-BSA reproduit les réactions de S-nitrosylation et enfin le *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamin SNAP mime une production continue de NO comme elle se produit dans les macrophages activés. Des travaux précédents avec du NO gazeux avaient montré que le NO pouvait inhiber certaines enzymes parasitaires comme la cis-aconitase du cycle de Krebs ou la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase de la glycolyse. Nous nous sommes intéressés dans cette étude aux protéases parasitaires qui sont impliquées dans des processus aussi divers que la différenciation, la nutrition, l'invasion de la cellule hôte ou l'échappement au système immunitaire de l'hôte.

Principaux résultats :

- ① Les donneurs de NO (NaNO_2 , NO-BSA et SNAP) exercent un effet cytotoxique sur les formes amastigotes de *L. amazonensis*, en fonction du temps d'incubation.
- ② Nous montrons, par contre, qu'indépendamment du temps de contact avec le donneur de NO, les formes amastigotes de *L. amazonensis* sont incapables de proliférer ni de se différencier en formes promastigotes *in vitro*.

③ De manière intéressante, le SNAP exerce un effet cytostatique transitoire à des doses suboptimales.

④ Nous démontrons également que le NO module de manière singulière les activités protéasiques des parasites. En effet, le NO inhibe les activités cystéine-protéases et exacerbe les activités métalloprotéasiques. En outre, la modulation des activités protéasiques est parfaitement corrélée à la cinétique temporelle de mort des formes amastigotes.

Les différents donneurs de NO montrent que le NO sous ses différentes formes est capable d'affecter les leishmanies. Il semble que le NO puisse agir directement sous sa forme radicalaire native, mais aussi sous forme stockée et transportée par des groupes nitrosylés de protéines sériques comme l'albumine. Nos résultats, ajoutés aux travaux antérieurs, montrent que le NO cible des fonctions clés du métabolisme du parasite. Ces molécules cibles offrent d'ailleurs des perspectives intéressantes vers de nouvelles voies thérapeutiques.

Cytotoxic effect of nitric oxide donors on *Leishmania amazonensis* amastigotes correlates with modulation of proteinase activities.

P. HOLZMULLER ¹, D. SERENO ¹, P. VINCENDEAU ², and J.-L. LEMESRE ^{1*}

1. UR 008 Pathogénie des Trypanosomatidés, IRD (Institut de Recherche pour le Développement), B.P. 64501, 911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier cedex 5, France.

2. Laboratoire de parasitologie, Université Victor Segalen Bordeaux II, Bat 1B, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France.

Running title: NO-mediated lethal proteinases dysfunctions in *Leishmania* amastigotes.

*Corresponding author: Jean-Loup LEMESRE, UR 008 Pathogénie des Trypanosomatidés, IRD (Institut de Recherche pour le Développement), B.P. 64501, 911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France.

Fax: 33 (0)4 67 41 63 30

Tel: 33 (0)4 67 41 62 20

Email: lemesre@mpl.ird.fr

Summary

The microbicidal effect of activated macrophages on *Leishmania* parasites involved nitric oxide (NO)-dependent effector mechanism. In this study, we report that the incubation of axenically-grown amastigotes of *Leishmania amazonensis*, the causative agent of diffuse cutaneous leishmaniasis, with three different NO donors (sodium nitrite, nitrosylated albumine and *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamin SNAP) affected significantly the parasite's viability, proliferation and differentiation. These data strongly suggest dramatic dysfunctions in cell metabolism. Proteinase activities that are essential in the parasite survival within host cell were strongly modulated by NO. High molecular weight metalloproteinase activities were increased whereas low molecular weight cysteine proteinase activities were decreased. NO-mediated nitrosylation of key proteins in parasite intracellular development may thus represent one of the mechanisms of host defense against *Leishmania* infection.

Key words: *Leishmania*, nitric oxide, proteinases, developmental cycle, cell death.

Introduction

The genus *Leishmania* includes kinetoplastid protozoan parasites responsible for a wide spectrum of zoonotic and anthroponotic diseases named leishmaniasis. During their life, these organisms cycle between the midgut of sandflies, in which they proliferate as extracellular promastigotes, and the phagolysosomes of mammalian macrophages, where they differentiate and grow as intracellular amastigotes (Chang *et al.* 1990). In the past, promastigotes have been readily cultured in cell-free media, while amastigotes could only be maintained either *in vivo* or *in vitro* in macrophage cell lines. The new technology of *in vitro* cell culture, in axenic conditions, of the mammalian stage of *Leishmania* allowed the modelisation of the *in vitro* parasite life cycle with a high degree of reproducibility of the experimental conditions (Bates *et al.*, 1992; Lemesre patent N° 6458581; Lemesre *et al.* 1994; Hodgkinson *et al.*, 1996). These cultures made possible the investigations of nitric oxide (NO) effect, an effector molecule synthesized by activated macrophages, directly on the pathogenic stage of *Leishmania* that usually presented a strict intracellular location. NO is a free radical which damaging effect on a variety of pathogens including viruses, bacteria, helminths and protozoa has been well documented (reviewed in Nathan & Shiloh 2000; Brunet 2001; Colasanti *et al.* 2002). In murine leishmaniasis, activated macrophages produced NO via the inducible isoform of the NO-synthase (NOS II), which led to intracellular destruction of amastigote forms (Bogdan *et al.* 1991). This finding is now extended to human and canine models (Vouldoukis *et al.* 1995, 1996; Sisto *et al.* 2001).

Upon stimulation with appropriate cytokines (mainly γ -IFN), macrophages express a Ca^{2+} /calmodulin-independent NOS II, which converts L-arginine in a NADPH-dependent reaction into L-citrulline and NO (Nathan, 1992). This free radical molecule has a very short half-life (0.1 s) and may thus react rapidly with its molecular environment, particularly with protein sulfhydryl groups, iron-sulfur-containing enzymes and metalloproteins (Palmer *et al.* 1987; Radi 1996; Cooper 1999; Torres & Wilson 1999). The biochemical pathways mainly targeted by NO are mitochondrial respiration and processes requiring energy, drug metabolism, DNA and proteins damages through nitrosylation reactions (Melino *et al.*, 1997). Such NO-mediated reactions on cysteine-containing enzymes, like glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Mauel & Ransijn 1997) or cis-aconitase (Lemesre *et al.* 1997), might contribute to induce promastigotes and amastigotes death. Recently, NO donors were reported to inhibit purified cysteine proteinases from *Leishmania infantum* promastigotes (Salvati *et al.*

2001). *Leishmania* proteinases are involved in processes as different as differentiation, nutrition, host-cell invasion and seem to play key roles in the strategies developed by amastigotes to escape the host's immune response (Rosenthal 1999; Courret *et al.* 2001).

In this study, we investigated the effects of NO donors [acidified sodium nitrite (NaNO_2), nitrosylated albumin (NO-BSA) and *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamin (SNAP)] on the amastigotes of *Leishmania amazonensis*. NO donors exert a cytostatic effect leading to parasite death involving proteinase activities. An increase in metalloproteinase activities associated with a decrease in cysteine proteinase activities was induced by NO donors.

Materials and Methods

Parasites and *in vitro* cultures. The *in vitro* life cycle of various *Leishmania* species was successfully reproduced by axenic cultures of each parasite stage (Lemesre patent N° 6458581). A cloned line of *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/76/LTB-012) was used in all experiments. Axenically-grown amastigote forms of *Leishmania amazonensis* were maintained at $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ by weekly subpassages in a cell-free medium called MAA/20 (Medium for Axenically-grown Amastigotes). From a starting inoculum of 5×10^5 amastigote forms/ml, cell density of about $1\text{--}2\times 10^7$ parasites/ml was obtained on day 7. MAA/20 consisted of modified medium 199 (Gibco BRL) with Hanks' salts supplemented with 0.5 % soya tryptocasein (Pasteur Diagnostics, Marne-la-Coquette, France), 0.01 mM bathocuproine disulphonic acid, 3 mM L-cysteine, 15 mM D-glucose, 5 mM L-glutamine, 4 mM NaHCO_3 , 0.023 mM bovine hemin, 25 mM HEPES to a final pH of 6.5, and supplemented by 20 % of pretested heat-inactivated foetal calf serum (FCS). The population of axenically-grown amastigote forms appeared homogeneous, round to ovoid, aflagellate and immobile. We and other investigators have previously shown that axenically-grown amastigotes of various *Leishmania* species clearly resembled intracellular amastigotes with regard to their ultrastructural, biological, biochemical and immunological properties (Bates *et al.* 1992, Bates 1993, Lemesre *et al.* 1994). In the experiments of parasite growth following NO treatment, the parasite number in the starting inoculum was corrected with regard to the percentage of viable forms within the total parasite population estimated by the MTT test (See below) and adjusted to 5×10^5 living amastigotes per ml.

Promastigote cultures were derived from axenically-grown amastigote stages by subpassage at $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ in medium RPMI 1640 (Gibco BRL) buffered with 25 mM HEPES and 2 mM NaHCO_3 , pH 7.2, supplemented with 10% heat-inactivated FCS. Initial parasite concentration was 1×10^6 living amastigotes per ml of medium for the differentiation experiments.

Cell concentrations were determined by daily counting of parasites with a hemocytometer at $400\times$ magnification after adequate dilution in PBS containing 0.1 % glutaraldehyde. The transformation of extracellular amastigote forms into promastigote ones was estimated microscopically after methanol fixation and Giemsa staining.

Treatment of extracellular amastigotes with NO donors sodium nitrite (NaNO_2), nitrosylated albumine (NO-BSA) and S-nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP). Late logarithmic phase amastigote forms were washed three times in phosphate buffer saline (PBS), 0.01 M, pH 4.5 before treatment. Parasites were resuspended in the same buffer at the concentration of 10^7 amastigotes per ml and 5 mM of sodium nitrite (Sigma) was added. After respectively 20 minutes, 2 hours, 4 hours and 12 hours of incubation at $32 \pm 1^\circ\text{C}$ in the dark, parasites were washed ones in PBS before subpassage in fresh culture medium or analysis. Control amastigotes were conditioned in the same way but in the absence of sodium nitrite.

Nitrosylated albumine was prepared as previously described (Mnaimneh *et al.* 1997) and added in the culture medium (4 mg/ml) immediately after parasites inoculation. At respectively 20 minutes, 4 hours and 12 hours of incubation, treated and untreated amastigotes were washed in PBS 0.01 M pH 7.2 before subpassage in fresh culture medium or analysis.

SNAP (Alexis biochemicals) was also added immediately after parasite inoculation directly in the culture medium at 100 μM and 1 mM, respectively. After 24 and 48 hours incubation, parasites were washed in PBS before subpassage in fresh culture medium or analysis.

Assesment of NO donors on amastigote viability. NO-treated and untreated amastigotes were resuspended in MAA/20 medium ($2 \times 10^7/\text{ml}$) for each incubation time of the previous kinetics. The MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) micromethod was used to estimate NO-induced death (Sereno & Lemesre 1997). Tetrazolium bromide has the property to be reduced into dark-blue formazan salts by deshydrogenases. Briefly, parasites (100 μl) were seeded in 96-wells microplate. After a 1-hour incubation, 10 μl of MTT (10 mg/ml) were added to each well and plates were further incubated for 4 hours. The enzyme reaction was then stopped by adding 100 μl of 50% isopropanol-10% SDS. The plates were incubated for an additional 30 minutes under agitation at room temperature before reading the OD value at 570 nm with a titer-tech 96-well scanner.

Protein lysates and proteinase assays. At each time course point with each NO donor, *Leishmania amazonensis* amastigotes were harvested from the culture and washed three times in PBS. The cells were then resuspended in a lysis buffer Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 0.1% Triton X100, pH 7.5 for 30 minutes. Amastigotes lysates were centrifuged at 5000g for 20

minutes, the supernatant was removed and protein concentration was determined by the Bradford method (Biorad).

A protein extraction by Triton X114 was also performed in order to separate membrane-bound proteins from cytosolic ones. Parasites were resuspended in a lysis buffer TrisHCl 10 mM, NaCl 150mM, 2% Triton X114, pH 7.4 for 10 minutes at 4°C. Lysates were centrifuged at 10.000g for 45 minutes at 4°C. Supernatants were deposited on a Tris Buffer Saline (TBS) containing 6% glucose and incubated at 37°C for 15 minutes to induce separation of the aqueous phase from the detergent-enriched phase. The organic phase containing amphiphilic proteins was separated from the aqueous phase containing hydrophilic proteins by low speed (50g) centrifugation at room temperature.

SDS-PAGE was performed according to the discontinuous buffer method of Laemmli (1970) using 5% stacking/10% separating gels in a protein minigel apparatus (Biorad). Proteinase activities of 10 µg proteins of each NO incubation condition, were examined after electrophoretic separation of detergent lysates in gels containing copolymerised gelatin as previously described (Lacks & Springborn 1980). Briefly, substrate hydrolysis was performed at room temperature in 0.2 M acetate buffer pH 5.5 containing 1mM dithiotreitol (DTT, Sigma) after the gel had been washed free of SDS in 2.5% triton X100 solution. The effect of specific inhibitors, 1-10 Phenanthroline (10 mM, Sigma), L-trans-epoxysuccinylleucylamido (4-guanido) butane E-64 (10 µM, Sigma) and acidified sodium nitrite (5 mM, Sigma) on the proteinase activities was determined after their separation in gelatin SDS-PAGE, by incubation of the gel in buffer supplemented with inhibitors. The gel were stained with Coomassie blue. Proteinases activities appeared as colorless protein bands.

Statistical analysis. Statistical significance (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) was analysed by Student's *t*-test. All experiments were performed at least twice.

Results

Effect of NO delivered by NO donors on *Leishmania amazonensis* viability. The cytotoxic effect of NO was previously described for NO gas on promastigote and amastigote forms of *Leishmania* (Lemesre *et al.* 1997). We investigated here the effects of three NO donors (sodium nitrite, nitrosylated albumine and SNAP) on *Leishmania amazonensis* amastigotes. As shown in figure 1A, after 12 hours of incubation in PBS at pH4.5, more than 75% of extracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis* expressed deshydrogenase activities reflecting their viability. By contrast, amastigotes treated with 5 mM sodium nitrite showed a time-dependent decrease in their deshydrogenase activities. Significant toxicity could be detected as early as after 20 minutes of contact with NaNO₂, where about 60% amastigotes expressed deshydrogenase activities. After a period of 4-hours NO exposure, a significant leishmanicidal effect was observed with only 25% living organisms, to become less than 10% at 12 hours incubation (Figure 1A). Same results were obtained by cytofluorometry analysis after propidium iodide staining (data not shown).

As sodium nitrite, nitrosylated albumin was cytotoxic against extracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis* (Figure 1B). Control parasites incubated with albumin alone shown 100% viability even after 12 hours. By contrast, treated amastigotes shown a time-dependent decrease of their viability, but delayed as compared to sodium nitrite (*i.e.* less than 40% viability at 4 hours incubation with NO-BSA). The death of nitrosylated albumin-treated amastigotes was clearly proved at 12 hours incubation with 90% dead amastigote forms (Figure 1B).

As shown in figure 1C, axenically-cultured amastigotes maintained a viability of 100% after 24 hours and 48 hours incubation without treatment, respectively. By contrast, exposure with SNAP resulted in a dose-time-dependent loss of parasite viability. After a 24-hour incubation with 100 µM or 1 mM SNAP, amastigotes survival was both reduced by 60%. Nevertheless, whereas viability of 1 mM SNAP-treated amastigotes kept decreasing to 33%, viability of amastigotes treated at the lower concentration reached to 80%, indicating a transitory effect of the NO donor (Figure 1C).

Effect of NO on amastigotes cell cycle. Proliferation and differentiation processes of *Leishmania amazonensis* amastigote forms did not seem to be disturbed by 12 hours incubation, neither in PBS 0.01M (pH 4.5), nor in culture with or without BSA alone (Figure

2 and 3). By contrast, the cell cycle of amastigotes treated with NO donors was dramatically perturbed. Whatever the incubation time, amastigotes treated with NaNO₂ or NO-BSA were unable neither to proliferate (Figure 2A and 2B, respectively) nor to differentiate *in vitro* into promastigotes (Figure 3A and 3B, respectively). Parasitic numbers decreased quickly after culture initiation, as a function of incubation time with the NO donor. Although, amastigotes that were 20 minutes in contact with nitrosylated BSA showed a constant parasitic concentration in the time course of the experiment. After 20 minutes of contact with nitrosylated BSA, only a little part of the population was not affected by NO, that may correlate with a dynamic steady state between dead and dividing amastigotes. As for viability test, the effect of SNAP on the growth and differentiation of *Leishmania amazonensis* amastigotes was dose-dependent. Amastigotes treated with 100 µM or 1 mM SNAP were unable to proliferate nor to differentiate into promastigotes after 24 hours (Figures 2C and 3C, respectively). After 48 hours, only amastigotes incubated in the presence of 100 µM SNAP initiated a dividing phase of growth and were able to differentiate into promastigotes (Figures 2C and 3C, respectively). A dose-dependent transitory effect of NO was demonstrated.

Proteinase activities of NO treated amastigotes. Figure 4 first showed that amastigote stage of *Leishmania amazonensis* significantly expressed three groups of proteinases: high molecular weight metallo-proteinases (over 140 kDa), a metallo-proteinase complex ranging from 59 to 90 kDa, and low molecular weight cysteine-proteinases (under 50 kDa). 1-10 Phenanthroline, a specific inhibitor of metalloproteinases, and E-64, a specific inhibitor of cysteine-proteinases, were used to characterize both proteinase activities families (Figure 4). Addition of 5 mM NaNO₂ directly on total protein extracts from amastigotes acted as E-64 by inhibiting totally the cysteine-proteinases of 33/35 kDa and 25/27 kDa, probably through S-nitrosylation of thiol groups of the catalytic site's cysteines. However, an activation of the 59-90 kDa metallo-proteinase complex, especially of gp63 metalloproteinase activity, was evidenced. TX-114 protein extracts from NO-treated amastigotes were then analyzed (Figure 5). Cysteine-proteinases from the hydrophilic phase of NaNO₂-treated amastigotes' protein extracts (Figure 5A), were as above markedly inhibited whereas metallo-proteinase activities were significantly increased. Both actions were not simultaneous and occurred in a time-dependent manner. Cysteine-proteinase activities began to be decreased after a 2-hour contact with NO whereas an increase in metallo-proteinase activities occurred as soon as 20 minutes of exposure with NO donor. Interestingly, these metalloproteinase activities were constant until 12 hours of incubation. At this time, the proteinase activities of both control and NO-

treated parasites decreased. At 4 hours and 12 hours exposure respectively, 25/27 kDa cysteine-proteinases were significantly inhibited, and a 4-hours incubation period was required to observe inhibition of the 35 kDa cysteine-protease activity. Finally, after a 12-hours contact with NO generated from NaNO₂, the 33 kDa cysteine-proteinase activity was markedly reduced (Figure 5A). Membrane proteinases (Figure 5B) did not exhibit any cysteine-proteinase activity. Nevertheless, activation of metallo-proteinases was the same as in the hydrophilic phase, with an increase as early as 20 minutes of contact of *L. amazonensis* amastigotes with acidified sodium nitrite.

Discussion

Nitric oxide-dependent effector mechanisms in activated macrophages are involved in *Leishmania* killing both in human and animal cells. In *Leishmania* infection, the killing of parasite can be completely reversed by arginine analogue L-NMMA and can proceed normally in a macrophage cell line deficient in the respiratory burst, indicate that NO is both necessary and may be sufficient to account for the macrophage microbicidal activity (Liew & Cox, 1991). However, the precise nature of the biological mechanisms whereby NO affected amastigote viability begin to be investigated and they remain still poorly understood.

Recently we pointed out that axenically-grown *Leishmania* amastigotes represented a powerful model to investigate the mechanisms of drugs-mediated amastigote lethal effect (Serenio & Lemesre 1997). Using this model, we demonstrate here that addition of NO donors in the culture of *Leishmania amazonensis* amastigotes affects significantly the viability, inhibits quickly the proliferation process *in vitro* and disturbs strongly the parasite differentiation *in vitro*. Three NO donors were used: acidified sodium nitrite NaNO_2 which mimics radical NO biosynthesized by NOS II, nitrosylated albumin NO-BSA which acts through S-nitrosylation reactions and SNAP which reproduces a continuous NO production as occurring within activated macrophage. The kinetics of parasite killing depended on the type of NO donor: treatment with acidified NaNO_2 or NO-BSA exhibit a toxicity that could be evidenced within hours whereas SNAP exerted its effect in a period lasting 1 or 2 days. These differences might be ascribed to the generation of different NO derivatives or to the differing kinetics of reaching NO parasite molecular targets (Feelisch & Stamler, 1996). More recently, we demonstrated that NO-mediated amastigote death exhibited features of apoptosis (Holzmüller *et al.*, 2002). Interestingly, amastigote death appeared in a linear manner in time whereas the kinetics of apoptosis was exponential. These results suggest that NO toxicity occurred differentially and that accumulating strokes of molecular targets may be required to engage the apoptotic process.

We also demonstrated that the leishmanicidal effect of NO delivered by sodium nitrite, nitrosylated albumin or SNAP was a function of the incubation time, and that a dose-dependent transitory effect may occur. Moreover, for the earliest incubation times with all NO donors, the living parasite population should be sufficient to initiate a cell growth. However, we observed in all cases a strong leishmaniostatic effect, that revealed transitory at suboptimal NO level. We thus hypothesize that NO biological effect was first cytostatic and that both *in*

vitro and *in vivo*, a sustained contact with NO must occur to kill *Leishmania* amastigotes. In fact, *ex vivo* macrophage infections shown that 48 hours of activation (i.e. NO production) were necessary to observe a parasitic index inhibition of about 90% (Holzmüller *et al.* 2002). At the micromolar NO concentrations prevailing in experiments *in vitro*, the half-life of the molecule might last several minutes (Beckman *et al.*, 1996). Nevertheless, this duration may not have been sufficient for radical NO itself to affect amastigotes. Therefore, NO may extend its action in time by S-nitrosylation reactions of substrates like albumin and glutathione (Liu *et al.* 1998). Recent works on African trypanosomes have shown that NO probably caught albumin to exert its trypanostatic/trypanocide activity. This last was neutralized by polyclonal antibodies targeting S-nitrosylated epitopes (Mnaimneh *et al.* 1997). Albumin may thus be a mediator able to stock, to carry and to release NO on distant targets by several mechanisms, especially S-nitrosylation of thiol groups (Mnaimneh *et al.* 1997). Our results strongly suggest the same S-nitrosylation-mediated extended NO action in *Leishmania* infections and be a mediator of apoptosis (Melino *et al.*, 1997).

Interestingly, we show in this report that a very short time in contact with NO was enough to dramatically disturb the parasite development cycle by inhibiting both the *in vitro* amastigotes proliferation and differentiation into promastigotes. Metabolic pathways implicated in the NO inhibition of parasite growth are still not known, but the results as a whole strongly suggest that NO targets specifically key steps of the cell cycle (Mauel & Ransijn 1997; Lemesre *et al.* 1997). An early stroke of aconitase in Krebs cycle of the amastigote forms of *Leishmania*, correlated with a perturbation of the differentiation process, have been recently demonstrated (Lemesre *et al.* 1997). More recently, Salvati *et al.* (Salvati *et al.* 2001) have also shown that NO donors were able to inhibit *Leishmania infantum* promastigote cysteine proteinase activity. We demonstrated here the existence of a strong link between the loss of viability of *Leishmania amazonensis* amastigotes after treatment with the NO donors and the disturbance of the parasite proteinases. As a function of time, inhibition of cysteine-proteinase and overexpression of metalloproteinase activities correlated the increase of dead amastigote population. Moreover, disturbance of proteinases activities occurred early enough to be implied in the leishmanistatic effect of NO. Although the exact role of cysteine proteinases in *Leishmania* pathogenesis was unclear, it has been demonstrated that *Leishmania* can not grow within macrophages in the presence of cysteine proteinase inhibitors (Mottram *et al.* 1996). These observations provide evidence of the importance of these molecules in the survival of the intracellular amastigote form of these parasites (Bates 1994; Alexander *et al.* 1998). Metalloproteinases, and especially leishmanolysin gp 63, are

differentially expressed during *Leishmania* life cycle and also play crucial roles in parasite survival (Schneider *et al.* 1992, Roberts *et al.* 1995). Surprisingly, regulation by NO of metalloproteinase activity, what usually resulted in enzyme inactivation, results here in parasite metalloproteinases overexpression. Few is known about metalloproteinase activity up-regulation by NO, but a recent work shows that nitroglycerin, a NO-donating compound, was able to up-regulate matrix metalloproteinase expression in human macrophages (Death *et al.* 2002). Moreover, a functional analysis of the *Leishmania* surface metalloproteinase gp63 demonstrated similarities to matrix metalloproteinases (MacMaster *et al.* 1994). We hypothesize that such an overexpression has been induced in *Leishmania amazonensis* treated with NO-donors.

Taken together, our results suggest that proteinases of *Leishmania*, including cysteine and metalloproteinases, represent, at least in part, key targets for the host NO-mediated anti-parasitic defense. The investigation of specific proteinases inhibitors or activators effects in *Leishmania* chemotherapy might deserve further research.

References

- ALEXANDER, J., COOMBS, G. H. & MOTTRAM, J. C.** (1998). *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *Journal of Immunology*. **161**, 6794-6801.
- BATES, P. A.** (1993). Characterization of developmentally-regulated nucleases in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. *FEMS Microbiology Letter* **107**, 53-58.
- BATES, P. A., ROBERTSON, C. D., TETLEY, L. & COOMBS, G. H.** (1992). Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology*. **105**, 193-202.
- BATES, PA.** (1994). Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology*. **108**, 1-9.
- BECKMAN, J. S., WINK, D. A. & CROW, J. P.** (1996). Nitric oxide and peroxynitrite. . In *Methods in Nitric Oxide Research* (ed. Feelisch, M. & Stamler, J.S.), pp.11-70. Wiley, Chichester.
- BOGDAN, C., STENGER, S., ROLLINGHOFF, M. & SOLBACH, W.** (1991). Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. Interleukin 4 synergizes with interferon-gamma to activate murine macrophages for killing of *Leishmania major* amastigotes. *European Journal of Immunology*. **21**, 327-333.
- BRUNET, L. R.** (2001). Nitric oxide in parasitic infections. *International Immunopharmacology*. **1**, 1457-1467.
- CHANG, K. P., CHAUDHURI, G. & FONG, D.** (1990). Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Annual Review of Microbiology*. **44**, 499-529.

COLASANTI, M., GRADONI, L., MATTU, M., PERSICHINI, T., SALVATI, L., VENTURINI, G. & ASCENZI, P. (2002). Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. **9**, 131-134.

COOPER, CE. (1999). Nitric oxide and iron proteins. *Biochimica Biophysica Acta*. **1411**, 290-309.

COURRET, N., FREHEL, C., PRINA, E., LANG, T. & ANTOINE, J. C. (2001). Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. *Parasitology*. **122**, 263-279.

DEATH, A. K., NAKHLA, S., MACGRATH, K. C. Y., MARTELL, S., YUE, D. K., JESSUP, W. & CELERMAJER, D. S. (2002). Nitroglycerin upregulates matrix metalloproteinase expression by human macrophages. *Journal of the American College of Cardiology*. **39**, 1943-1950.

FEELISCH, M. & STAMLER, J.S. (1996). Donors of nitrogen oxides. In *Methods in Nitric Oxide Research* (ed. Feelisch, M. & Stamler, J.S.), pp.71-115. Wiley, Chichester.

HOLZMULLER, P., SERENO, D., CAVALEYRA, M., MANGOT, I., DAULOUEDE, S., VINCEDEAU, P. & LEMESRE, J. L. (2002). Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Infection and Immunity*. **70**, 3727-3735.

LACKS, S. A. & SPRINGHORN, S. S. (1980). Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Journal of Biological Chemistry*. **255**, 7467-7473.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685.

LEMESRE, J. L., BLANC, M. P., GREBAUT, P., ZILBERFARB, V. & CARRIÈRE, V. (1994). Culture continue des formes amastigotes de leishmanies en condition axénique. Réalisation du cycle évolutif *in vitro*. *Médecine et Armée*. **22**, 99-100.

LEMESRE, J. L., SERENO, D., DAULOUÈDE, S., VEYRET, B., BRAJON, N., & VINCENDEAU, P. (1997). *Leishmania* spp.: Nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically grown amastigote forms. *Experimental Parasitology*. **86**, 58-68.

LIEW, F.Y. & COX, F.E. (1991). Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunology Today*. **12**, A17-21.

LIU, Z., RUDD, M. A., FREEDMAN, J. E. & LOSCALZO, J. (1998). S-Transnitrosation reactions are involved in the metabolic fate and biological actions of nitric oxide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*. **284**, 526-534.

MCMASTER, W. R., MORRISON, C. J., MACDONALD, M. H. & JOSHI, P. B. (1994). Mutational and functional analysis of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63: similarities to matrix metalloproteinases. *Parasitology*. **108** Suppl:S29-36.

MAUEL, J. & RANSIJN, A. (1997). *Leishmania* spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. *Experimental Parasitology*. **87**, 98-111.

MELINO, G., BERNASSOLA, F., KNIGHT, R. A., CORASANITI, M. T., NISTICO, G. & FINAZZI-AGRO, A. (1997). S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature*. **388**, 432-433.

MNAIMNEH, S., GEFFARD, M., VEYRET, B. & VINCENDEAU, P. (1997). Albumin nitrosylated by activated macrophages possesses antiparasitic effects neutralized by anti-NO-acetylated-cysteine antibodies. *Journal of Immunology*. **158**, 308-314.

MOTTRAM, J. C., SOUZA, A. E., HUTCHISON, J. E., CARTER, R., FRAME, M. J. & COOMBS, G. H. (1996). Evidence from disruption of the *lmc pb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **93**, 6008-6013.

NATHAN, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB Journal*. **6**, 3051-3064.

NATHAN, C. & SHILOH, M. U. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **97**, 8841-8848.

PALMER, R. M., FERRIGE, A. G. & MONCADA, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. **327**, 524-526.

RADI R. (1996). Reactions of nitric oxide with metalloproteins. *Chemical Research in Toxicology*. **9**, 828-835.

ROBERTS, S. C., WILSON, M. E. & DONELSON, J. E. (1995). Developmentally Regulated Expression of a Novel 59-kDa Product of the Major Surface Protease (Msp or gp63) Gene Family of *Leishmania Chagasi*. *Journal of Biochemistry*. **270**, 8884-8892.

ROSENTHAL, P. J. (1999). Proteases of protozoan parasites. *Advance in Parasitology*. **43**, 105-159.

SALVATI, L., MATTU, M., COLASANTI, M., SCALONE, A., VENTURINI, G., GRADONI, L. & ASCENZI, P. (2001). NO donors inhibit *Leishmania infantum* cysteine proteinase activity. *Biochimica Biophysica Acta*. **1545**, 357-366.

SCHNEIDER, P., ROSAT, J. P., BOUVIER, J., LOUIS, J. & BORDIER, C. (1992). *Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Experimental Parasitology*. **75**, 196-206.

SERENO, D. & LEMESRE, J. L. (1997). Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **41**, 972-976.

SISTO, M., BRANDONISIO, O., PANARO, M. A., ACQUAFREDDA, A., LEOGRANDE, D., FASANELLA, A., TROTTA, T., FUMAROLA, L. & MITOLO, V. (2001). Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*. **24**, 247-254.

TORRES J. & WILSON, M. T. (1999). The reactions of copper proteins with nitric oxide. *Biochimica Biophysica Acta*. **1411**, 310-322.

VOULDOUKIS, I., DRAPIER, J. C., NUSSLER, A. K., TSELENTIS, Y., DA SILVA, O. A., GENTILINI, M., MOSSALAYI, D. M., MONJOUR L. & DUGAS, B. (1996). Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **40**, 253-256.

VOULDOUKIS, I., RIVEROS-MORENO, V., DUGAS, B., OUAAZ, F., BECHEREL, P., DEBRE, P., MONCADA, S. & MOSSALAYI, M. D. (1995). The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **92**, 7804-7808.

Captions to figures

Figure 1. Effects of NO donors on *Leishmania amazonensis* amastigotes viability. A: 5 mM acidified sodium nitrite. B: 4 mg/ml nitrosylated albumin. C: 100 μ M or 1 mM SNAP. Results are expressed as the mean and standard deviation of three independent experiments performed in triplicate. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Figure 2. Effects of NO donors on *Leishmania amazonensis* amastigotes growth. A: 5 mM acidified sodium nitrite. B: 4 mg/ml nitrosylated albumin. C: 100 μ M or 1 mM SNAP. The growth curve of control amastigotes for the experiments with acidified sodium nitrite and nitrosylated albumin was the mean and standard deviation of each control growth curve corresponding to each incubation time of the kinetics. Results are expressed as the mean and standard deviation of three independent experiments performed in triplicate.

Figure 3. Effects of NO donors on *Leishmania amazonensis* amastigotes differentiation to promastigotes. A: 5 mM acidified sodium nitrite. B: 4 mg/ml nitrosylated albumin. C: 100 μ M or 1 mM SNAP. For the experiments of differentiation in the presence of acidified sodium nitrite and nitrosylated albumin, controls were the mean and standard deviation of each control corresponding to each incubation time of the NO donors kinetics. Results are expressed as the mean and standard deviation of three independent experiments performed in triplicate. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Figure 4. Proteinase activities in SDS-PAGE of *Leishmania amazonensis* amastigotes protein lysates (Lane 1), and in the presence of 10 mM 1,10-phenantroline, an inhibitor of metalloproteinases (Lane 2), 10 μ M *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanido)-butane E-64, an inhibitor of cysteine proteinases (Lane 3) or 5 mM acidified NaNO_2 (Lane 4). Figure is representative of three similar experiments.

Figure 5. Proteinase activities in SDS-PAGE of 5 mM acidified sodium nitrite-treated *Leishmania amazonensis* amastigotes protein lysates, after 20 minutes (control: lane 1, NO-treated: lane 2), 2 hours (control: lane 3, NO-treated: lane 4), 4 hours (control: lane 5, NO-treated: lane 6) or 12 hours (control: lane 7, NO-treated: lane 8) incubation. A: Hydrophilic phase. B: Amphiphilic phase. Figure is representative of two similar experiments.

Figure 1

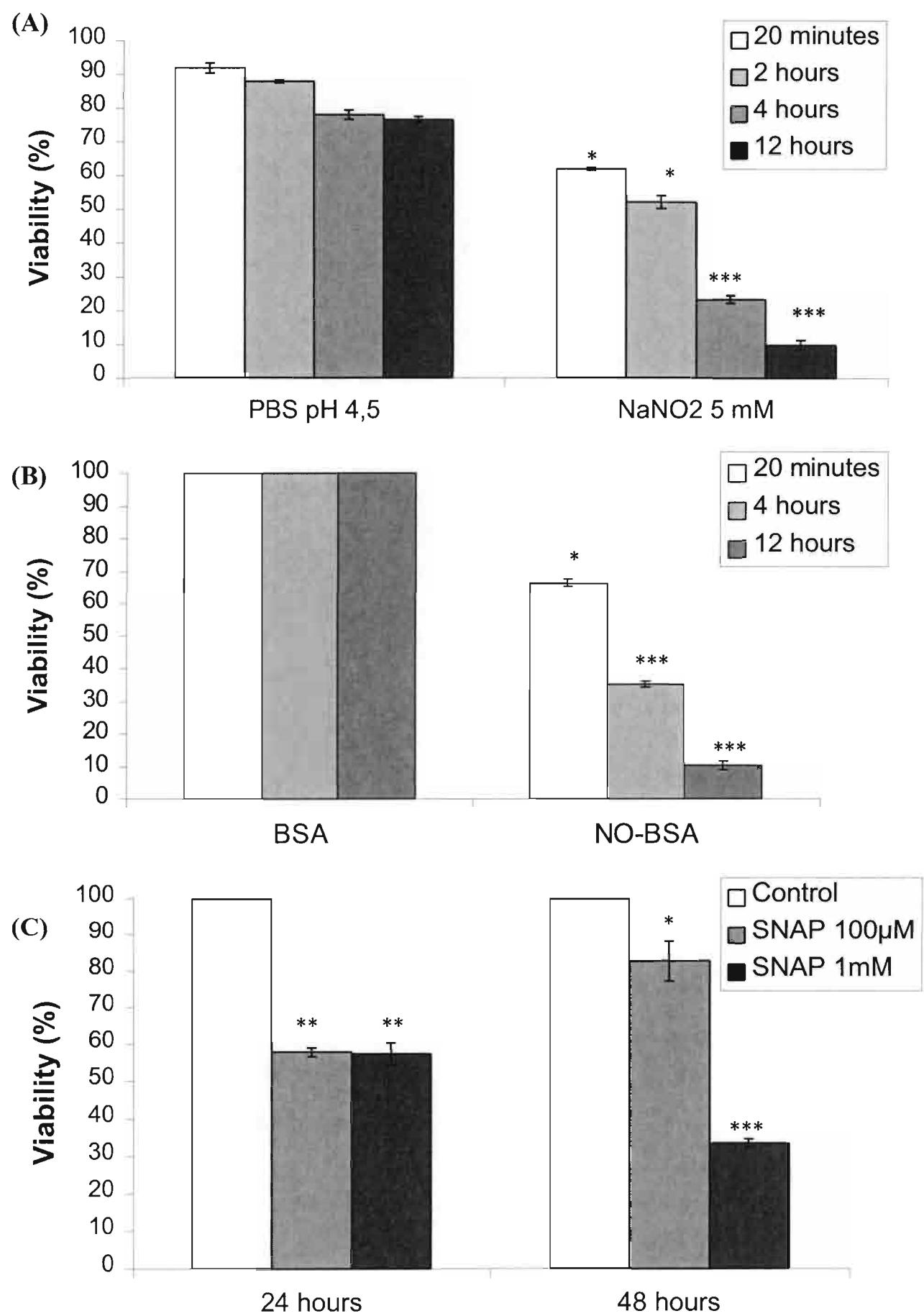


Figure 2

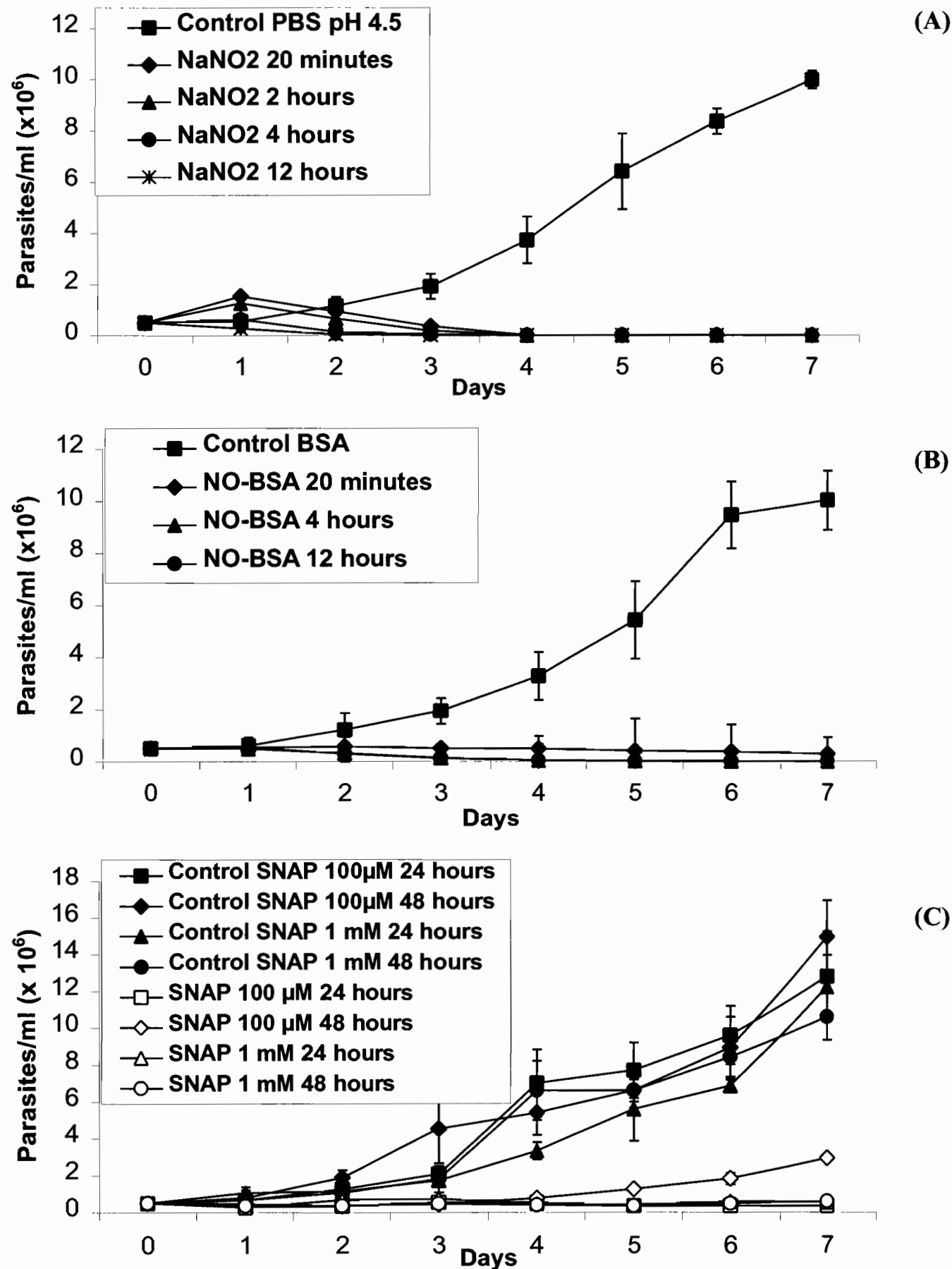


Figure 3

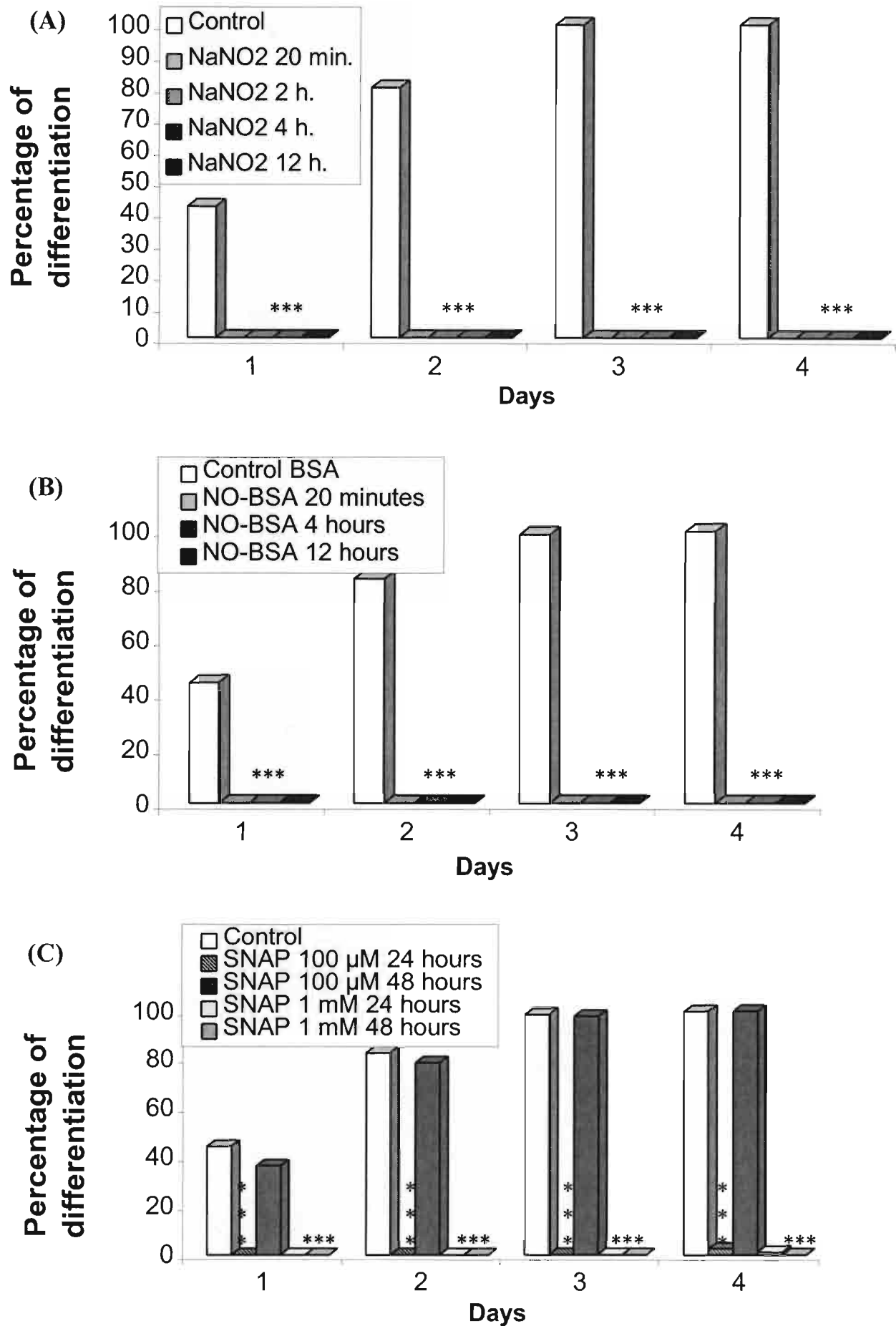


Figure 4

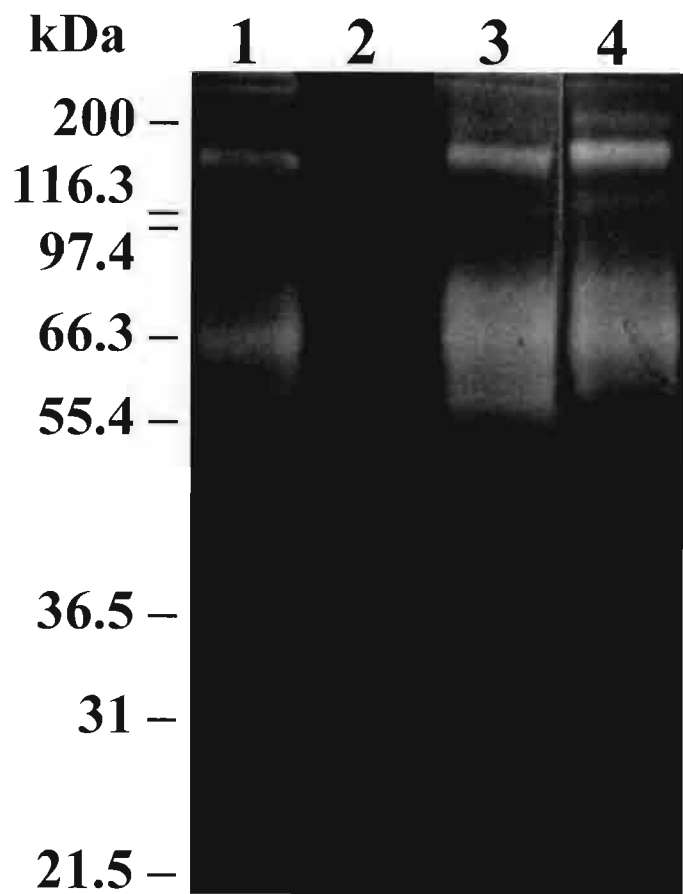
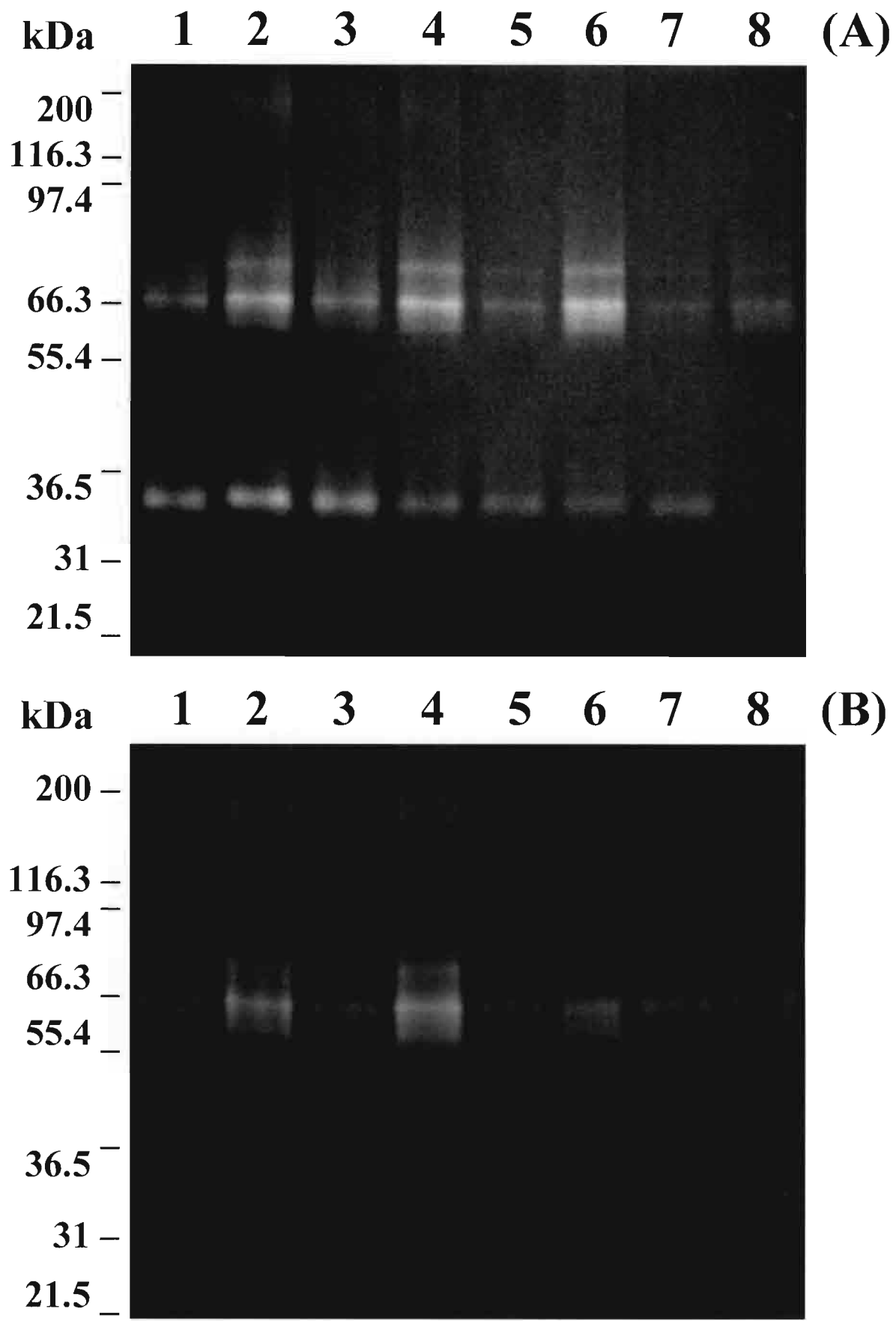


Figure 5



Article 7

Induction par le monoxyde d'azote d'une fragmentation d'ADN en oligonucléosomes dépendante du protéasome chez les formes amastigotes de *Leishmania amazonensis*

(Accepté pour publication, *Infection and Immunity*).

Le monoxyde d'azote (NO) est impliqué dans l'activité antimicrobienne des macrophages activés, qui induit la mort intracellulaire des parasites dans les leishmanioses murines. Cependant, il n'était pas aisé de mettre en évidence le(s) mécanisme(s) par lesquels le NO exerçait son effet leishmanicide sur des parasites en situation intracellulaire. Tirant partie de la culture axénique des formes amastigotes de leishmanies, il nous a été possible d'évaluer la sensibilité du stade parasitaire présent chez l'hôte mammifère infecté, aux composés microbicides produits par les macrophages activés, en particulier le NO. Les voies métaboliques induites par le NO conduisant à la mort du parasite ont été appréhendées.

Principaux résultats :

- ① La culture de formes amastigotes de *L. amazonensis* en présence de donneurs de NO (nitrite de sodium acidifié et albumine nitrosylée) conduit à une mort rapide des microorganismes.
- ② L'activation artificielle par une combinaison d'interféron γ et de lipopolysaccharide bactérien de macrophages péritonéaux de souris infectés *in vitro* par *L. amazonensis*, conduit à une forte production de NO corrélée à un effet leishmanicide significatif. Ces deux effets sont annulés par addition de la nitro-L-arginine (inhibiteur compétitif de la NO synthase inductible) et restaurés par supplémentation avec de la L-arginine, démontrant l'implication de la molécule NO dans la mort des leishmanies intracellulaires.
- ③ L'utilisation de techniques de référence (analyse de l'ADN par électrophorèse en gel d'agarose, TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling) *in situ* et cytométrie de flux avec la sonde YOPRO-1), nous a permis de démontrer que du NO exogène (apporté par des donneurs de NO) induisait une fragmentation en

oligonucléosomes de l'ADN des formes amastigotes de leishmanies, l'une des caractéristiques phénotypiques de l'apoptose.

④ La technique du TUNEL *in situ* nous a aussi permis de démontrer que le NO délivré de manière endogène par les macrophages activés, induisait également une fragmentation oligonucléosomique de l'ADN des formes amastigotes intracellulaires de *L. amazonensis*.

⑤ L'activation d'endonucléases responsables de cette fragmentation ne semble pas être sous le contrôle de l'activation de caspases comme l'indique l'absence d'effet des inhibiteurs spécifiques utilisés. Par contre, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques du protéasome, comme la lactacystine ou l'inhibiteur I de la calpaïne, prévient de façon significative le processus de mort cellulaire programmée induit par le NO.

Le NO est un inducteur d'apoptose qui a été très étudié sur les modèles de cellules de mammifères. Cette mort cellulaire programmée, conservée au cours de l'évolution, semble également concerner différents protozoaires parasites lorsqu'ils sont soumis à des stress physico-chimiques. Chez *Leishmania*, l'identification d'une mort cellulaire de phénotype apoptotique chez le stade parasitaire intracellulaire définit le mécanisme de défense de l'hôte. Néanmoins, ce processus apoptotique pourrait servir le parasite en limitant la réponse inflammatoire de l'hôte et en permettant la persistance de quelques parasites qui pourront réactiver l'infection ou servir de réservoir.

Nitric Oxide-Mediated Proteasome-Dependent Oligonucleosomal DNA Fragmentation in *Leishmania amazonensis* Amastigotes

Philippe Holzmüller,¹ Denis Sereno,¹ Mireille Cavaleyra,¹ Isabelle Mangot,¹ Sylvie Daulouede,² Philippe Vincendeau,² and Jean-Loup Lemesre^{1*}

UR 008 Pathogénie des Trypanosomatidés, Institut de Recherche pour le Développement, 34032 Montpellier Cedex 1,¹ and Laboratoire de Parasitologie, Université Victor Segalen Bordeaux II, 33076 Bordeaux Cedex,² France

Received 4 September 2001/Returned for modification 15 November 2001/Accepted 21 March 2002

Resistance to leishmanial infections depends on intracellular parasite killing by activated host macrophages through the L-arginine–nitric oxide (NO) metabolic pathway. Here we investigate the cell death process induced by NO for the intracellular protozoan *Leishmania amazonensis*. Exposure of amastigotes to moderate concentrations of NO-donating compounds (acidified sodium nitrite NaNO₂ or nitrosylated albumin) or to endogenous NO produced by lipopolysaccharide or gamma interferon treatment of infected macrophages resulted in a dramatic time-dependent cell death. The combined use of several standard DNA status analysis techniques (including electrophoresis ladder banding patterns, YOPRO-1 staining in flow cytometry, and in situ recognition of DNA strand breaks by TUNEL [terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling] assay) revealed a rapid and extensive fragmentation of nuclear DNA in both axenic and intracellular NO-treated amastigotes of *L. amazonensis*. Despite some similarities to apoptosis, the nuclease activation responsible for characteristic DNA degradation was not under the control of caspase activity as indicated by the lack of involvement of cell-permeable inhibitors of caspases and cysteine proteases. In contrast, exposure of NO-treated amastigotes with specific proteasome inhibitors, such as lactacystin or calpain inhibitor I, markedly reduced the induction of the NO-mediated apoptosis-like process. These data strongly suggest that NO-induced oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania* amastigotes is, at least in part, regulated by noncaspase proteases of the proteasome. The determination of biochemical pathways leading up to cell death might ultimately allow the identification of new therapeutic targets.

Leishmania spp. are obligate intracellular protozoan parasites of macrophages that are responsible for a wide range of human diseases, including self-healing skin lesions, diffuse cutaneous and mucosal lesions, or fatal visceral infections. In the *Leishmania* life cycle, two principal parasite forms exist: (i) the amastigote form that develops inside mononuclear phagocytes of a vertebrate host and (ii) the motile promastigote form that develops in the vector gut. The various possible outcomes of leishmanial infection have been associated with expansion of specific T helper lymphocyte populations (52). Immune control of leishmaniasis involves a dominant Th1 response, leading to macrophage activation and elimination of intracellular parasites through the induction of nitric oxide synthase (NOS II) and NO synthesis from L-arginine. This prototypical model has been largely evidenced in murine leishmaniasis (17, 22, 33). Human activated macrophages can also induce antileishmanial activity via the L-arginine NO pathway (44, 58, 60). Studies on human cutaneous leishmaniasis reveal that *Leishmania* killing is associated with NO production (40). Moreover, the capacity of canine macrophages to eliminate intracellular amastigotes through a NO-dependent mechanism has been documented (46, 55, 59).

NO-dependent cytostatic and/or cytotoxic activities by activated macrophages on various parasites have been clearly

demonstrated (20, 26, 29, 33, 57). In *Leishmania* infections, NO-generating creams applied topically to lesions revealed a modest efficacy in mouse models, whereas they were able to cure human patients (15, 65). Moreover, studies have shown that successful chemotherapy in a murine and canine model of visceral leishmaniasis depended on upregulation of the L-arginine NO pathway (14, 58). However, the cellular and molecular mechanisms whereby NO exerts its cytotoxic activity are not yet well understood. NO toxicity results from complex phenomena involving several molecular targets. In antitumoral models, impairment of essential cellular functions, including mitochondrial respiration, DNA synthesis by blocking ribonucleotide reductase (31), and enzyme inactivation through Fe/S center alterations or S nitrosylation, have been documented (16, 19). Recent studies found that several parasite targets may be affected by NO toxicity in *Leishmania* parasites. These targets include metabolic enzymes, such as GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and aconitase (29, 32) or cysteine proteinase (51).

Apoptosis represents an important mechanism by which exogenous or endogenous NO mediates toxicity in mammalian cells (1, 36, 41, 42, 63). We investigated the genomic DNA status of NO-treated *Leishmania amazonensis* amastigotes. Several apoptosis detection methods (appearance of the characteristic DNA ladder banding pattern on agarose gels and in situ TUNEL [terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling] and flow cytometry assays) revealed that *Leishmania* cell death was associated with extensive nuclear DNA fragmentation. Cell-permeable caspase inhibitors did not modify NO-mediated nuclear DNA

* Corresponding author. Mailing address: UR 008 Pathogénie des Trypanosomatidés, IRD (Institut de Recherche pour le Développement), 911 Ave. Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France. Fax: 33(0)4-67-41-63-30. Phone: 33(0)4-67-41-62-20. E-mail: lemesre@meiusine.mpl.ird.fr.

fragmentation. In contrast, endonuclease activation could be a consequence of Ca^{2+} -sensitive calpain and/or proteasome activity. These data strongly suggest that NO can induce damage in the unicellular pathogen *Leishmania* by a coordinated process of intracellular protein degradation mediated by the proteasome, which may lead to nuclear DNA fragmentation. An apoptosis-like cell death pathway could represent an important and highly regulated mechanism used for the clearance of *Leishmania* within infected macrophages stimulated to produce NO endogenously or during treatments with NO-releasing drugs.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Fetal calf serum (FCS) was obtained from Dutscher S.A. RPMI 1640 medium (lot 0MB0174) was purchased from BioWhittaker Europe, and L-glutamine (lot 3414) was from BioMedia. Penicillin-streptomycin (10,000 IU/ml to 10,000 UG/ml; lot 3037222) and phosphate buffer saline (Ca^{2+} and Mg^{2+} free) were obtained from Life Technologies. Bacterial lipopolysaccharide (LPS), gamma interferon (IFN- γ ; mouse recombinant), bovine serum albumin (BSA; fraction V, lot 59H0696), and MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; lot 66H5033) were purchased from Sigma. RNase was obtained from Eurogentec, proteinase K was from Promega, and agarose was purchased from Eurobio. YOPRO-1 iodide was provided by Molecular Probes. Nitro-L-arginine, inhibitory peptides Z-DEVD-CMK and Z-VAD-FMK, E-64d [(2S,3S)-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-3-methylbutane ethyl ester], calpain inhibitor I, lactacystin, proteasome inhibitor II, and MG-115 were purchased from Alexis Biochemicals. All other cellular-grade and molecular biology-grade chemicals were obtained from Sigma. Cell-free MAA/20 culture medium for axenically grown amastigotes was defined according to the method of Lemesre et al. (29, 30). Nitrosylated albumin was prepared as previously described (38).

Animals. Female BALB/c mice (Iffa Credo, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France) were housed under conventional conditions and given water and chow ad libitum. The use of the animals conformed to institutional guidelines.

Parasites and in vitro cultures. A cloned line of *L. amazonensis* (MHOM/BR/76/LTB-012) was used in all experiments. *L. amazonensis* axenically grown amastigote forms were maintained at $32 \pm 1^\circ\text{C}$ by weekly subpassages in MAA/20 medium. From a starting inoculum of 5×10^5 amastigote forms/ml, a cell density of ca. 2×10^7 parasites/ml was obtained on day 7. Axenically grown amastigote forms appeared homogeneous, round to ovoid, without apparent flagella, and nonmotile. Axenically grown amastigotes from various *Leishmania* species clearly resembled intracellular amastigotes with regard to their ultrastructural, biological, biochemical, and immunological properties (5, 6, 13, 24, 29, 30, 53). Cell concentrations were determined by daily counts with a hemocytometer at a $\times 400$ magnification after adequate dilution in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.25% glutaraldehyde.

Treatment with the NO donors sodium nitrite (NaNO_2) and nitrosylated albumin (NO-BSA). Late-log-phase amastigote forms were washed three times in PBS-0.01 M (pH 4.5) before treatment. Parasites (10^7 /ml) were resuspended in the same buffer containing 5 mM sodium nitrite. After 20 min, 2 h, 4 h, 6 h, and 12 h of incubation at $32 \pm 1^\circ\text{C}$ in the dark, respectively, parasites were washed in Ca^{2+} - Mg^{2+} -free PBS (0.01 M, pH 7.2) before analysis. Control amastigotes were treated in the same way but in the absence of sodium nitrite.

Albumin or nitrosylated albumin (4 mg/ml) was added to the parasite cultures. After incubation for 20 min, 4 h, or 12 h at $32 \pm 1^\circ\text{C}$, the amastigotes were washed three times in Ca^{2+} - Mg^{2+} -free PBS (0.01 M, pH 7.2) before analysis.

Assessment of NO donors' effect on amastigote survival. NO-treated and untreated amastigotes (2×10^6 /ml) were resuspended in MAA/20 medium for each incubation time. The MTT-based microassay was used to estimate NO-induced death as described before (53). Tetrazolium bromide has the property of being reduced by parasitic dehydrogenases into a dark blue insoluble formazan product, the amount of which depends on the number of viable amastigotes. Briefly, parasites (100 μl) were seeded in a 96-well microplate. After a 1-h incubation, 10 μl of MTT (10 mg/ml) was added to each well, and the plates were further incubated for 4 h. The enzyme reaction was then stopped by the addition of 100 μl of 50% isopropanol-10% sodium dodecyl sulfate. The plates were incubated for an additional 30 min while being agitated at room temperature before the optical density value at 570 nm was determined with a Titer-Tech 96-well scanner (LabSystems Multiskan EX).

In vitro macrophage infections. Mouse peritoneal macrophages were washed with prewarmed RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM glutamine, 100 U of penicillin/ml, and 100 μg of streptomycin/ml and cultured overnight in 16-well Lab-Tek tissue culture slides (Nalge Nunc International). Nonadherent cells were removed by two washes with prewarmed RPMI medium, and then the macrophages were infected with stationary-phase extracellular amastigotes at a parasite/macrophage ratio of 3:1 for 2 h at 34°C with 5% CO_2 . Noninternalized parasites were removed by gentle washing. Infected macrophages were then cultured in the presence or absence of the following reagents: LPS (10 ng/ml), gamma interferon (IFN- γ ; 100 U/ml), and a combination of LPS and IFN- γ . Controls were made by adding 1 mM nitro-L-arginine, a competitive inhibitor of NOS II, or 1 mM nitro-L-arginine plus 2 mM L-arginine to revert the inhibition.

Culture supernatants were collected for nitrite production measurement 48 h later. Macrophages were then washed with prewarmed RPMI, fixed with methanol, and stained with Giemsa for parasite counts or processed for the TUNEL technique (see below). The percent parasite index (PI) inhibition compared to the untreated controls was calculated as follows: percent PI = $100 - [(\text{mean number of amastigotes per macrophage} \times \text{percent infected macrophages in treated wells}) / (\text{mean number of amastigotes per macrophage} \times \text{percentage of infected macrophages in untreated wells})] \times 100$. The results were taken as the mean of duplicate experiments.

Measurement of nitrite production. NO_2^- accumulation in the medium over 48 h for the leishmanicidal assay was used as an indicator of NO production and was assayed by the Griess reaction (50). Briefly, 60 μl of Griess reagent A (1% sulfanilamide in 1.2 N HCl) and 60 μl of Griess reagent B [0.3% N-(1-naphthyl)ethylenediamine] were added to 100 μl of each supernatant in triplicate wells in a 96-well plate. Plates were read at 540 nm in an enzyme-linked immunosorbent assay plate reader (LabSystems Multiskan EX). NaNO_2 in RPMI was used to construct a standard curve for each plate reading.

In situ TUNEL assay. Slides with infected macrophages or axenic amastigotes were fixed for 20 min with PBS containing 4% paraformaldehyde, washed twice with 0.01 M PBS (pH 7.2), and stored at -20°C until use. DNA fragmentation was analyzed in situ by using a colorimetric apoptosis detection system (Promega, Madison, Wis.) according to the manufacturer's instructions. After performance of the TUNEL protocol, preparations were analyzed under a microscope at $\times 1,000$ magnification. Apoptotic nuclei appeared dark brown. Other nuclei were not colored.

DNA agarose gel electrophoresis. Cell pellets were incubated in lysis buffer (10 mM Tris, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100 [pH 7.4]) for 30 min at 4°C . Qualitative analysis of DNA fragmentation was performed as previously described (7) by agarose gel electrophoresis of DNA extracted from 5×10^6 axenically grown amastigotes. DNA was then visualized under UV light after the gels were stained with ethidium bromide.

Flow cytometry analysis with YOPRO-1. The percentage of apoptotic cells was quantitated by flow cytometric analysis by using the DNA intercalant YOPRO-1 as previously described (25). Briefly, 10^6 *L. amazonensis* amastigotes were incubated with 10 μM YOPRO-1 for 10 min. Cells were immediately analyzed with a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Ivry, France) by using an argon-ion laser tuned to 488 nm. Green cell fluorescence, gated on forward scatter and side light scatter, was collected by using a (525 ± 10)-nm band-pass filter (FL1) and displayed by using a logarithmic amplification.

Statistical analysis. Statistical significance was analyzed by Student's *t* test. All experiments were performed at least twice.

RESULTS

Kinetics of NO-mediated effect on *L. amazonensis* amastigote viability. Treatment of *L. amazonensis* extracellular amastigotes with both NO donors led to a dramatic loss of parasite viability with regard to morphological changes such as decreased cell volume under microscopic examination (data not shown), as well as a decrease in dehydrogenase activities as determined by the MTT micromethod (Fig. 1). Exposure of axenically grown amastigotes to NO generated from acidified 5 mM NaNO_2 resulted in a time-dependent cell death (Fig. 1A). Significant toxicity could be detected as early as 20 min after treatment with the chemical (ca. 40% of amastigote mortality). Survival gradually decreased; $<10\%$ of the microorganisms were viable after a 12-h exposure to NO generated from

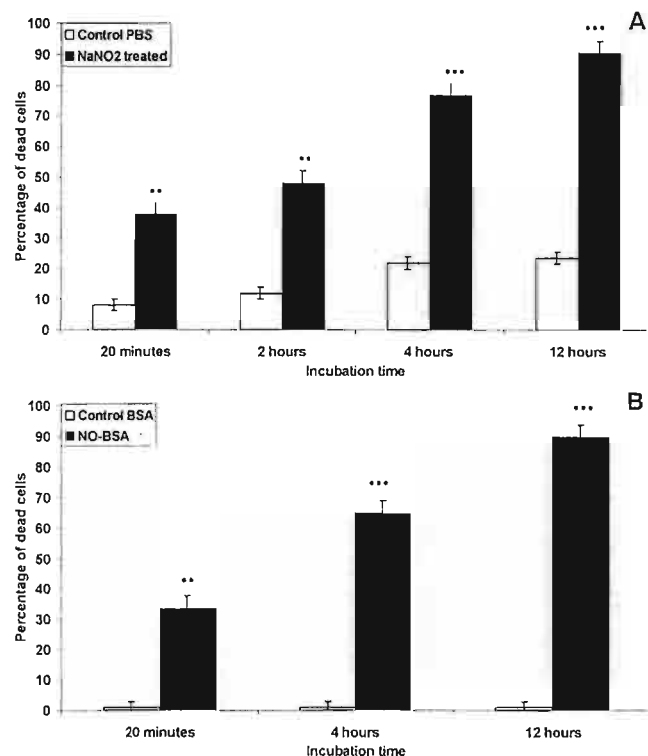


FIG. 1. Effects of 5 mM acidified sodium nitrite (A) or 4 mg of nitrosylated albumin/ml (B) on the death of *L. amazonensis* amastigotes. Parasite viability was assessed by the MTT micromethod as described by Sereno and Lemesre (53). Statistical significance was determined by the Student's *t* test. Results are expressed as the mean and standard deviation of three independent experiments made in triplicate. Statistical significance: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

NaNO₂. Incubation of amastigotes in PBS (pH 4.5) in the absence of added NaNO₂ did not significantly affect parasite viability in the first few hours, and fewer than 25% amastigotes were dead after 12 h (Fig. 1A).

About 30% of amastigotes exposed to 4 mg of NO-BSA/ml were killed within the first 20 min of incubation, reaching ca. 65 and 90% after 4 and 12 h of incubation, respectively (Fig. 1B). The addition of albumin alone at 4 mg/ml failed to affect amastigote viability, even after 12 h of incubation (Fig. 1B), and no striking morphological change was observed under the microscope (not shown).

The relevance of the observations above would remain questionable unless similar effects could be observed in intracellular amastigotes of *L. amazonensis* exposed to endogenous NO produced by activated macrophages. Mouse peritoneal macrophages infected with axenically cultured amastigotes and activated for 24 and 48 h with IFN- γ and LPS led to a time-dependent intracellular killing of *Leishmania* as determined by the reduction of PIs of ca. 55% at 24 h and 90% at 48 h (Fig. 2B), concomitant with NO₂⁻ accumulation in culture fluids (Fig. 2A). NO₂⁻ production and antileishmanial activity both decreased in the presence of 1 mM nitro-L-arginine, a competitive inhibitor of NOS II. They were almost totally restored by the addition of 2 mM L-arginine (Fig. 2). Inhibition of the PI

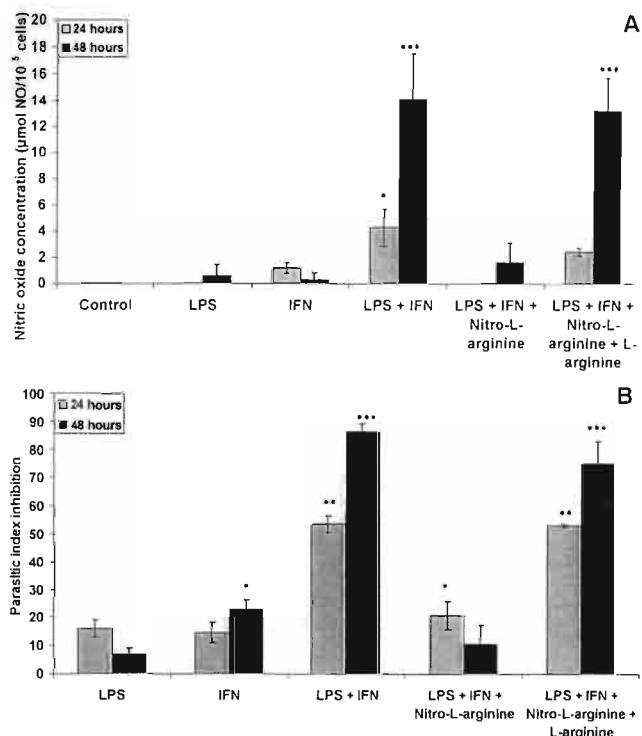


FIG. 2. NO-dependent cytotoxicity against *L. amazonensis* in activated mouse macrophages. Macrophages were infected with *L. amazonensis* amastigotes at a cell/parasite ratio of 1:3 in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS. Infected cells were treated with LPS, IFN- γ , LPS plus IFN- γ , LPS plus IFN- γ plus nitro-L-arginine (a competitive inhibitor of NOS II), and LPS plus IFN- γ plus nitro-L-arginine plus L-arginine (to reverse NOS II inhibition). NO₂⁻ levels in supernatants (A) and PI inhibitions in cells (B) were determined 24 and 48 h later. The results represent the mean and standard deviation of two independent experiments made in duplicate. Statistical significance: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

did not exceed 20% when incubation conditions did not induce NO production (Fig. 2B).

NO-mediated apoptosis-like DNA fragmentation of *L. amazonensis* amastigotes. NO-mediated DNA fragmentation exhibiting features of apoptosis was first assessed by using extracellular amastigotes incubated 5 mM NaNO₂ and monitoring the genomic DNA status of treated versus untreated parasites. As shown in Fig. 3 (lanes 5, 7, and 9), nuclear DNA fragmentation into oligonucleosomal-sized fragments (720, 360, and 180 bp), a typical feature of apoptotic cells, was readily visible in the case of NO-treated amastigotes. Untreated amastigotes did not show any DNA fragmentation, even after 6 h of incubation in acidic conditions (Fig. 3, lanes 2, 4, 6, and 8). Interestingly, NO-mediated nuclear DNA fragmentation (720-bp multimer) could be detected as early as after 2 h of contact with the NO donor (Fig. 3, lane 5). After 6 h of contact with the chemical, the entire genomic DNA of amastigotes was mostly fragmented into oligonucleosome-sized DNA of 360 and 180 bp (Fig. 3, lane 9), the end products of DNA alteration in apoptosis.

Endonuclease activity was also evaluated by the TUNEL assay. As shown in Fig. 4C, nuclei of axenically grown amastigotes exposed to 5 mM NaNO₂ were intensely stained dark

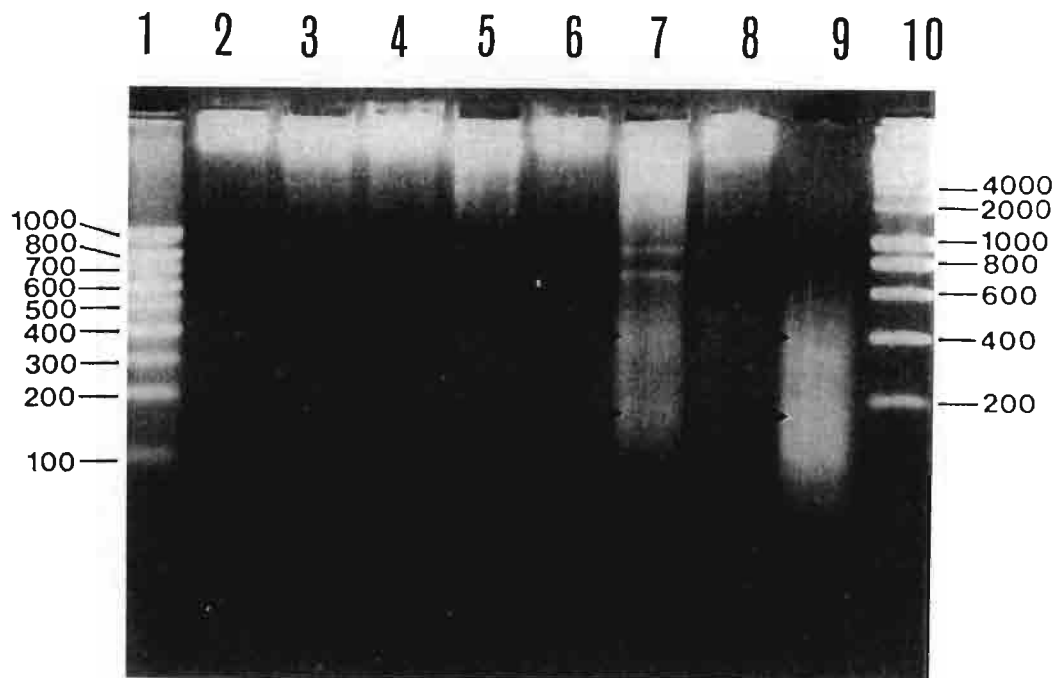


FIG. 3. DNA fragmentation analysis. Agarose gel electrophoresis of untreated amastigote (suspended in PBS [pH 4.5], lanes 2, 4, 6, and 8) and NO-treated amastigote (suspended in PBS [pH 4.5] plus 5 mM NaNO_2 ; lanes 3, 5, 7, and 9) DNA (5 μg) is shown. Exposure times: 20 min (lanes 2 and 3), 2 h (lanes 4 and 5), 4 h (lanes 6 and 7), and 6 h (lanes 8 and 9); molecular weights are indicated beside lanes 1 and 10. The experiment was done four times.

brown after a 4-h incubation in contrast to those of untreated parasites (Fig. 4A). Corresponding controls incubated without terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme in order to determinate the specificity of the reaction did not show any staining (Fig. 4B and D). Interestingly, kinetoplast DNA of

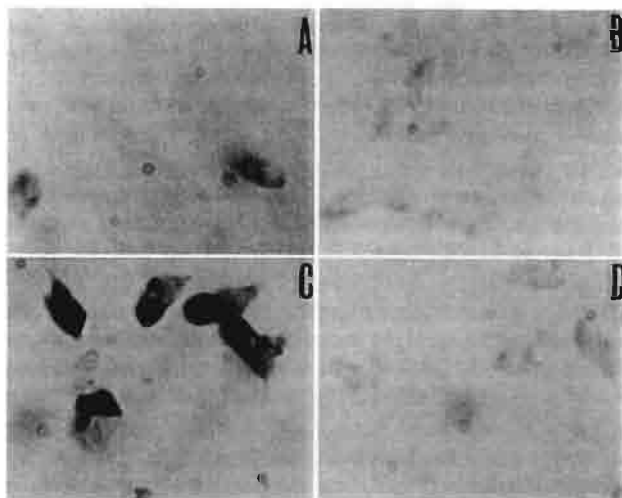


FIG. 4. In situ analysis of *L. amazonensis* extracellular amastigote death exhibiting features of apoptosis. (A and B) Untreated (PBS [pH 4.5], 4 h) amastigotes (A) and, as negative control, untreated parasites incubated without TdT (B). (C and D) NO-treated amastigotes (5 mM NaNO_2 , 4 h) incubated with (C) or without (D) TdT. DNA fragmentation analysis was determined by the TUNEL method and analyzed under a microscope at $\times 1,600$ magnification. The experiment was done twice.

NO-treated and untreated amastigotes was also stained. Indeed, replication of kinetoplast DNA involves the release of catenated minicircles from the network with subsequent DNA 3'-OH tail production stained by biotinylated dUTP via the TdT enzyme. Similarly, the in situ TUNEL technique revealed that the nuclear DNA fragmentation of intracellular amastigotes also occurred in *Leishmania*-infected stimulated macrophages (Fig. 5). Moreover, a strong correlation between nuclear DNA fragmentation, increased NO_2^- levels, and antileishmanial activity was observed (Fig. 2 and 5). Labeled amastigote nuclei could only be visualized inside activated macrophages producing NO (Fig. 5D and F). Nuclei of intracellular amastigotes, which we can visualize after Giemsa staining, were free of label in nonactivated macrophages (Fig. 5A) and in macrophages stimulated with LPS alone (B), with $\text{IFN-}\gamma$ alone (C), or with LPS and $\text{IFN-}\gamma$ plus 1 mM nitro-L-arginine (E). In the absence of TdT enzyme, corresponding negative controls did not exhibit any staining, thus demonstrating the specificity of the reaction (Fig. 5G and H).

Quantitation and time course of NO-mediated cell death of *L. amazonensis* amastigotes. The impermeable DNA intercalated YOPRO-1 has been previously used for monitoring the apoptosis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes (3, 25). We show here that it could also selectively differentiate viable, necrotic (sodium dodecyl sulfate-treated), and apoptotic amastigotes (Fig. 6). Trivalent antimonial (potassium antimonyl tartrate at 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was used as a positive apoptosis inducer as described by Sereno et al. (54). Antimonial-mediated apoptotic cells (Fig. 6C and D) were easily distinguished from living (Fig. 6E and F) and necrotic cells (Fig. 6A and B) by using the com-

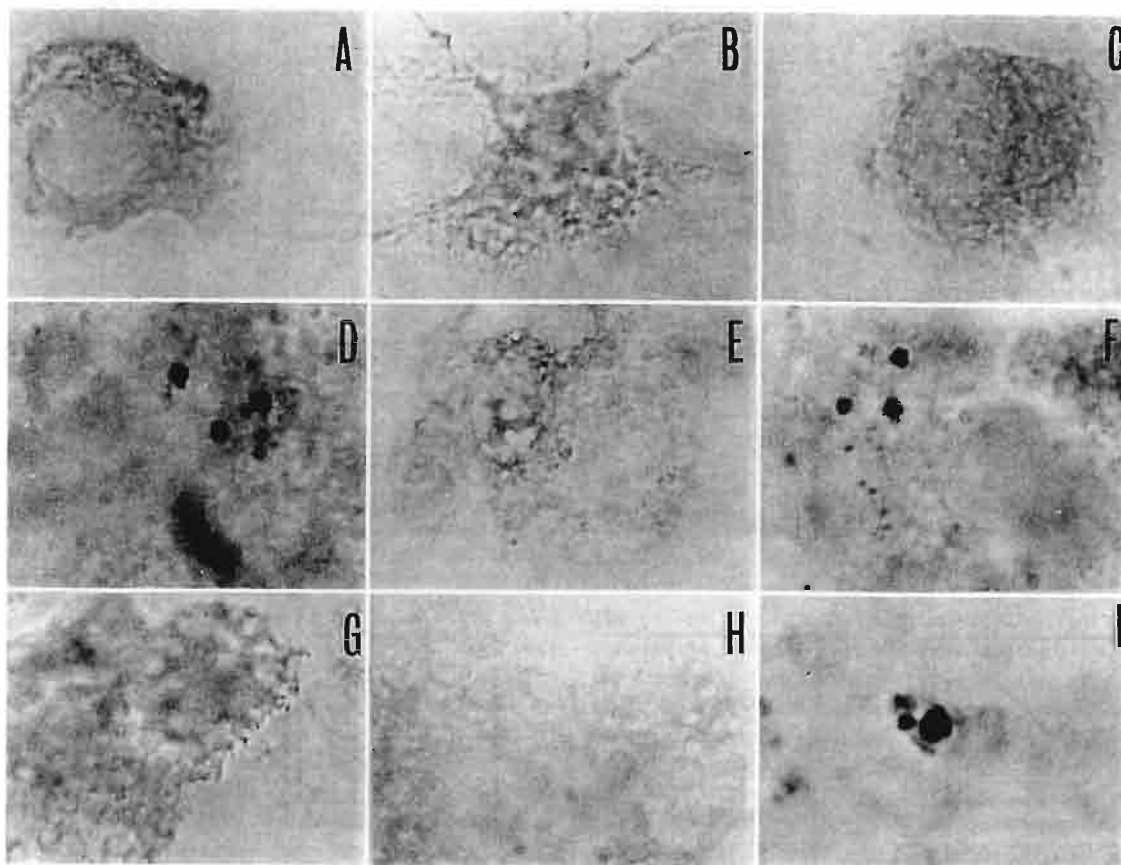


FIG. 5. In situ analysis of the apoptosis-like process of *L. amazonensis* amastigotes in mouse macrophages. Cells were infected with amastigote forms at a parasite/cell ratio of 3:1 in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS. Infected cells were activated for 48 h. (A) Untreated macrophages; (B) macrophages activated with LPS; (C) macrophages activated with IFN- γ ; (D) macrophages activated with LPS plus IFN- γ ; (E) macrophages activated with LPS plus IFN- γ plus nitro-L-arginine (a competitive inhibitor of NO synthase type II); (F) macrophages activated with LPS plus IFN- γ plus nitro-L-arginine plus L-arginine (to reverse inhibition of NOS-II). (G and H) Negative controls, either activated macrophages (G) or nonactivated macrophages (H), were incubated without TdT. DNA fragmentation analysis was determined by the TUNEL technique and analyzed under a microscope at $\times 1,000$ magnification (A to H). A magnification of $\times 1,600$ was used to identify labeled amastigotes in panel I. The experiment was done twice.

bined analysis of their different patterns of FSC-H properties and YOPRO-1 staining (FL1-H).

The time course of the apoptosis-like changes was determined by evaluating the percentage of cells that exhibited the maximum fluorescence seen in NO-treated amastigotes. Amastigotes incubated in 0.01 M PBS (pH 4.5) for 20 min, 2 h, and 4 h (not shown) and 6 h (Fig. 6E and F) displayed a homogeneous population of living cells with a low fluorescence background. In contrast, a new cell population with a high FL1 fluorescence corresponding to apoptotic cell-like cells appeared in NO-treated amastigotes. This population increased as a function of exposure time to the NO donor, representing ca. 14% at 20 min (not shown), 19.9% at 2 h (Fig. 6G and H), 46.9% at 4 h (Fig. 6I and J), and 88.9% at 6 h (Fig. 6K and L). Interestingly, the time courses of YOPRO-1 staining and of viability loss were quite similar (Fig. 1 and 6). Altogether, these data indicated that NO directly and quickly induced extracellular amastigote death through a process that mimics apoptosis.

Effects of apoptosis inhibitors. In higher eukaryote cells, apoptosis often occurs downstream of the death signal by pro-

tease activation, leading to endonuclease ignition (21). In these instances, cysteine proteases of the caspase family, Ca^{2+} -sensitive calpains, or proteasomes can initiate cell death. We used here cytofluorometric analysis with YOPRO-1 staining to test the relevance of these pathways with apoptosis inhibitors. Amastigote treatment with apoptosis-blocking agents did not alter the viability of untreated amastigotes during the time course experiments (not shown). Whereas caspase inhibitors reversed the apoptosis of murine peritoneal macrophages induced by 4 mM butyrate as recently described (47), inhibitors of caspase 3 (inhibitory peptide Z-DEVD-CMK at 5 μM), caspase 1 (inhibitory peptide Z-VAD-FMK at 5 μM), or cysteine proteases (E-64d at 20 μM) had no effect on the cell death induced by NO (data not shown). In contrast, a significant time-dependent inhibitory effect was observed on the NO-mediated apoptosis-like phenomenon with specific irreversible proteasome inhibitors (10 μM lactacystin and 20 μM calpain inhibitor I) (Fig. 7). Treatment with reversible proteasome inhibitors (10 μM proteasome inhibitor II or 10 μM MG-115) exhibited a less potent and an inversely time-dependent inhibitory activity. In the first 2 h of treatment, all of the proteasome

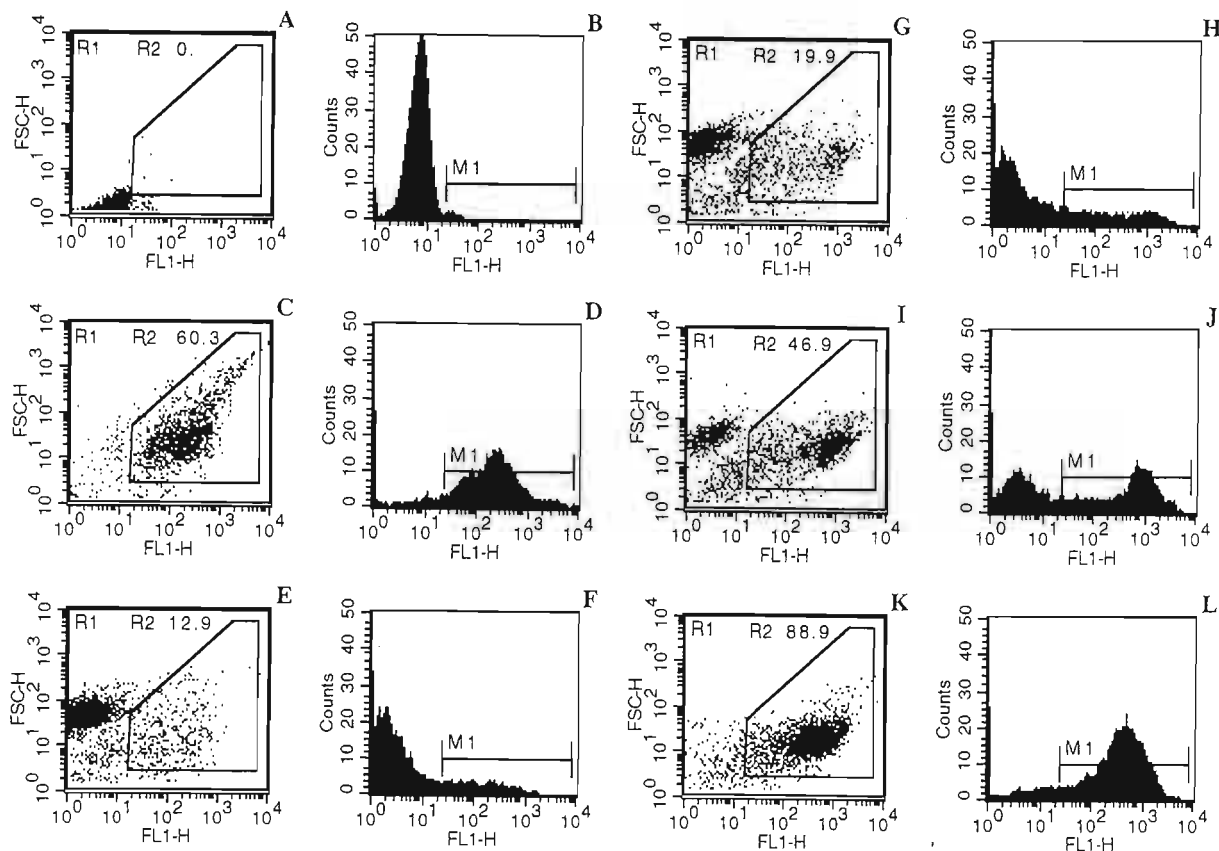


FIG. 6. Analysis of the NO-induced apoptosis-like process in extracellular amastigotes by a cytofluorometry YOPRO-1 differential staining technique. Parasites were incubated for 6 h in 0.01 M PBS (pH 7.2) (negative control, not shown), treated for 10 min by 0.1% sodium dodecyl sulfate (necrosis control, A and B), and treated for 24 h with 50 μ g of potassium antimonyl tartrate/ml (apoptosis control, C and D). Amastigotes were, respectively, incubated in 0.01 M PBS (pH 4.5) as an internal control (a 6-h incubation is depicted in E and F) and treated with 5 mM NaNO_2 for 2 h (G and H), 4 h (I and J), or 6 h (K and L). The apoptotic cell percentage (R2), corresponding to both reduced forward scatter and high fluorescence intensity, is indicated in each experimental condition. M1 shows the peak of fluorescence intensity in panels B, D, F, H, J, and L. The experiment was done three times in duplicate.

inhibitors used exerted an inhibitory effect ranging from 20 to 40%. After a 4-h incubation with proteasome inhibitor II and MG-115, NO-induced DNA changes were reduced by ca. 25%, whereas lactacystin and calpain inhibitor I produced marked inhibitions of 47 and 62%, respectively. These percentages reached ca. 50 and 64%, respectively, after 6 h of incubation (Fig. 7). All of these data support the view that the proteasome pathway could be involved in promoting apoptosis-like changes in NO-exposed amastigotes.

DISCUSSION

In this study we showed that the leishmanicidal effect of NO seemed to be the consequence of the induction of a programmed cell death-like process. NO donors induced a pattern of DNA fragmentation typical of an apoptotic process in axenic amastigotes of *L. amazonensis*. This apoptotic phenomenon was confirmed by both the TUNEL technique and flow cytometry. This typical aspect of apoptosis was also demonstrated in the *Leishmania* intracellular parasite stage inside NO-producing macrophages, by using the combination IFN- γ and LPS, which is mainly used as a potent inducer of NOS II.

NO also seems to be able to induce necrosis, as well as apoptosis (34). Interestingly, NO-mediated apoptosis has been extensively studied in mammalian cells (1, 2, 12, 18, 28, 36, 63). Recent reports have shown that unicellular organisms may kill themselves by an evolutionarily conserved programmed cell death pathway (i.e., apoptosis) (4). This pathway has been described in several lower organisms, including the slime mold *Dictyostelium discoideum* (11) and several parasitic protozoa. The effect of chloroquine on a sensitive strain of the malaria parasite *P. falciparum* led to an oligonucleosomal DNA fragmentation, suggesting that apoptosis may be involved in the action of chloroquine on the parasite (45). *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma brucei rhodesiense* procyclic forms, upon treatment with the lectin concanavalin A, died by a process similar to apoptosis in mammals (61, 62); changes in cytoskeletal organization, cytosol vacuolization, and nuclear DNA fragmentation were reported. Apoptosis-like changes have also been reported for *T. cruzi* in response to conditioned medium or antibiotic G418 (3). A shift in the distribution of EF-1 α to a nuclear localization was reported as one of the changes associated with cell death (8). In leishmaniasis, a heat

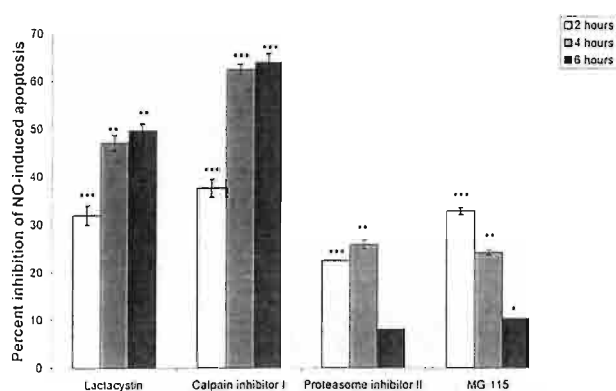


FIG. 7. Percentage of apoptotic cells, in the presence of proteasome inhibitors, as measured by flow cytometry and YOPRO-1 staining of NO-treated amastigotes of *L. amazonensis* (5 mM NaNO₂). Incubation media were supplemented with the following proteasome inhibitors: lactacystin (10 μ M), calpain inhibitor I (20 μ M), proteasome inhibitor II (10 μ M), and MG-115 (10 μ M). Statistical significance was determined by the Student's *t* test. The results are the means $\pm$ the standard deviation of three independent experiments made in duplicate. Statistical significance: *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001.

shock was able to induce in promastigotes of *L. amazonensis* a DNA cleavage into an oligonucleosomal ladder characteristic of cells dying by apoptosis (39). In the same way, luteolin and quercetin, two plant-derived flavonoids, inhibited cell cycle progression in *L. donovani* promastigotes, leading to apoptosis (37). Recently, we demonstrated that the antileishmanial toxicity of trivalent antimonials is associated with parasite oligonucleosomal DNA fragmentation, a finding indicative of the occurrence of late events in the overall apoptosis process (54). However, the activation of an apoptosis-like machinery in the parasite stage directly in contact with macrophage antimicrobial agents such as NO (i.e., amastigotes) has never been investigated. In the present study, we demonstrated that both axenically grown and intracellular *L. amazonensis* amastigotes, when submitted to NO action, commit cell suicide through a pathway that is referred to as apoptosis.

In the last few years it has been established that protease activation—in cysteine proteases of the caspase family in particular—is an integral component of the apoptotic cell death metabolic pathway (64). We report here that cell-permeable caspase inhibitors had no effect on the oligonucleosomal DNA fragmentation induced by NO on *L. amazonensis* amastigotes. This result correlated with observations made on *T. brucei* brucei exposed to reactive oxygen species (48). The inhibitors used are known, at least, to block caspases that are directly and indirectly responsible for the activation of endonuclease activity (i.e., caspases 3 and 1, respectively). NOS II induction is triggered and regulated by a series of signaling pathways inducing NF- κ B (56). Inhibitors of the proteasome and caspase 3 abrogate the induction of NOS II in macrophages by blocking activation of the transcription factor NF- κ B (9, 23). These inhibitors cannot be used in culture models relying on NOS II induction. Thus, our experiments of inhibition were restricted to axenically grown amastigotes. Surprisingly and in contrast to data obtained from African trypanosomes by Ridgley et al. (48), specific irreversible proteasome inhibitors (lactacystin

and calpain inhibitor I) markedly inhibited the NO-induced oligonucleosomal DNA fragmentation of *Leishmania* extracellular amastigotes, suggesting that an NO-mediated apoptosis-like process needed proteasome activity to work. This divergence with the observations made by Ridgley et al. (48) might be explained by the status of cell maturation of the parasite considered (35). Moreover, evidence is now accumulating that noncaspases, including cathepsins, calpains, granzymes, and the proteasome complex, also have roles in mediating and promoting cell death (27, 43). Recent studies have otherwise pointed out in two *Leishmania* species the existence of an active proteasome, one similar to the proteasomes of other eukaryotes (10, 49). This potent proteasome might be involved in the NO-mediated apoptosis-like process. This finding suggests the existence of an ancestral noncaspase protease cell death pathway.

Finally, NO-mediated cytostatic and cytotoxic effects on axenically grown amastigotes were thus a consequence of the activation of a cell death program exhibiting features of apoptosis. A proteasome-dependent apoptosis-like machinery is also present and active in the clinically relevant stage of the parasite (i.e., amastigote) and can be induced in the host cell by the L-arginine–NO pathway. However, this apoptotic event might limit the host's inflammatory and specific immune responses, leading to a decrease in NO-dependent parasite killing and favoring the persistence of some parasites. Nevertheless, NO donors have been used to cure murine and human cutaneous leishmaniasis (15, 65). The investigation of an apoptotic process in cells from NO-treated lesions might merit further research.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Phil Agnew for reviewing the manuscript and for many useful suggestions.

REFERENCES

- Albina, J. E., and J. S. Reichner. 1998. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer Metastasis Rev.* 17:39–53.
- Albina, J. E., S. Cui, R. B. Mateo, and J. S. Reichner. 1993. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 150: 5080–5085.
- Ameisen, J. C., T. Idziorek, O. Billaut-Mulot, M. Loyens, J. P. Tissier, A. Potentier, and A. Ouassii. 1995. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and the control of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell. Death Differ.* 2:285–300.
- Ameisen, J. C. 1996. The origin of programmed cell death. *Science* 272:1278–1279.
- Bates, P. A. 1993. Characterization of developmentally regulated nucleases in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. *FEMS Microbiol. Lett.* 107:53–58.
- Bates, P. A., C. D. Robertson, L. Tetley, and G. H. Coombs. 1992. Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology* 105:193–202.
- Berman, J. D., J. V. Gallalee, and J. M. Best. 1987. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem. Pharmacol.* 36:197–201.
- Billaut-Mulot, O., R. Fernandez-Gomez, M. Loyens, and A. Ouassii. 1996. *Trypanosoma cruzi* elongation factor 1- α : nuclear localization in parasites undergoing apoptosis. *Gene* 174:19–26.
- Chakravorty, D., Y. Kato, T. Sugiyama, N. Koide, M. M. Mu, T. Yoshida, and T. Yokoshi. 2001. Inhibition of caspase-3 abrogates lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by preventing activation of NF- κ B and c-jun NH₂-terminal kinase/stress-activated protein kinase in RAW 264.7 murine macrophage cells. *Infect. Immun.* 69:1315–1321.
- Christensen, C. B., L. Jorgensen, A. T. Jensen, S. Gasim, M. Chen, A. Kharazmi, T. G. Theander, and K. Andresen. 2000. Molecular characterization of a *Leishmania donovani* cDNA clone with similarity to human 20S proteasome a-type subunit. *Biochim. Biophys. Acta* 1500:77–87.

11. Cornillon, S., C. Foa, J. Davoust, N. Buonavista, J. D. Gross, and P. Golstein. 1994. Programmed cell death in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* 107:2691–2704.
12. Cui, S., J. S. Reichner, R. B. Mateo, and J. E. Albina. 1994. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. *Cancer Res.* 54:2462–2467.
13. Cysne-Finkelstein, L., R. M. Temporal, F. A. Alves, and L. L. Leon. 1998. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Exp. Parasitol.* 89:58–62.
14. Das, L., N. Datta, S. Bandyopadhyay, and P. K. Das. 2001. Successful therapy of lethal murine visceral leishmaniasis with cystatin involves upregulation of nitric oxide and a favorable T-cell response. *J. Immunol.* 166:4020–4028.
15. Davidson, R. N., V. Yardley, S. L. Croft, P. Konecny, and N. Benjamin. 2000. A topical nitric oxide-generating therapy for cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94:319–322.
16. Duhe, R. J., M. D. Nielsen, A. H. Dittman, E. C. Villacres, E. J. Choi, and D. R. Storm. 1994. Oxidation of critical cysteine residues of type I adenylyl cyclase by *o*-iodosobenzoate or nitric oxide reversibly inhibits stimulation by calcium and calmodulin. *J. Biol. Chem.* 269:7290–7296.
17. Evans, T. G., L. Thai, D. L. Granger, and J. B., Jr. Hibbs. 1993. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *J. Immunol.* 151:907–915.
18. Fortenberry, J. D., M. L. Owens, M. R. Brown, D. Atkinson, and L. A. S. Brown. 1998. Exogenous nitric oxide enhance neutrophil cell death and DNA fragmentation. *Ann. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18:421–428.
19. Girard, P., and P. Potier. 1993. NO, thiols, and disulfides. *FEBS Lett.* 320:7–8.
20. Gobert, A. P., S. Semballa, S. Daulouede, S. Lesthelle, M. Tavile, B. Veyret, and P. Vincendeau. 1998. Murine macrophages use oxygen- and nitric oxide-dependent mechanisms to synthesize S-nitroso-albumin and to kill extracellular trypanosomes. *Infect. Immun.* 66:4068–4072.
21. Green, D., and G. Kroemer. 1998. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell. Biol.* 8:267–271.
22. Green, S. J., M. S. Meltzer, J. B. Hibbs, Jr., and C. A. Nacy. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J. Immunol.* 144:278–283.
23. Griscavage, J. M., S. Wilk, and L. J. Ignarro. 1996. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF- κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3308–3312.
24. Hodgkinson, V. H., L. Soong, S. M. Duhoise, and D. McMahon-Pratt. 1996. *Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms. *Exp. Parasitol.* 83:94–105.
25. Idziorek, T., J. Estaquier, F. De Bels, and J. C. Ameisen. 1995. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J. Immunol. Methods* 185:249–258.
26. James, S. L., and C. Nacy. 1993. Effector functions of activated macrophages against parasites. *Curr. Opin. Immunol.* 5:518–523.
27. Johnson, D. E. 2000. Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia* 14:1695–1703.
28. Lancaster, J. R. 1996. Diffusion of free nitric oxide. *Methods Enzymol.* 268:31–50.
29. Lemesre, J. L., D. Sereno, S. Daulouede, B. Veyret, N. Brajon, and P. Vincendeau. 1997. *Leishmania* spp.: nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically grown amastigote forms. *Exp. Parasitol.* 86:58–68.
30. Lemesre, J. L., M. P. Blanc, P. Grebaut, V. Zilberfarb, and V. Carrière. 1994. Culture continue des formes amastigotes de leishmanies en condition axénique: réalisation du cycle évolutif in vitro. *Med. Armée* 22:99–100.
31. Lepoivre, M., J. M. Flaman, P. Bohe, G. Lemaire, and Y. Henry. 1994. Quenching of the tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide: relationship to cytoskeleton induced in tumor cells by cytotoxic macrophages. *J. Biol. Chem.* 269:21891–21897.
32. Maue, J., and A. Ransijn. 1997. *Leishmania* spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. *Exp. Parasitol.* 87:98–111.
33. Maue, J., A. Ransijn, and Y. Buchmuller-Rouiller. 1991. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. *J. Leukoc. Biol.* 49:73–82.
34. Melino, G., F. Bernassola, R. A. Knight, M. T. Corsaniti, G. Nistico, and A. Finazzi-Agro. 1997. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature* 388:432–433.
35. Meriin, A. B., V. L. Gabai, J. Yaglom, V. I. Shifrin, and M. Y. Sherman. 1998. Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72: diverse effects on apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273:6373–6379.
36. Messmer, U. K., U. K. Reed, and B. Brune. 1996. Bcl-2 protects macrophages from nitric oxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271:20192–20197.
37. Mitra, B., A. Saha, A. R. Chowdhury, C. Pal, S. Mandal, S. Mukhopadhyay, S. Bandyopadhyay, and H. K. Majumder. 2000. Lutcolin, an abundant dietary component is a potent antileishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Mol. Med.* 6:527–541.
38. Mnaimneh, S., M. Gelfard, B. Veyret, and P. Vincendeau. 1997. Albumin nitrated by activated macrophages possesses antiparasitic effects neutralized by anti-NO-acetylated-cysteine antibodies. *J. Immunol.* 158:308–314.
39. Moreira, M. E., H. A. Del Portillo, R. V. Milder, J. M. Balanco, and M. A. Barcinski. 1996. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J. Cell Physiol.* 167:305–313.
40. Mossalayi, M. D., M. Arock, D. Mazier, P. Vincendeau, and I. Vouldoukis. 1999. The human immune response during cutaneous leishmaniasis NO problem. *Parasitol. Today* 15:342–345.
41. Muhl, H., K. Sandau, B. Brune, V. A. Briner, and J. Pfeilschifter. 1996. Nitric oxide donors induce apoptosis in glomerular mesangial cells, epithelial cells and endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 317:137–149.
42. Nomura, Y., T. Uehara, and M. Nakazawa. 1996. Neuronal apoptosis by glial NO: involvement of inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Hum. Cell* 9:205–214.
43. Orłowski, R. Z. 1999. The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell. Death Differ.* 6:303–313.
44. Panaro, M. A., A. Acquafredda, S. Lisi, D. D. Lofrumento, T. Trotta, R. Satalino, V. Mitolo, and O. Brandonisio. 1999. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interleukin-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 29:122–127.
45. Picot, S., J. Burnod, V. Brucchi, B. F. Chumpitazi, and P. Ambroise-Thomas. 1997. Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91:590–591.
46. Pinelli, E., D. Gebhard, A. M. Mommas, M. van Hoeij, J. A. Langermans, E. J. Ruitenberg, and V. P. Rutten. 2000. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and antileishmanial activity. *Vet. Parasitol.* 92:181–189.
47. Ramos, M. G., F. L. A. Rabelo, T. Duarte, R. T. Gazzinelli, and J. I. Alvarez-Leite. 2002. Butyrate induces apoptosis in murine macrophages via caspase-3, but independent of autochryne synthesis of tumor necrosis factor and nitric oxide. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35:161–173.
48. Ridgley, E. L., Z. H. Xiong, and L. Ruben. 1999. Reactive oxygen species activate a Ca²⁺-dependent cell death pathway in the unicellular organism *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochem. J.* 340:33–40.
49. Robertson, C. D. 1999. The *Leishmania mexicana* proteasome. *Mol. Biochem. Parasitol.* 103:49–60.
50. Roy, J. B., and R. G. Wilkerson. 1984. Fallibility of Griess (nitrite) test. *Urology* 23:270–271.
51. Salvati, L., M. Mattu, M. Colasanti, A. Scalone, G. Venturini, L. Gradoni, and P. Ascenzi. 2001. NO donors inhibit *Leishmania infantum* cysteine proteinase activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1545:357–366.
52. Scott, P. 1991. IFN- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* 147:3149–3155.
53. Sereno, D., and J. L. Lemesre. 1997. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:972–976.
54. Sereno, D., P. Holzmueller, I. Mangot, G. Cuny, A. Ouassii, J. L. Lemesre. 2001. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2064–2069.
55. Sisto, M., O. Brandonisio, M. A. Panaro, M. A., A. Acquafredda, A., D. Leogrande, A. Fasanella, T. Trotta, L. Fumarola, and V. Mitolo. 2001. Indible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect.* 24:247–254.
56. Tsai, S. H., S. Y. Lin-Shiau, and J. K. Lin. 1999. Suppression of nitric oxide synthase and the downregulation of the activation of NF κ B in macrophages by resveratrol. *Br. J. Pharmacol.* 126:673–680.
57. Vincendeau, P., S. Daulouede, B. Veyret, M. L. Darde, B. Bouteille, and J. L. Lemesre. 1992. Nitric oxide-mediated cytostatic activity on *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Exp. Parasitol.* 75:353–360.
58. Vouldoukis, I., P. A. Becherel, V. Riveros-Moreno, M. Arock, O. da Silva, P. Debre, D. Mazier, and M. D. Mossalayi. 1997. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur. J. Immunol.* 27:860–865.
59. Vouldoukis, I., J. C. Drapier, A. K. Nussler, Y. Tselentis, O. A. Da Silva, M. Gentilini, D. M. Mossalayi, L. Monjour, and B. Dugas. 1996. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:253–256.
60. Vouldoukis, I., V. Riveros-Moreno, B. Dugas, F. Ouaz, P. Becherel, P. Debre, S. Moncada, and M. D. Mossalayi. 1995. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon R1/CD23 surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7804–7808.
61. Welburn, S. C., and N. B. Murphy. 1998. Prohibitin and RACK homologues

- are upregulated in trypanosomes induced to undergo apoptosis and in naturally occurring terminally differentiated forms. *Cell. Death Differ.* 5:615–622.
- 62 Welburn, S. C., S. Lillieo, and N. B. Murphy. 1999. Programmed cell death in procyclic form *Trypanosoma brucei rhodesiense*: identification of differentially expressed genes during Con A-induced death. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94:229–234.
63. Xie, K., Y. Wang, S. Huang, L. Xu, D. Bielenberg, T. Salas, D. J. McConkey, W. Jiang, and I. J. Fidler. 1997. Nitric oxide-mediated apoptosis of K-1735 melanoma cells is associated with downregulation of Bcl-2. *Oncogene* 15:771–779.
64. Yuan, J., S. Shaham, S. Ledoux, H. M. Ellis, and H. R. Horvitz. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* 75:641–652.
- 65 Zeina, B., C. Banfield, and S. Al-Assad. 1997. Topical glyceryl trinitrate: a possible treatment for cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.* 22:244–245.

Editor: B. B. Finlay

Article 8

La réponse immune à médiation cellulaire de chiens immunisés avec des antigènes d'excrétion-sécrétion de formes promastigotes de *Leishmania infantum* induit l'apoptose des formes amastigotes intracellulaires par la voie du monoxyde d'azote

(Soumis pour publication, *Infection and Immunity*).

Le chien constitue le réservoir naturel domestique de *L. infantum*/*L. chagasi*, agent étiologique de la leishmaniose viscérale de l'Ancien et du Nouveau Monde. Comme les méthodes actuelles de traitement et de contrôle de la leishmaniose canine ont une activité limitée, le développement de candidats vaccinaux est hautement désirable. Disposant au laboratoire de procédés de culture originaux dans des milieux complètement définis donnant accès aux molécules naturellement excrétées-sécrétées par les parasites, en partenariat avec l'industrie, nous avons participé à l'étude du potentiel immunoprotecteur des antigènes d'excrétion-sécrétion (AES) dans un modèle expérimental canin. Au cours de ces essais, nous avons eu accès à du matériel biologique rare que sont les cellules de chien. Nous avons alors cherché à confirmer les résultats précédemment obtenus sur le modèle expérimental murin, en mettant en évidence la mort par apoptose des leishmanies au cours de l'activation naturelle des macrophages par des lymphocytes T sensibilisés aux antigènes parasitaires solubles, dans un modèle expérimental pertinent.

Principaux résultats :

① Les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) de chiens immunisés avec les AES de *L. infantum* prolifèrent lors d'une stimulation par les mêmes AES alors que ceux des chiens placebo ne réagissent qu'à la stimulation de mitogènes non-spécifiques.

② Les lymphocytes de chiens immunisés sont des lymphocytes T auxiliaires de type CD4+ qui prolifèrent spécifiquement en réponse à une présentation d'antigènes de *Leishmania* par les macrophages infectés *in vitro*.

③ La prolifération lymphocytaire des chiens immunisés s'accompagne de l'activation des macrophages infectés, qui se traduit par une production conséquente de monoxyde d'azote NO, corrélée à un fort effet leishmanicide.

④ Le NO produit par les macrophages infectés activés induit une fragmentation de l'ADN des formes amastigotes intracellulaires de *L. infantum* en oligonucléosomes, indicative d'une mort cellulaire par apoptose des parasites.

Les facteurs excrétés-sécrétés ont fait l'objet de nombreuses études d'immunisation dans des modèles parasitaires comme *Plasmodium falciparum*, *Dictyocaulus viviparus*, *Toxoplasma gondii*, *Ancylostoma caninum* ou *Schistosoma mansoni*. Chez *Leishmania*, nos résultats suggèrent que les AES des formes promastigotes de *L. infantum* soient capables d'induire une immunité à médiation cellulaire protectrice chez le chien. En effet, nos expériences *in vitro* ont mis en évidence une différenciation des lymphocytes T CD4+ mémoires qui vont pouvoir activer les macrophages en réponse à une infection leishmanienne. Il est intéressant de noter que le processus de mort cellulaire par apoptose des parasites intracellulaires, démontré lors de l'activation artificielle de macrophages murins, est également déclenché au cours de l'activation naturelle de macrophages canins, dans des expériences de co-cultures de macrophages infectés avec des cellules de l'immunité sensibilisées aux antigènes de leishmanies. Cependant, la mise en place par le parasite d'un mécanisme aussi complexe pourrait constituer un moyen de limiter la réponse immune mémoire de l'hôte et de laisser ce dernier naïf à une nouvelle infection. C'est pourquoi des essais cliniques d'efficacité seront nécessaires afin de valider le caractère protecteur des AES que nos expériences de biologie cellulaire ont montré *in vitro*.

Cellular immune response in dogs immunised with excreted-secreted *Leishmania infantum* promastigote antigens leads to nitric oxide-mediated apoptotic amastigote death.

P. HOLZMULLER¹, M. CAVALEYRA¹, J. MOREAUX¹, R. KOVACIC², P. VINCENTEAU³, G. PAPIEROCK² and J.-L. LEMESRE^{1*}

1 UR 008 Pathogénie des Trypanosomatidés, IRD (Institut de Recherche pour le Développement), B.P. 5045, 911 avenue Agropolis, 34032 Montpellier Cedex 1, France.

2 Bio Veto Test, Z.A. Jean Monnet Sud, 285 avenue de Rome, 83500 La-Seyne-sur-Mer, France.

3 Laboratoire de Parasitologie, Université Victor Segalen Bordeaux II, Bat 1B, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France.

Runnig title: Amastigotes NO-mediated apoptosis in *Leishmania infantum* soluble antigens vaccinated dog.

*Corresponding author: Jean-Loup LEMESRE, UR 008 Pathogénie des Trypanosomatidés, IRD (Institut de Recherche pour le Développement), 911 Av Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 1, France.

Fax: 33 (0)4 67 41 63 30

Tel: 33 (0)4 67 41 62 20

Email: lemesre@mpl.ird.fr

Abstract

Dogs represent the domestic reservoir for *Leishmania infantum*, the causative agent of zoonotic visceral leishmaniasis in both the Old and New worlds. Since the available methods for canine leishmaniasis treatment and control have limited efficacy, the development of a canine *Leishmania* vaccine is highly desirable. In this prospective, a study was undertaken on the protective potency against canine leishmaniasis of naturally excreted-secreted *Leishmania* antigens given with muramyl dipeptide as adjuvant. The cellular immune response was evaluated by the lymphocyte transformation test and by cocultures of infected macrophages with autologous lymphocytes. Other parameters were also analysed such as nitric oxide (NO) production, macrophages killing capacity and parasites cell death. Dogs immunised with excreted-secreted *Leishmania infantum* promastigote antigens exhibited a positive CD4+ lymphoproliferation index to *Leishmania* antigens leading to macrophage activation characterised by NO production correlated with leishmanicidal activity. *In situ* terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labelling and YOPRO-1 staining methods evidenced that parasite cell death was associated with DNA oligonucleosomal fragmentation, a late event in the overall process of apoptosis. These data as a whole suggested that immunisation of dogs with excreted-secreted *Leishmania* antigens induce a cellular immune response with features of Th1-type immune response. Further investigation on the protective efficacy of excreted-secreted *Leishmania* antigens against experimental and natural *Leishmania* infection will determine their vaccine against infection versus vaccine against disease status.

Introduction

Protozoa of the genus *Leishmania* are obligatory intracellular parasites of mammalian macrophages. They are transmitted by the bite of phlebotomine sandflies and are the causative agents of a broad spectrum of human diseases ranging from simple self-healing cutaneous lesions to a severe visceral dissemination. Wild canines and domestic dogs are the main reservoirs of zoonotic visceral leishmaniasis (VL), a severe disease caused by *Leishmania infantum* in the Mediterranean or India (Killick-Kendrick *et al.*, 1997) but also in Latin America and probably southern US (Momen *et al.*, 1987; Mauricio *et al.*, 2000). Canine visceral leishmaniasis is a severe disease characterised by chronic evolution of viscerocutaneous signs which occur in less than 50% of infected dogs (Lanotte *et al.*, 1979; Berrahal *et al.*, 1996). Nevertheless, both symptomatic and asymptomatic animals are infective to phlebotomine vectors (Gradoni *et al.*, 1987; Molina *et al.*, 1994). Seroprevalences of canine leishmaniasis in stable endemic areas have been shown to range from 2 to 48%, representing a serious problem of disease management. Impact of controlling the infected dog population in reducing human VL prevalence in endemic areas has been debated (Ashford, 1993; Dietze *et al.*, 1997), but such measures remains difficult to develop, expensive and finally poorly effective. In fact, associated with a selective vector control, a dog vaccine may be the most practical and effective method (Dye, 1996).

Nitric oxide production by the type II NO synthase (NOS II) is one of the main leishmanicidal mechanisms of murine macrophages (Evans *et al.*, 1993; Mauel *et al.*, 1991) and human activated macrophages can also induce antileishmanial activity via the L-arginine NO pathway (Vouldoukis *et al.*, 1995; Vouldoukis *et al.*, 1997; Panaro *et al.*, 1999; Mossalayi *et al.*, 1999). In canine visceral leishmaniasis successful chemotherapy has been associated with intramacrophagic *Leishmania* killing by the L-arginine NO pathway (Vouldoukis *et al.*, 1996) and a recent work have demonstrated the expression of NOS II in *Leishmania*-infected dog macrophages (Sisto *et al.*, 2001). Nevertheless, knowledge on the mechanisms involved in the immune response to *Leishmania* in dogs is still limited. Works have shown that dogs could be equally divided into subjects that had negative antibody response but a positive T-cell proliferative response to *Leishmania* antigen that can be considered resistant to the disease, or positive antibodies but negative T-cell corresponding to susceptible dogs, or were both antibody and T-cell positive (Cabral *et al.*, 1998). Lymphocytes from resistant dogs generally proliferated much more when stimulated with

Leishmania antigens and produced higher levels of interleukine (IL)-2 and tumour necrosis factor (TNF) than did cells from uninfected or symptomatic dogs (Pinelli *et al.*, 1994). Such cytokines can synergize to activate the microbicidal functions of infected or neighbour macrophages. Recent studies with a canine macrophage cell line or with monocyte-derived dog macrophages have demonstrated a strong correlation between anti-leishmanial activity and the production of nitric oxide by infected macrophages (Pinelli *et al.*, 2000; Panaro *et al.*, 2001).

The purpose of the present work was to determinate the link between a positive lymphoproliferative response to *Leishmania* antigen, nitric oxide production, and the killing ability of cultured macrophages in an immunisation protocol of dogs with purified excreted-secreted *Leishmania* antigens. We also paid a particular attention to the type of parasite cell death induced.

Materials and methods

Animals. Twenty healthy Beagles born in a non-endemic area were included in the immunisation protocol. They were clinically followed at the Veterinary School of Lyon during the time course of the experiment and conformed to institutional guidelines.

***Leishmania* antigens preparation and dogs immunisation.** *Leishmania infantum* culture supernatants were filtered on 0.22 μ M filter units (Nunc) and concentrated to 100 μ g protein per ml. Conservation was assured by the use of thimerosal and muramyl dipeptide was used as an adjuvant. Dogs received to injections of 100 μ g L. *infantum* excreted-secreted antigens in a 3-week interval.

Reagents. Foetal calf serum was obtained from BioMedia (Lot. AMS 3390). RPMI 1640 medium (Lot. 0MB0174) was purchased from Bio Whittaker Europe and L-Glutamine (Lot. 3414) from Bio Media. Penicillin/Streptomycin (10000 IU/ml-10000 UG/ml, Lot. 3037222) and Phosphate Buffer Saline free of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ were obtained from Life Technologies. YOPRO-1 iodide was provided by Molecular Probes. Nitro-L-arginine and L- N^{G} -monomethyl-arginine (L-NMMA) were purchased from Alexis Biochemicals. All other cellular and molecular biology grade chemicals were obtained from Sigma.

Parasites and *in vitro* cultures. A cloned line of *Leishmania infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) was used throughout this study. Promastigotes were cultured at $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ by weekly subpassages in RPMI 1640 medium (Gibco BRL) buffered with 25mM Hepes and 2 mM NaHCO_3 , pH 7.2, supplemented with 2 mM glutamine and 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS).

Macrophage and lymphocyte cultures. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were obtained from heparinized peripheral blood layered over Ficoll Hypaque and centrifuged at 700g for 20 minutes at room temperature, washed three times in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free Phosphate Buffer Saline (PBS) by centrifugation at 400g for 10 minutes at 4°C and resuspended in RPMI 1640 medium (BioWhittaker), supplemented with 2 mM glutamine, 10% FCS, 100 μ g/ml streptomycin and 100 IU/ml penicillin. 10^6 cells were distributed in LabTek[®] tissue

culture slides (Nalge Nunc International) and 4 ml of cell suspension (5×10^6 PBMC/ml) were distributed in 25 cm² ventilated tissue culture flasks and gently washed after 30 minutes incubation at 37°C in 5% CO₂ to eliminate non-adherent cells. Macrophages were obtained from monocytes cultured for 5 days. Macrophage viability determined by trypan blue dye exclusion was greater than 96% and non-specific esterase staining showed that more than 95% of the cells were macrophages. Non-adherent cells (i.e. lymphocytes) were washed with RPMI and cultured in 25 cm² ventilated tissue culture flasks at 37°C in 5% CO₂ until use. Lymphocytes viability was also determined by trypan blue dye exclusion and was greater than 98%.

Lymphocytes proliferation test (LPT). According to Shifrine *et al.* for canine and to Frankenburg and Klaus for human leishmaniasis, the LPT was performed using the whole blood microassay technique. Briefly, 2×10^5 PBMC diluted in 200 µl RPMI were seeded in triplicate in 96 well flat-bottom culture plates, to which mitogen (ConA, 20 µg/ml) or *Leishmania* antigens (LiESP, 10 µg/ml) were added. Plates were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 2 days. The cell proliferation was checked using 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), that was previously shown to measure more rapidly and more sensitively human cell proliferation than the incorporation of ³H-thymidine (10, 16, 19 dans Lasri *et al.*). BrdU was added for 18 hours on day 2 after PBMC stimulation, and cell proliferation was determined using a non-radioactive ELISA technique, according to the manufacturer's instructions (BrdU, cell proliferation detection Kit III, Boehringer-Mannheim, Germany). Absorbance was read at 405 nm in an ELISA plate reader (Labsystems Multiscan EX). Cell proliferation index was expressed as the difference between optical density in stimulated versus unstimulated cultures. The negative cut-off was equal to 1.5. A cell proliferation index ≥ 2 was considered positive.

Macrophage infection and activation. After 5 days of differentiation into macrophages, non-adherent cells were removed by gently washing twice with pre-warmed RPMI medium and then macrophages were infected with *L. infantum* stationary-phase promastigotes at a parasite:macrophage ratio of 5:1 for 2 hours and a half at 37°C with 5% CO₂. Non-internalised parasites were removed by gently washing. Infected macrophages were then cultured in the presence or absence of the following reagents: autologous lymphocytes at a lymphocyte:macrophage ratio of 2:1 or with supernatant of PBMC stimulated for 2 days with

concanavalin A (Sup ConA). Controls were made by adding 1 mM nitro-L-arginine or L-NMMA, competitive inhibitors of NOS-II, or 1 mM nitro-L-arginine or L-NMMA plus 2 mM L-arginine to revert inhibition.

Culture supernatants were collected for nitrite production measurement 72 hours later. Macrophages were then washed with pre-warmed RPMI, fixed with methanol and stained with Giemsa for parasite counts or processed for the immunofluorescence assay, the TUNEL technique or YOPRO-1 staining (see below). The leishmanicidal effect corresponding to the percentage of parasitic index (PI) inhibition as compared to the untreated controls was calculated, $PI = 100 - [(\text{mean number of amastigotes per macrophage} \times \text{percentage of infected macrophages in treated wells}) / (\text{mean number of amastigotes per macrophage} \times \text{percentage of infected macrophages in untreated wells})] \times 100$. Results were the mean of duplicate experiments.

Immunofluorescence assay. Infected macrophages were fixed for 20 min with 1% paraformaldehyde and then gently washed with PBS. Negative control: rat serum (1/100), rat anti-LPG (1/100), rat anti-dog MHC/class II (1/100), rat anti-dog CD8 (1/50) and rat anti-dog CD4 (1/100), were incubated in PBS containing 1% BSA for 30 min at 4°C. Cells were washed three times in PBS-BSA. FITC-conjugated goat anti-rat serum (1/500) was used for revelation and incubated for 10 min at 4 °C. After two washings in PBS, slides were mounted with coverstrips in 50% glycerol.

Nitric oxide production. NO_2^- accumulation in the medium over 72 hours for the leishmanicidal assay, was used as an indicator of NO production and was assayed by the Griess reaction using the Nitrate/nitrite colorimetric assay of Alexis biochemicals. The Griess reagent was modified according to Pinelli *et al.*: 1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene-diamine-dichloride and 2.5% H_3PO_4 (Pinelli *et al.*, 2000).

***In situ* Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL technique).** Slides with infected macrophages were fixed for 20 min with PBS containing 4% paraformaldehyde, washed twice with PBS 0.01M pH 7.2 and stored at -20°C until use. DNA fragmentation was analysed *in situ* using a colorimetric apoptosis detection system (Promega, Madison, USA), according to the manufacturer instructions. After the

TUNEL protocol, preparations were analysed using a microscope at 1000× magnification. Apoptotic nuclei appeared dark brown. Other nuclei were not coloured.

YOPRO-1 staining. Apoptotic amastigotes within macrophages were visualised using the cell permeant DNA intercalatant YOPRO-1 (YP) as previously described (Idzioreck *et al.*, 1995). Briefly, infected macrophages were gently washed with pre-warmed Ca²⁺/Mg²⁺ free PBS and then incubated with 10 µM YP for 10 min. Cells were immediately analysed under a fluorescence microscope at 400× magnification. Green cell fluorescence indicated amastigotes undergoing apoptosis inside macrophages.

Statistical analysis. Statistical significance (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001) was analysed by Student's *t*-test. All experiments were performed at least twice.

Results

***In vitro* PBMC proliferative response to mitogen and *Leishmania* soluble antigens (LiESP).** Antigen-specific proliferation was examined before immunisation (data not shown), after the first injection (data not shown) and 2 months after the second injection. Dogs from all groups (*i.e.* control, placebo and immunised) exhibit a positive cell proliferation to concanavalin A (ConA), a T-cell polyclonal activator (Figure 1). Even if PBMC of placebo dogs responded lower (about 2 of cell proliferation index) than those of control and immunised ones (cell proliferation indexes of 4 and 3.5, respectively), the positive mitogen stimulation demonstrated the ability of these cells to proliferate upon stimulation. Two months after the last injection of the immunisation protocol, PBMC of neither control dogs nor placebo ones showed any lymphocyte proliferation to LiESP (Figure 1). Their cell proliferation indexes did not exceed 1. By contrast, lymphocytes from dogs immunised with LiESP proliferated strongly to *Leishmania* soluble antigens (LiESP), reaching a cell proliferation index of about 3.5 (Figure 1).

Canine macrophages infection and lymphocytes proliferation. Figure 2 A, B, C and D first demonstrated that canine macrophages of both placebo and immunised dogs were readily susceptible to *Leishmania infantum* infection. Presence of intracellular amastigotes after *in vitro* macrophage infection by metacyclic promastigotes was clearly shown after microscopic examination (Figure 2 A, B, C and D). We also strengthened the results obtained with the lymphocyte proliferation test. Infected macrophages were able to play their role of antigen presenting cell (APC) and to induce the polyclonal activation of lymphocytes of immunised dogs (Figure 2 C and D) whereas lymphocytes of placebo dogs did not exhibit any proliferation (Figure 2 B). The immunofluorescence assay confirmed the APC role of infected canine macrophages. Anti-lipophosphoglycan (LPG) antibodies stained the cell surface of infected macrophages (Figure 2 F) as well as anti-class II major histocompatibility complex (MHC/class II) antibodies (Figure 2 G). The lymphocyte population subset was also identified as CD4⁺ T-cell with anti-CD4 antibodies that stained proliferative lymphocytes cell surface (Figure 2 I) but also with anti-MHC/class II antibodies (Figure 2 G), because the expression of MHC/class II molecules is constitutive on canine lymphocytes (Cobbold and Metcalfe, 1994). Anti-CD8 antibodies exhibited no staining like negative control (Figure 2 E and H).

NO production and anti-leishmanial activity of canine macrophages. Our results first showed that activated canine macrophages produced NO *in vitro*, but in lower amounts than in classical murine experiments (Figure 3). Infected canine macrophages cocultured with autologous lymphocytes (Figure 3A) or incubated with supernatant of PBMC stimulated by ConA (Sup ConA) (Figure 3B) for 72 hours produced significant amounts of NO ($p < 0.001$), compared to cells cultured in RPMI medium alone (Figure 3A). It is noteworthy that only macrophages of immunised dogs did respond to activation stimuli. Macrophages of healthy control dogs or placebo ones did not exhibit any difference between RPMI medium (Figure 3A), lymphocytes (Figure 3A) or Sup ConA (Figure 3B). Infected cells produced a NO background of about 7 nmol/ 10^5 cells/72 h. By contrast, NO production by immunised dogs' cells cocultured with lymphocytes or incubated with Sup ConA reached 20 nmol/ 10^5 cells/72 h and quite 30 nmol/ 10^5 cells/72 h, respectively (Figure 3 A and B). Incubation of activated macrophages with NO synthase inhibitors nitro-L-arginine and L-NMMA resulted in a significant reduction of the NO production which was restored by addition of L-arginine (Figure 3 A and B).

The accumulation of $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ in culture fluids was concomitant with the intracellular killing of *Leishmania infantum* amastigotes (Figures 3 and 4). The antileishmanial activity was still only observed in macrophages of immunised dogs (Figure 4). Macrophages of healthy control dogs or placebo ones exerted leishmanicidal effect neither when cocultured with lymphocytes (Figure 4A) nor when incubated with Sup ConA (Figure 4B) (<10% and <15%, respectively). By contrast, infected macrophages of immunised dogs showed a leishmanicidal effect of about 80% when cocultured with lymphocytes (Figure 4A) and of about 60% when incubated with Sup ConA (Figure 4 B). Antileishmanial activity decreased in both conditions in the presence of 1 mM nitro-L-arginine or L-NMMA (28% and 16%, respectively), and was almost totally restored by the addition of 2 mM L-arginine (60% and 44%, respectively) (Figure 4 A and B).

NO-mediated cell death of *L. infantum* amastigotes. NO-mediated DNA fragmentation exhibiting features of apoptosis was first assessed on *Leishmania amazonensis* amastigotes (Holzmüller *et al.*, 2002). We monitored here the genomic DNA status of intracellular *L. infantum* amastigotes with two different *in situ* techniques for detection of apoptotic cells. As shown in figure 5, the *in situ* TUNEL technique revealed that nuclear DNA fragmentation of intracellular amastigotes occurred in *Leishmania*-infected activated canine macrophages. Our previous works demonstrated that this oligonucleosomal DNA fragmentation was

characteristic of parasites undergoing apoptosis. Moreover, a strong correlation between $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ levels, leishmanicidal effect and nuclear DNA fragmentation was observed (Figures 3, 4 and 5). Labelled amastigotes nuclei could only be visualised inside canine activated macrophages producing NO (Figure 5 E and F). Nuclei of intracellular amastigotes, which we can observed after Giemsa staining (Figure 2), were free of label in non-activated macrophages of control (data not shown), placebo and immunised dogs (Figure 5 A and D) and in macrophages of control (data not shown) and placebo dogs that did not produce NO (Figure 5 B and C). In the absence of Terminal deoxynucleotidyl Transferase, corresponding negative controls did not exhibit any staining, thus demonstrating the specificity of the reaction (Figure 5 G and H).

To confirm the apoptotic cell death induced by NO in activated canine macrophages, we used the impermeable DNA intercalant YOPRO-1 (Figure 6) which has been previously used for monitoring the apoptosis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes (Ameisen *et al*, 1995; Idziorek *et al*, 1995) and *Leishmania amastigotes* (Serenio *et al*, 2001; Holzmuller *et al*, 2002). Fluorescent labelled intracellular amastigotes could only be seen inside immunised dogs macrophages cocultured with lymphocytes and producing NO (Figure 5D). Untreated placebo or immunised dogs macrophages or placebo dogs macrophages cocultured with lymphocytes but not producing NO did not show any staining of intracellular parasites (Figure 5 A, B and C).

Discussion

In this study, we demonstrated that dogs immunised with *Leishmania infantum* promastigotes excreted-secreted antigens (LiESP) exhibited a efficient cellular immune response. Infected macrophages were able to induce a clear proliferative response of the autologous TCD4⁺ lymphocytes suggesting the development of a cell-mediated immunity. Resulting activated macrophages produced significant amounts of nitric oxide to kill intracellular *Leishmania* amastigotes by a process exhibiting features of apoptosis.

Canine visceral leishmaniasis (CVL) could be characterised by a marked humoral response and a lack of cell mediated immunity. Loss of in vitro cellular response to mitogens or *Leishmania* antigens (Abranches *et al*, 1991) is associated with immunodepression in infected dogs which determine their clinical status. However, these mitogenic stimulations require a cell-cell cooperation and more than one cell type, particularly the presence of macrophages and their cytokines. Nevertheless, experiments on *Leishmania*-exposed naïve dogs have suggested that suppression of lymphoproliferative response may occur very early as a consequence of an established *Leishmania* infection (De Luna *et al*, 1999). Immunity to canine leishmaniasis was demonstrated to be mediated by T-cells (Pinelli *et al*, 1994; Rhalem *et al*, 1999). A Th1 T-cell response, which produces IFN- γ , TNF and IL-2, is important in protection, whereas a Th2 T-cell response, which produces IL-4 and IL-10, leads to the disease (Locksley *et al*, 1987; Scott *et al*, 1988). From the above reports, it is evident that the main requirement for a *Leishmania* vaccine is the induction of a stable and long-lasting Th1-type cell response. Even if experiments of immunisation in dogs remain few available, results are hopeful (reviewed in Gradoni, 2001). Dogs that received autoclaved *L. major* as vaccine with bacillus Calmette-Guérin (BCG) as adjuvant exhibited specific and prolonged lymphocyte proliferation (Lasri *et al*, 1999). Our study demonstrated that purified LiESP were able to induce a cellular immunity in dogs. Dogs immunised with such antigens plus muramyl dipeptide as adjuvant showed a strong and *Leishmania*-antigen specific lymphoproliferation. The immune system of these dogs was thus stimulated to face the *Leishmania*-induced immunodepression. Partial or full restoration of antigen-stimulated lymphocyte blastogenesis was reported in dogs clinically cured following treatment with antimonials or amphotericin B (Bourdoiseau *et al*, 1997; Rhalem *et al*, 1999; Moreno *et al*, 1999). Analysis of PBMC subsets has revealed that such immune-cell restoration was associated with a significant increase in the percentage of CD4⁺ T-cells, whereas a dramatic decrease of CD4⁺ T-cells was

observed in progressive human and CVL (Cenini *et al*, 1993; Bourdoiseau *et al*, 1997; Moreno *et al*, 1999). We demonstrated here that dogs immunised with LiESP exhibit a cellular response with specific CD4⁺ T-cells proliferation to *Leishmania* antigens. They have thus developed the immune background necessary for leishmaniasis resistance.

The NO-mediated killing of *Leishmania* species has been well documented in the murine model (Green *et al*, 1990; Liew *et al*, 1991; Mauel *et al*, 1991). Moreover, it has been demonstrated that type 2 nitric oxide synthase (NOS 2) gene deficient mice were uniformly susceptible to *L. major* infection (Wei *et al*, 1995) and that inhibition of this enzyme was implicated in the reactivation of latent cutaneous leishmaniasis (Stenger *et al*, 1996). In human leishmaniasis, Vouldoukis *et al*. (Vouldoukis *et al*, 1995) showed that binding of the macrophage receptor CD23 or stimulation with IFN- γ induced NO-mediated *L. major* cell death. Interestingly, the results of a recent work on dogs indicated that *Leishmania*-infected dog macrophages can express NOS2, after stimulation with IFN- γ and LPS (Sisto *et al*, 2001). Moreover, in canine leishmaniasis, a successful chemotherapy induced macrophage anti-leishmanial activity via the L-arginine NO pathway (Vouldoukis *et al*, 1996). Different studies have to date established that also for canine macrophages the production of NO correlates with the induction of anti-leishmanial activity (Panaro *et al*, 1998a and 1998b; Pinelli *et al*, 1995, 2000). We showed here in a canine immunisation experiment with LiESP, the implication of NO in the killing of *Leishmania* parasites. Interestingly, levels of NO were higher in the experiments with supernatant of PBMC stimulated with ConA than in those of lymphocytes cocultures. This might be explained by the increase in IFN- γ in ConA-activated PBMC supernatants and NO release by macrophages observed by Panaro *et al*. (Panaro *et al*, 2001), which strengthen the role for this cytokine in the induction of NOS2 also in dogs. In fact, supernatants of ConA-stimulated PBMC contained end-products of NO that added to NO production in following experiments. Nevertheless, our results on anti-leishmanial activity suggest that a cell-cell cooperation between T-cells and macrophages is necessary to induce the optimal leishmanicidal effect.

The role of NO in mediating apoptosis in various mammalian cells models has been clearly defined (reviewed in Kim *et al*, 2001). A previous work allowed us to demonstrate a NO-induced apoptosis-like process in the protozoan parasite *Leishmania amazonensis in vitro* or in murine macrophages (Holzmuller *et al*, 2002). We showed here for the first time that the leishmanicidal effect observed in canine activated macrophages was the consequence of intracellular amastigotes undergoing a cell death exhibiting a classical feature of apoptosis,

which is oligonucleosomal DNA fragmentation. NO-mediated apoptosis of intracellular *Leishmania* amastigotes seems thus to occur not only in a murine laboratory model but also in the natural reservoir of leishmaniosis when stimulated for cellular immune response against LiESP.

Taken together, the data we presented in this report, strongly support the hypothesis of the induction of a Th1 type immune response in dogs after immunisation with LiESP, with regard to the specific T-cell lymphoproliferation, NO release by macrophages correlated with intracellular apoptotic cell death of *Leishmania* parasites. Further investigations on the cytokines elicited by such immunisation and evaluation of its protective action against experimental or natural *Leishmania* infection are required to determine the potency of LiESP as anti-*Leishmania* vaccine candidate.

References

- Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur LF, Jaffe CL.** 1991. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **13**: 537-50.
- Ameisen JC, Idzioreck T, Billaut-Mulot O, Loyens M, Tissier JP, Potentier A, Ouaisi A.** 1995. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and the control of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell. Death. Differ.* **2**: 285-300.
- Ashford DA, Badaro R, Eulalio C, Freire M, Miranda C, Zalis MG, David JR.** 1993. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test--enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* **48**: 1-8.
- Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S.** 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg.* **55**: 273-7.
- Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, Chabanne L.** 1997. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* **59**: 21-30.
- Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H, Alexander J.** 1998. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol.* **76**: 173-80.
- Cenini P, Berhe N, Hailu A, McGinnes K, Frommel D.** 1993. Mononuclear cell subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. *J Infect Dis.* **168**: 986-93.

De Luna R, Vuotto ML, Ielpo MT, Ambrosio R, Piantedosi D, Moscatiello V, Ciaramella P, Scalone A, Gradoni L, Mancino D. 1999. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol.* **70**: 95-103.

Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, Corey R. 1997. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis.* **25**: 1240-2.

Dye C. 1996. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg.* **55**: 125-30.

Evans TG, Thai L, Granger DL, Hibbs JB Jr. 1993. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *J Immunol.* **151**: 907-15.

Frankenburg S, Klaus S. 1989. Evaluation of a total lymphocyte proliferation assay as a diagnostic tool for cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **83**: 499-502.

Gradoni L, Gramiccia M, Mancianti F, Pieri S. 1988. Studies on canine leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **82**: 568-71.

Gradoni L. 2001. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol.* **100**: 87-103.

Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB Jr, Nacy CA. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol.* **144**: 278-83.

Holzmuller P, Sereno D, Cavaleyra M, Mangot I, Daulouede S, Vincendeau P, Lemesre JL. 2002. Nitric Oxide-Mediated Proteasome-Dependent Oligonucleosomal DNA Fragmentation in *Leishmania amazonensis* Amastigotes. *Infection and Immunity.* **70**: 3727-35.

Idziorek T, Estaquier J, De Bels F, Ameisen JC. 1995. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J. Immunol. Methods*. **185**: 249-258.

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC. 1997. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol*. **11**: 105-11.

Kim PK, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR. 2001. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol*. **1**: 1421-41.

Lanotte G, Rioux JA, Perieres J, Vollhardt Y. 1979. [Ecology of leishmaniasis in the south of France. 10. Developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniasis in relation to epidemiology. (author's transl)]. *Ann Parasitol Hum Comp*. **54**: 277-95.

Lasri S, Sahibi H, Sadak A, Jaffe CL, Rhalem A. 1999. Immune responses in vaccinated dogs with autoclaved *Leishmania* major promastigotes. *Vet Res*. **30**: 441-9.

Liew FY, Cox FE. 1991. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunology Today*. **12**: A17-21.

Locksley RM, Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Gardner KD Jr. 1987. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann Inst Pasteur Immunol*. **138**: 744-9.

Mauel J, Ransijn A, Buchmuller-Rouiller Y. 1991. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. *J Leukoc Biol*. **49**: 73-82.

Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*. **16**: 188-9.

Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andres M, Gonzalez F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J. 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **88**: 491-3.

Momen H, Grimaldi Junior G, Deane LM. 1987. *Leishmania infantum*, the aetiological agent of American visceral leishmaniasis (AVL)? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **82**: 447-8.

Moreno J, Nieto J, Chamizo C, Gonzalez F, Blanco F, Barker DC, Alva J. 1999. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet Immunol Immunopathol.* **71**: 181-95.

Mossalayi MD, Arock M, Mazier D, Vincendeau P, Vouldoukis I. 1999. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. *Parasitol. Today.* **15**: 342-5.

Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S, Lofrumento DD, Mitolo V, Sisto M, Fasanella A, Trotta T, Bertani F, Consenti B, Brandonisio O. 2001. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **24**: 187-95.

Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S, Lofrumento DD, Trotta T, Satalino R, Saccia M, Mitolo V, Brandonisio O. 1999. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Int. J. Clin. Lab. Res.* **29**:122-7.

Panaro MA, Fasanella A, Lisi S, Mitolo V, Andriola A, Brandonisio O. 1998. Evaluation of nitric oxide production by *Leishmania infantum*-infected dog macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* **20**: 147-58.

Panaro MA, Lisi S, Mitolo V, Acquafredda A, Fasanella A, Carelli MG, Brandonisio O. 1998. Evaluation of killing, superoxide anion and nitric oxide production by *Leishmania infantum*-infected dog monocytes. *Cytobios.* **95**: 151-60.

Pinelli E, Gebhard D, Mommaas AM, van Hoeij M, Langermans JA, Ruitenberg EJ, Rutten VP. 2000. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Vet. Parasitol.* **92**: 181-9.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenberg J. 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* **62**: 229-35.

Rhalem A, Sahibi H, Lasri S, Jaffe CL. 1999. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet Immunol Immunopathol.* **71**: 69-76.

Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. 1988. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med.* **168**: 1675-84.

Shifrine M, Taylor NJ, Rosenblatt LS, Wilson FD. 1978. Comparison of whole blood and purified canine lymphocytes in a lymphocyte-stimulation microassay. *Am J Vet Res.* **39**: 687-90.

Sisto M, Brandonisio O, Panaro MA, Acquafredda A, Leogrande D, Fasanella A, Trotta T, Fumarola L, Mitolo V. 2001. Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases.* **24**, 247-254.

Stenger S, Donhauser N, Thuring H, Rollinghoff M, Bogdan C. 1996. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* **183**:1501-14.

Vouldoukis I, Becherel PA, Riveros-Moreno V, Arock M, da Silva O, Debre P, Mazier D, Mossalayi MD. 1996. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur. J. Immunol.* **27**: 860-5.

Vouldoukis I, Becherel PA, Riveros-Moreno V, Arock M, da Silva O, Debre P, Mazier D, Mossalayi MD. 1997. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur J Immunol.* **27**: 860-5.

Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, Ouaz F, Becherel P, Debre P, Moncada S, Mossalayi MD. 1995. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **92**: 7804-7808.

Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY. 1995. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature.* **375**: 408-11.

Legends to the figures

Figure 1. Proliferative response of PBMC from healthy control, placebo and immunised dogs stimulated *in vitro* with concanavalin A (ConA) and excreted-secreted *Leishmania infantum* promastigote antigens (LiESP). Results are the mean $\pm$ standard deviation of triplicate experiments.

Figure 2. Microscopic examination of the cellular response of *Leishmania infantum* infected macrophages cocultured with lymphocytes from healthy placebo and immunised dogs, after fixation with methanol and Giemsa staining (A to D) or immunofluorescence assay (E to I). Canine macrophage containing *L. infantum* amastigotes at 1250 $\times$ magnification (A). Coculture of *L. infantum* infected macrophages with lymphocytes of placebo dogs at 1000 $\times$ magnification (B). Coculture of *L. infantum* infected macrophages with lymphocytes of immunised dogs at 1000 $\times$ (C) and 1600 $\times$ (D) magnification. Immunofluorescence assay on cocultured *L. infantum* infected macrophages with lymphocytes of immunised dogs at 1000 $\times$ magnification. Negative control: rat serum (E), rat anti-LPG (F), rat anti-dog MHC/class II (G), rat anti-dog CD8 (H) and rat anti-dog CD4 (I). FITC-conjugated goat anti-rat sera were used for revelation. Figure is representative of two similar experiments.

Figure 3. Nitric oxide production by monocyte-derived dog macrophages after infection and 72 hours coculture with autologous lymphocytes (A) or incubation with supernatant of PBMC stimulated by concanavalin A (Sup ConA) (B). Medium = uninfected unstimulated cells; Nitro-L-arginine or L-NMMA = competitive inhibitors of type 2 nitric oxide synthase (NOS 2); Nitro-L-arginine or L-NMMA + L-arginine = reversion of NOS 2 inhibitors' effect. Results are the mean $\pm$ standard deviation of triplicate experiments.

Figure 4. *Leishmania* killing by monocyte-derived dog macrophages after infection and 72 hours coculture with autologous lymphocytes (A) or incubation with supernatant of PBMC stimulated by concanavalin A (Sup ConA) (B). Nitro-L-arginine or L-NMMA = competitive inhibitors of type 2 nitric oxide synthase (NOS 2); Nitro-L-arginine or L-NMMA + L-arginine = reversion of NOS 2 inhibitors' effect. Results are the mean $\pm$ standard deviation of triplicate experiments.

Figure 5. *In situ* analysis of the apoptosis-like process of *L. infantum* amastigotes in dog macrophages. Infected cells were cocultured with autologous lymphocytes or incubated with supernatant of PBMC stimulated by concanavalin A (Sup ConA) for 72 hours. Negative controls were incubated without TdT: activated macrophages (G) or non-activated macrophages (H) of placebo or immunised dogs. Untreated macrophages (A), cocultured with autologous lymphocytes (B) or incubated with Sup ConA (C) of placebo dogs. Untreated macrophages (D), cocultured with autologous lymphocytes (E) or incubated with Sup ConA (F) of immunised dogs. DNA fragmentation analysis was determined using the TUNEL technique and analysed under a microscope at 1000× magnification (A to H). Magnification of 1600× was used to identify labelled amastigotes (I). Figure is representative of two similar experiments.

Figure 6. Analysis of the NO-induced apoptosis-like process of *L. infantum* amastigotes in dog macrophages using an *in situ* YOPRO-1 differential staining technique. Infected cells were cocultured with autologous lymphocytes for 72 hours. Untreated macrophages (A) or cocultured with autologous lymphocytes (B) of placebo dogs. Untreated macrophages (C) or cocultured with autologous lymphocytes (D) of immunised dogs. Cells were analysed under a microscope at 800× magnification (A to D). Magnification of 1250× was used to identify labelled amastigotes (E). Figure is representative of two similar experiments.

Figure 1

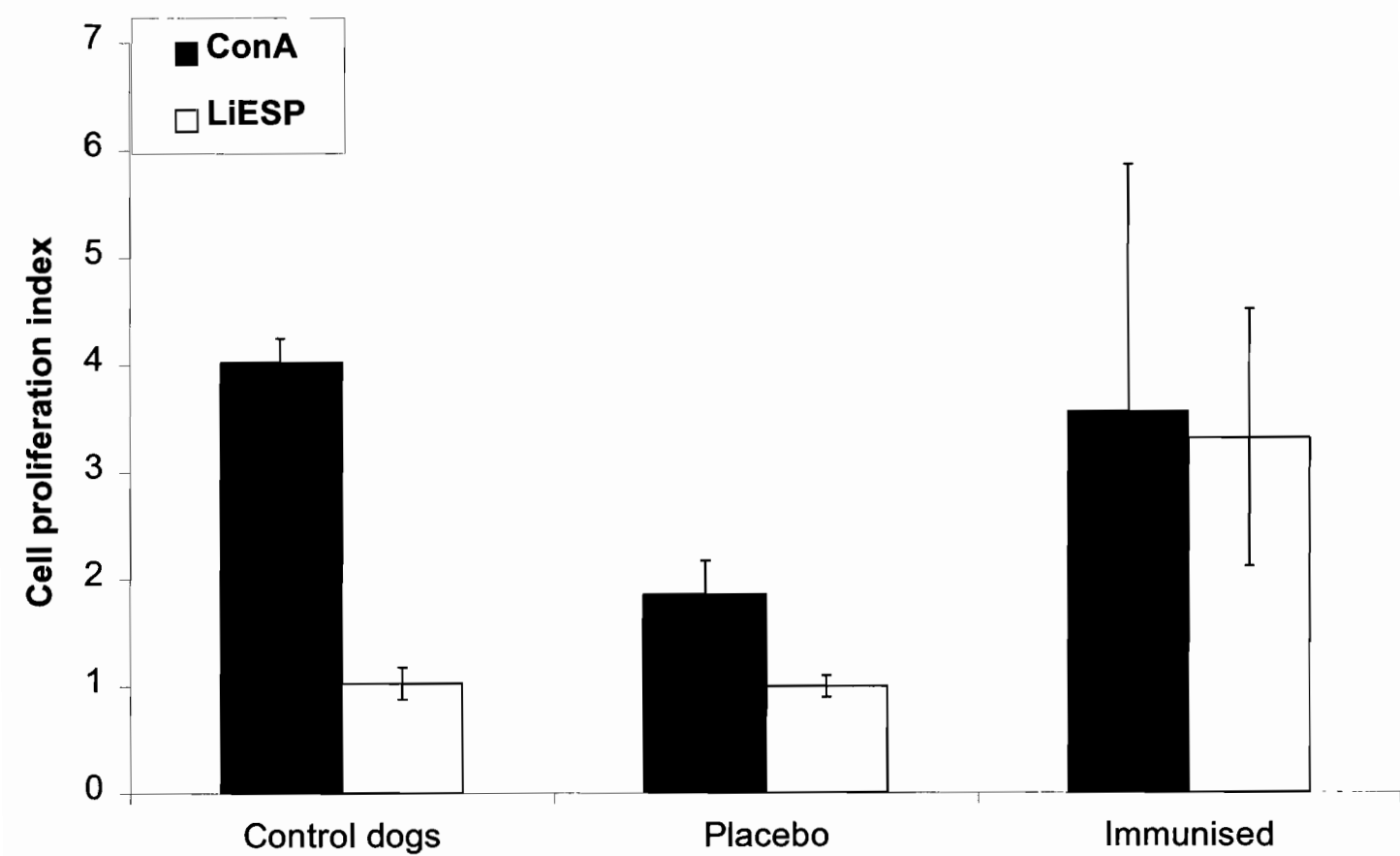


Figure 2

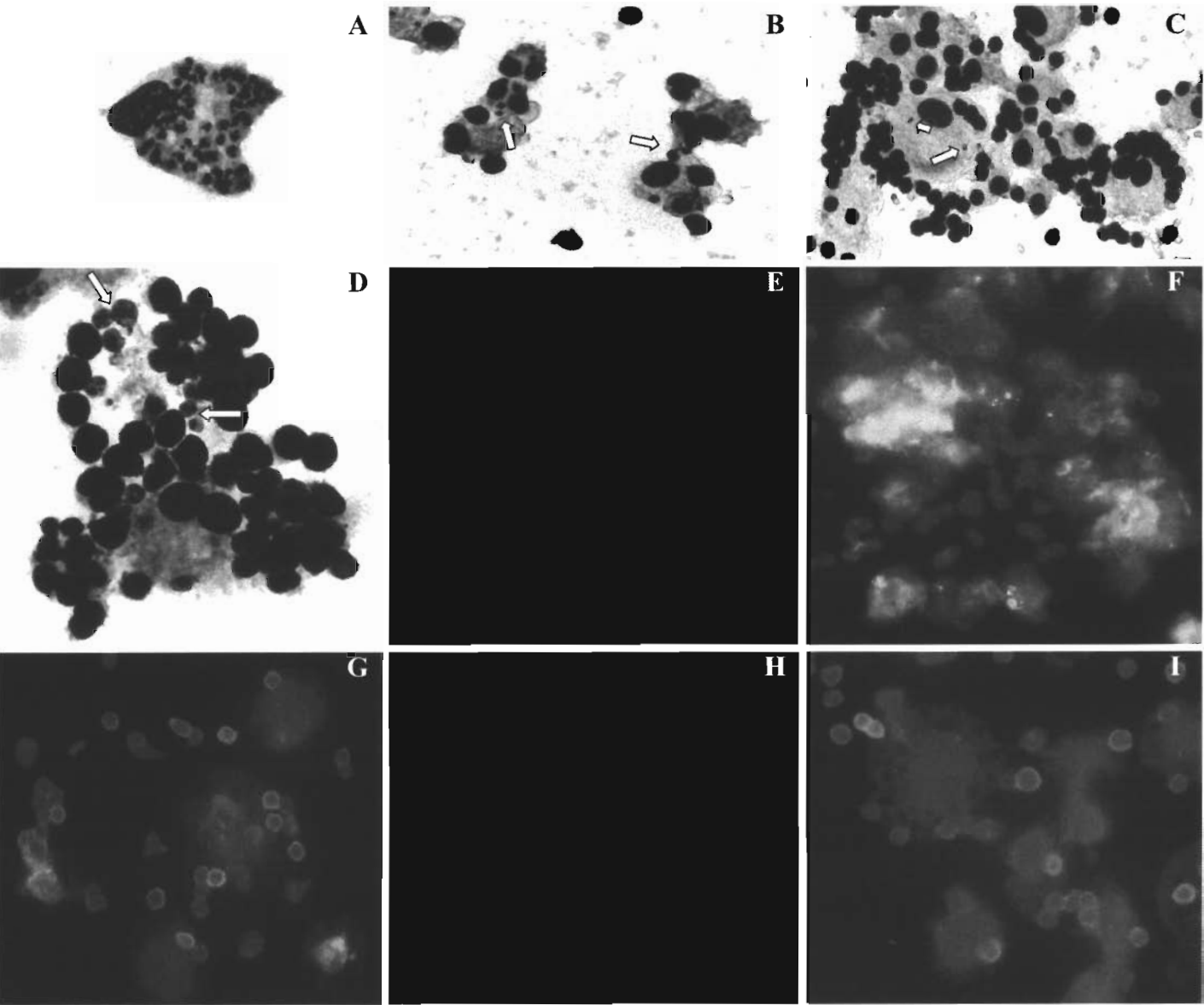


Figure 3

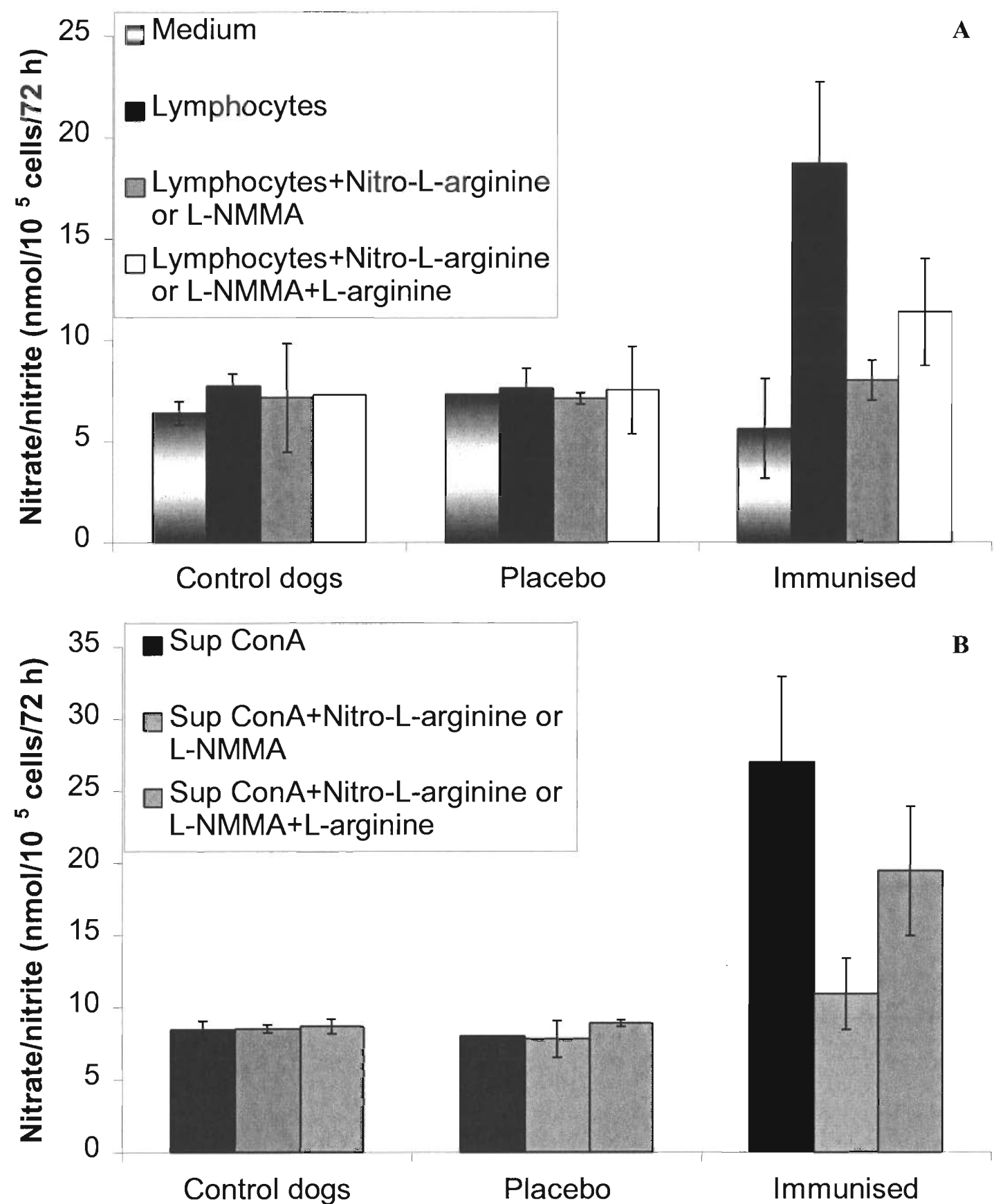


Figure 4

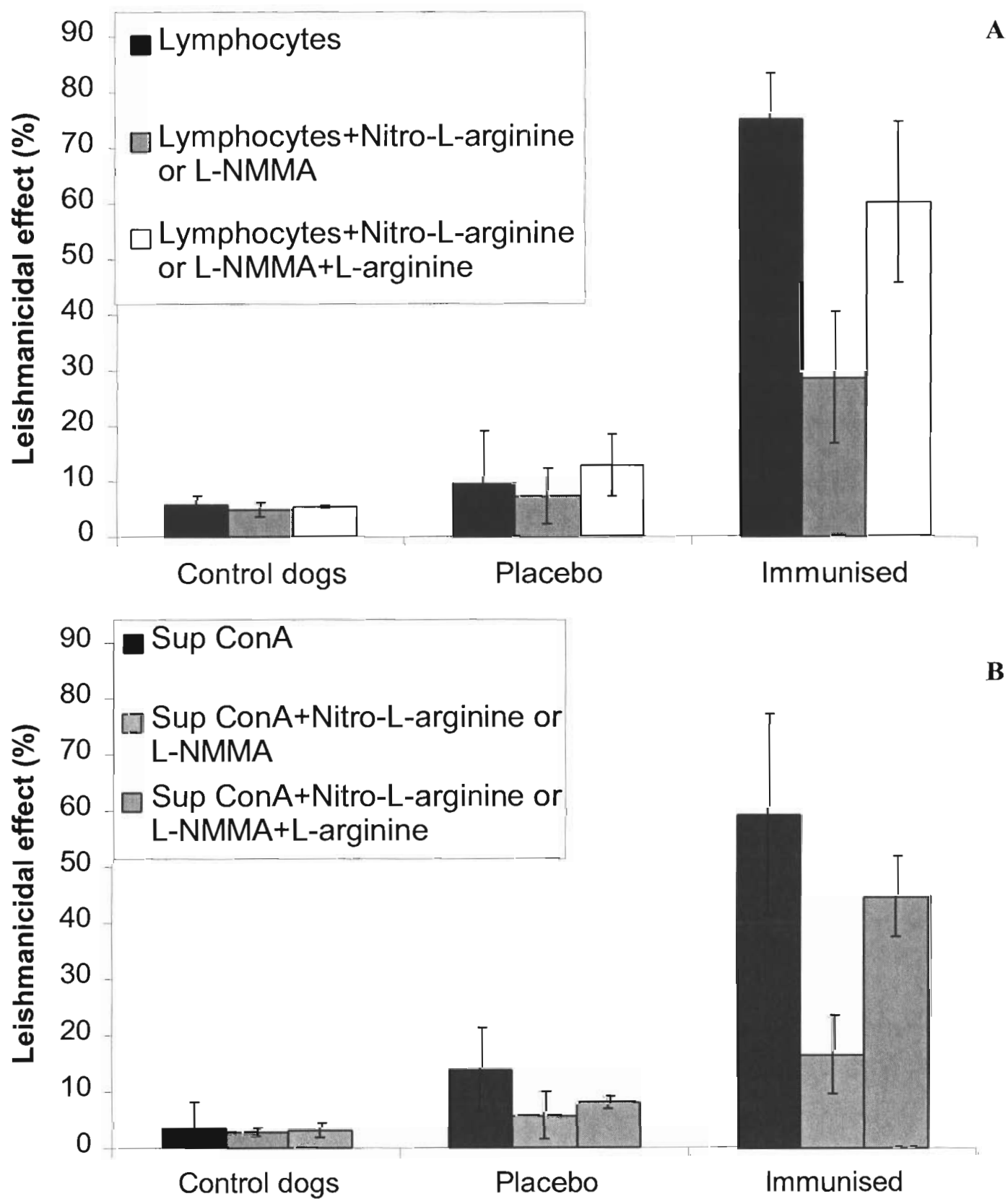


Figure 5

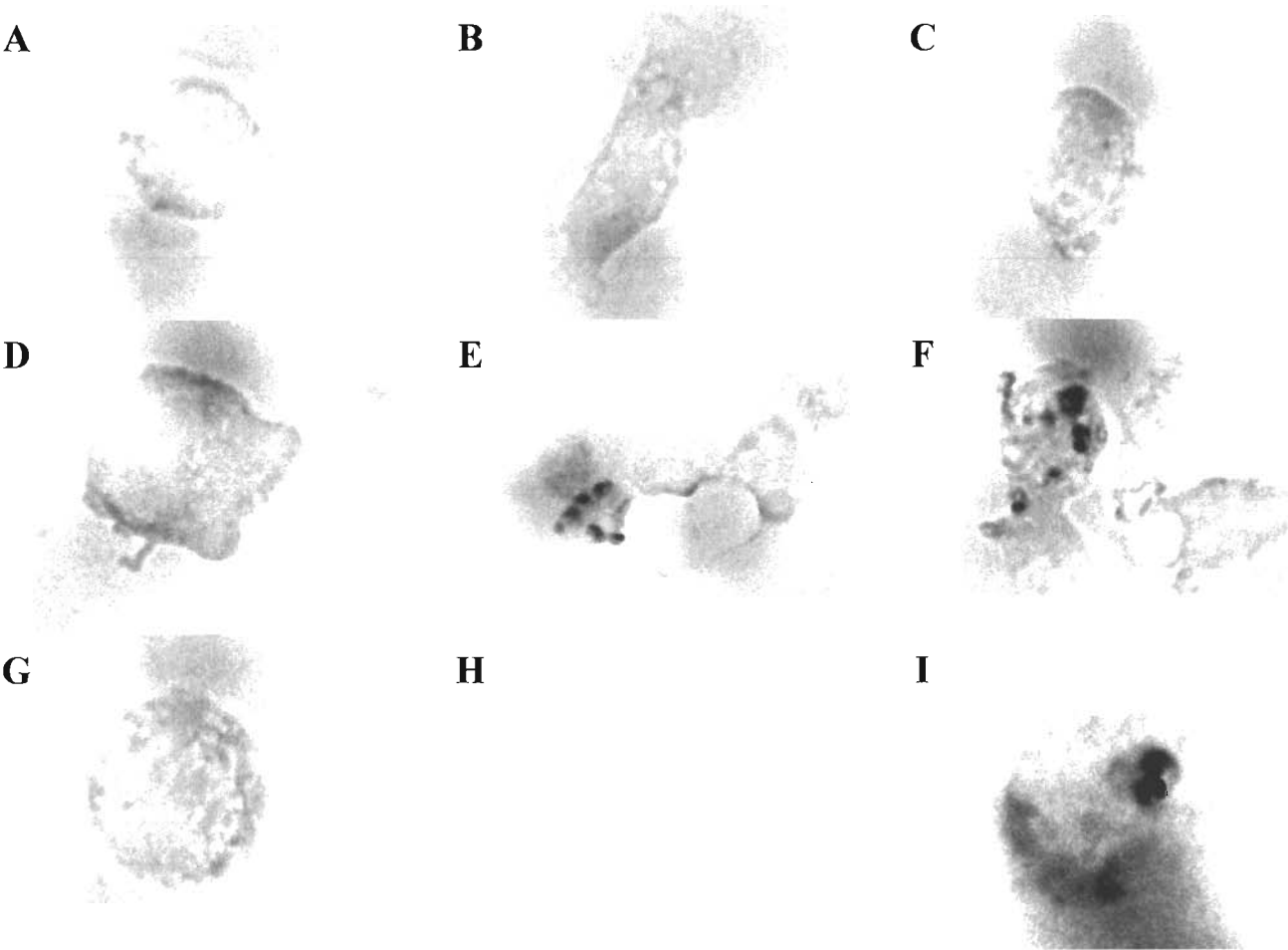
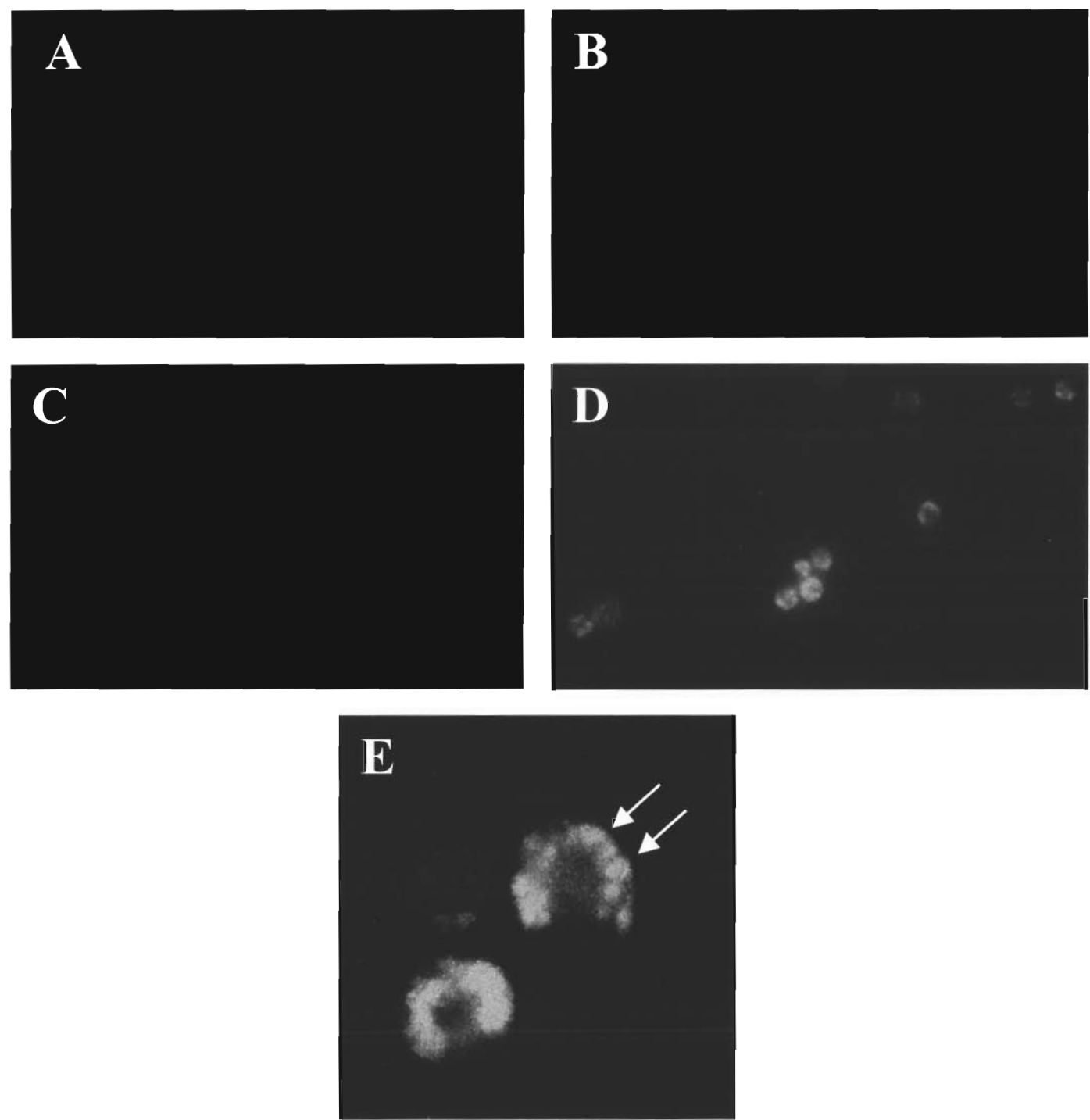


Figure 6



Article 9

Les formes amastigotes de *Leishmania infantum* résistantes aux antimonies trivalents sont également résistantes à la mort cellulaire par apoptose induite par le NO

(En préparation).

L'émergence de souches de *Leishmania* chimiorésistantes constitue un problème de santé publique de plus en plus critique. En outre, il semble que l'efficacité de la chimiothérapie dépende, au moins en partie, de l'activation du système immunitaire de l'hôte. Il est probable que les deux molécules leishmanicides majeures que sont le monoxyde d'azote (NO) et l'antimoine coopèrent afin d'éradiquer les leishmanies de l'hôte infecté. Disposant de formes amastigotes de *L. infantum* résistantes à l'antimonio tartrate de potassium (antimonie trivalent), nous avons comparé les effets du NO sur ces parasites par rapport à la souche sauvage.

Principaux résultats :

- ① Les formes amastigotes de *L. infantum* résistantes aux antimonies trivalents sont moins sensibles à l'effet cytotoxique du nitrite de sodium, et cela de manière dépendante du degré de chimiorésistance.
- ② Grâce à l'utilisation de différents donneurs de NO, nous montrons que les amastigotes axéniques résistants à l'antimoine présentent une résistance croisée au NO. Ils sont également insensibles à l'effet du NO généré par des macrophages humains activés.
- ③ La perte de sensibilité au NO des formes amastigotes résistantes à l'antimoine se traduit par leur résistance au processus de suicide cellulaire par apoptose induit par le NO, aussi bien *in vitro* qu'*ex vivo* dans les macrophages activés.

L'acquisition d'une chimiorésistance aux antimonies induit chez *Leishmania* des modifications métaboliques importantes notamment au niveau des thiols qui servent à extruder la drogue. Le NO ayant également une forte affinité pour les thiols, il est possible

que la résistance croisée antimoine/NO soit la conséquence de cibles moléculaires communes chez le parasite.

**Trivalent antimonyl-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*
resist NO-induced apoptotic cell death.**

P. HOLZMULLER, D. SERENO, and J.-L. LEMESRE*

UR 008 Pathogénie des Trypanosomatidés, IRD (Institut de Recherche pour le Développement), B.P. 64501, 911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier cedex 5, France.

Running title: Resistance to NO-mediated apoptosis in *Leishmania infantum* antimony-resistant amastigotes.

*Corresponding author: Jean-Loup LEMESRE, UR 008 Pathogénie des Trypanosomatidés, IRD (Institut de Recherche pour le Développement), B.P. 64501, 911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France.

Fax: 33 (0)4 67 41 63 30

Tel: 33 (0)4 67 41 62 20

Email: lemesre@mpl.ird.fr

Abstract

The basic treatment of leishmaniasis still consists nowadays in the administration of pentavalent antimonials (Pentostam® and Glucantime®). Unresponsiveness to these drugs is an emerging problem in many endemic areas. Moreover, efficacy of chemotherapy seems to be dependent on activation of cell-mediated immunity leading to macrophage activation and nitric oxide (NO) generation. Association of these two leishmanicidal molecules in the killing of *Leishmania* parasites might involve the development of a cross-resistance to both toxics in the case of treatment failure. Using the *in vitro* model of *L. infantum* amastigotes resistant to trivalent antimony, we investigated the effect of both NO delivered by NO-donors on extracellular amastigotes development, and NO generated by activated macrophages on intracellular amastigotes survival. The combined use of several standard apoptosis analysis techniques including YOPRO-1 staining in flow cytofluorometry and *in situ* recognition of DNA strand breaks by the TUNEL assay, revealed that antimony-resistant amastigotes of *L. infantum* were not affected by NO-induced programmed cell death. This result suggests common features in antimony and NO resistance biochemical pathways, leading probably to the increase in chemoresistance case reports.

Key words: *Leishmania infantum*, antimony-resistant amastigotes, nitric oxide, apoptosis.

Introduction

Leishmania infantum is the etiologic agent of canine and human visceral leishmaniasis (VL) in the Old World. *Leishmania* parasites exhibit a digenetic life cycle, which shared between a female phlebotomine insect vector that inject the flagellate promastigote form into the vertebrate host during a blood meal. Promastigotes quickly invade mononuclear phagocytes of the vertebrate host where they transform into non-flagellated amastigotes, responsible for the clinical disease manifestations.

Basically, we could consider two pathways leading to *Leishmania* killing. The natural one is based on the development of a cell-mediated immunity (Scott, 1991). Th1-type T-cells expansion after *Leishmania* antigens stimulation increases synthesis of macrophage-activating cytokines, such as interferon- γ (IFN- γ), what induce macrophage leishmanicidal activity via nitric oxide (NO) generation (reviewed in Nathan and Shiloh, 2000; Brunet, 2001; Colasanti *et al.*, 2002). The chemical pathway was the basic treatment of leishmaniasis, which consisted in the administration of sodium stibogluconate (Pentostam®), meglumine (Glucantime®), pentamidine or amphotericin B. Biochemical pathways involved in antimonials chemoresistance are not yet elucidated, but gene amplification of drug targets as it was demonstrated for P- glycoproteins (Ullman, 1995) or of drug scavengers like trypanothion (Mukhopadhyay *et al.*, 1996 ; Arana *et al.*, 1998) are certainly involved.

Interestingly, the use of drugs against *Leishmania* seemed not only to directly kill intracellular parasites but also to stimulate the infected host immune system to synergize effects of chemical and natural microbicidal molecules. Successful chemotherapy in murine and canine models was besides correlated with efficiency of natural immunity (Vouldoukis *et al.*, 1996; Das *et al.*, 2001), and the combined use of antimonial drugs and immunostimulant induced cytokines production leading to antileishmanial cell-mediated immunity (Li *et al.*, 1997; Murray and Delph-Etienne, 2000). Moreover, a common feature of both NO pathway and antimony-containing drugs one was recently pointed out with the demonstration of their ability to induce *Leishmania* cell death by a process exhibiting features of apoptosis (Serenio *et al.*, 2001; Holzmuller *et al.*, 2002).

We examined in this study the potential existence of a cross-resistance in *L. infantum* amastigotes to the two major leishmanicidal molecules nitric oxide and antimony. Using antimony-resistant amastigotes, we analysed their susceptibility/resistance to the apoptotic

cell death induced by NO. Existence of shared molecular targets involved in both resistance biochemical pathways is discussed.

Materials and methods

Reagents. Foetal calf serum and L-Glutamine (Lot. 3414) were obtained from Bio Media. RPMI 1640 medium (Lot. 0MB0174) was purchased from Bio Whittaker Europe. Penicillin/Streptomycin (10000 IU/ml-10000 UG/ml, Lot. 3037222) and Phosphate Buffer Saline free of Ca²⁺/Mg²⁺ were obtained from Life Technologies. Bacterial lipopolysaccharid (LPS), interferon γ (Human recombinant), MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Lot. 66H5033) and potassium antimonyl tartrate trihydrate were purchased from Sigma. NO donors *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamin (SNAP) and (Z)-1-[2-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolate (DETA/NONOate) were purchased from Alexis Biochemicals. All other cellular and molecular biology grade chemicals were obtained from Sigma. Cell-free MAA/20 culture medium for axenically grown amastigotes was defined following Lemesre and colleagues (Lemesre *et al.*, 1994, 1997).

Parasites and *in vitro* cultures. A cloned line of *Leishmania infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) was used in all experiments. *L. infantum* axenically-grown amastigote forms were maintained at 37 $\pm$ 1°C by weekly subpassages in MAA/20 medium. From a starting inoculum of 5 $\times$ 10⁵ amastigote forms/ml, cell density of about 2-3 $\times$ 10⁸ parasites/ml was obtained on day 7. Axenically-grown amastigote forms appeared homogeneous, round to ovoid, without apparent flagellum and non motile. Axenically-grown amastigotes from various *Leishmania* species clearly resembled intracellular amastigotes with regard to their ultrastructural, biological, biochemical and immunological properties (Bates *et al.*, 1992; Bates, 1993, 1994; Lemesre *et al.*, 1994, 1997; Hodgkinson, 1996; Cysne-Finkelstein *et al.*, 1998).

Treatment of extracellular amastigotes with NO donors sodium nitrite (NaNO₂), *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamin (SNAP), and (Z)-1-[2-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolate (DETA/NONOate). Late logarithmic phase amastigote forms were washed three times in phosphate buffer saline (PBS), 0.01 M, pH 4.5 before treatment. Parasites were resuspended in the same buffer at the concentration of 10⁷ amastigotes per ml and 10 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M, 1 mM and 10 mM sodium nitrite were added, respectively. After 2 hours of incubation at 32 $\pm$ 1°C in the dark, parasites were washed ones in PBS before

subpassage in fresh culture medium for 4 days. Control amastigotes were conditioned in the same way but in absence of sodium nitrite. For IC₅₀ determination, sodium nitrite was added directly in amastigotes culture medium at various concentrations and viability test was performed 72 hours later (see below). SNAP and DETA/NONONOate were added immediately after parasite inoculation directly in the culture medium at concentrations ranging from 0 to 500 μ M. After 72 hours incubation, IC₅₀ values were estimated (see below).

Incorporation of ³H-Thymidine. To estimate the parasite survival after NO treatment, we incubated *L. infantum* with ³H-Thymidine. Briefly, at the end of the exposure to sodium nitrite, parasites were washed once in Ca²⁺/Mg²⁺ free PBS and resuspended in growth medium in the presence of 2.5 μ Ci ³H-Thymidine. Thymidine incorporation was determined 24 hours later by filtration of parasites suspensions through GF/C filters (Whatman International) and scintillation counting. The cytotoxic effect for each sodium nitrite concentration was calculated as the percentage of incorporation level of NO-treated amastigotes compared to control ones.

Viability test. To estimate the IC₅₀ values, the MTT-based microassay was used as described before (Serenio *et al.*, 1997). Tetrazolium bromide has the property of being reduced by parasitic dehydrogenases into a dark-blue insoluble formazan product, the amount of which depends on the number of viable amastigotes. Briefly, amastigotes from late-log phase of growth were seeded in 96-wells microplates at 2×10^5 parasites/well in a volume of 100 μ l in adequate culture conditions. NO donors were added at 1/10 of the final concentration in a volume of 10 μ l in triplicate (range depending on the NO donor used). After a 72-hours incubation, 10 μ l of MTT (10 mg/ml) was added to each well and plates were further incubated for 4 hours. Adding 100 μ l of 50% isopropanol-10% SDS then stopped the enzymatic reaction. The plates were incubated for an additional 30 minutes while being agitated at room temperature before reading the OD value at 570 nm with a titter-tech 96-well scanner (LabSystems Multiscan EX). Two or more experiments in triplicate were performed to determine each NO donor sensitivity. Activity of the NO donors alone in culture medium was determined and no substantial interaction was found. Results were analysed using the mathematical model described by Hills (1986).

Flow Cytofluorometry analysis using YOPRO-1. The percentage of apoptotic cells was quantitated by flow cytofluorometry analysis using the DNA intercalatant YOPRO-1 (YP) as previously described (Idzioreck *et al.*, 1995). Briefly, 10^6 *L. infantum* amastigotes were incubated with 10 μ M YP for 10 min. Cells were immediately analysed by a FacscanTM flow cytometer (Becton Dickinson, Ivry, France) using an argon-ion laser tuned to 488 nm. Green cell fluorescence, gated on forward and sidelight scatter, was collected using a 525 $\pm$ 10 nm band-pass filter (FL1) and displayed using a logarithmic amplification.

***In vitro* macrophages infections.** Human leukemia monocyte cell line (THP-1 cells) was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. THP-1 cells in the log-phase of growth were differentiated by incubation for 2 days in medium containing 20 ng/ml phorbol myristate acetate (PMA), inducing the differentiation and causing cells to become adherent in 16 wells Lab-Tek[®] tissue culture slides (Nalge Nunc International) (Tsuchiya *et al.*, 1982). Non-adherent cells with PMA were removed by washing twice with pre-warmed RPMI medium and then macrophages were infected with stationary-phase *L. infantum* extracellular amastigotes at a parasite:macrophage ratio of 3:1 for 2 hours at 37°C with 5% CO₂. Non-internalized parasites were removed by gently washing. Infected macrophages were then cultured in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS, 10 ng/ml) and interferon- γ (IFN- γ , 100 U/ml), to activate cells for NO production.

Culture supernatants were collected for nitrite production measurement 48 hours later. Macrophages were then washed with pre-warmed RPMI, fixed with methanol and stained with Giemsa for parasite counts or processed for the TUNEL technique (see below). The parasitic index (PI) was calculated, $PI = 100 - [(mean\ number\ of\ amastigotes\ per\ macrophage \times percentage\ of\ infected\ macrophages\ in\ treated\ wells) / (mean\ number\ of\ amastigotes\ per\ macrophage \times percentage\ of\ infected\ macrophages\ in\ untreated\ wells)] \times 100$.

Measurement of nitrite production. NO₂⁻ accumulation in the medium over 48 hours for the leishmanicidal assay, was used as an indicator of NO production and was assayed by the Griess reaction (Roy and Wilkerson, 1984). Briefly, 60 μ l Griess reagent A (Sulfanilamide 1% in HCl 1.2N) and 60 μ l Griess reagent B (N-(1-naphtyl)-ethyl-enediamine 0.3%) were added to 100 μ l of each supernatant in triplicate wells in a 96-well plate. Plates were read at

540 nm in an ELISA plate reader (Labsystems Multiskan EX). NaNO₂ in RPMI was used to construct a standard curve for each plate reading.

***In situ* Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL technique).** Slides with infected macrophages were fixed for 20 min with PBS containing 4% paraformaldehyde, washed twice with PBS 0.01M pH 7.2 and stored at -20°C until use. DNA fragmentation was analysed *in situ* using a colorimetric apoptosis detection system (Promega, Madison, USA), according to the manufacturer instructions. After the TUNEL protocol, preparations were analyzed using a microscope at 1000× magnification. Apoptotic nuclei and kinetoplasts appeared dark brown. Other nuclei were not colored.

Statistical analysis. Statistical significance (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001) was analysed by Student's *t*-test. All experiments were performed at least twice.

Results

Differential cytotoxic effect of sodium nitrite on wild type and antimony-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. Figure 1 shows differences in the percentage of growth inhibition by treatment with acidified sodium nitrite between wild type and trivalent antimony-resistant amastigotes. Both wild type and resistant exhibited a dose-dependent susceptibility to sodium nitrite (Figure 1). Nevertheless, antimony-resistant amastigotes were less sensitive than wild type ones, in a level of antimony resistance manner. Treatment with 200 μ M acidified sodium nitrite inhibited by about 50 % the growth of wild type amastigotes, whereas growth of LiSbIIIR20 and LiSbIIIR120 (amastigotes resistant to 20 and 120 μ g/ml potassium antimonyl tartrate, respectively) was only inhibited by about 20 % (Figure 1). After a 1 mM exposure, the growth of wild type amastigotes was reduced by more than 70% and the one of LiSbIIIR20 and LiSbIIIR120 amastigotes by about only 55 and 35 %, respectively (Figure 1).

Resistance to NO leishmanicidal effect in *L. infantum* antimony-resistant amastigotes. We tested the effects of three NO donors (*i.e.* sodium nitrite, SNAP and DETA/NONOate) on both wild type and antimony-resistant amastigotes of *L. infantum* (Table 1). Resistance indexes (IR represents the IC_{50} value of antimony-resistant clone/ IC_{50} of wild type clone for the NO donor considered) were of 21.5, 3 and 3.5 for sodium nitrite, SNAP and DETA/NONOate, respectively (Table 1). Indeed the incubation conditions were not optimal for NO production by sodium nitrite (O'Brien *et al.*, 1994), the two other NO-releasing compounds showed that antimony-resistant amastigotes could readily resist NO action *in vitro* (Table 1).

Resistance to NO microbicidal effect, as observed *in vitro* after treatment with NO donors, also occurred in intracellular amastigotes of *L. infantum* exposed to endogenous NO produced by activated macrophages (Figure 2). THP-1 macrophages infected with axenically-cultured wild type amastigotes and activated 48 hours with IFN- γ and LPS led to a time-dependent intracellular killing of *Leishmania* as determined by the reduction of parasitic indexes of more than 95%, concomitant with NO_2^- accumulation in culture fluids (Figure 2). By contrast, inhibition of the parasitic index did not exceed 15% when THP-1 activated macrophages were infected with antimony-resistant amastigotes (Figure 2).

***L. infantum* amastigotes resistance to NO-mediated apoptosis.** The impermeable DNA intercalatant YOPRO-1 has been previously used for monitoring the apoptosis of *Leishmania* amastigotes treated by potassium antimonyl tartrate (trivalent antimony) or NO donors (Sereno *et al.*, 2001; Holzmüller *et al.*, 2002). YOPRO-1 staining could selectively differentiate viable (Figure 3, A and B), necrotic (sodium dodecylsulfate-treated, Figure 3, C and D) and apoptotic amastigotes (Figure 3, E and F) by using the combined analysis of their different patterns of FSC-H properties and YOPRO-1 staining (FL1-H). Geneticin (2 mg/ml) was used as a positive apoptosis inducer as described by Sereno *et al.* (2001) (Figure 3, E and F). Both wild type and LiSbIIIR120 amastigotes incubated in MAA/20 in the absence of NO donor displayed an homogenous population of living cells with a low fluorescence background (Figure 3, G and H, K and L, respectively). By contrast, a new cell population with a high FL1 fluorescence corresponding to apoptotic-like cells, appeared only in NO-treated wild type amastigotes (Figure 3, I and J). LiSbIIIR120 amastigotes exhibited always more than 90% living cells after NO treatment (Figure 3, M and N).

Moreover, the *in situ* TUNEL technique revealed that the nuclear DNA fragmentation of intracellular amastigotes occurred in *Leishmania*-infected THP-1 macrophages stimulated by LPS and IFN- γ (Figure 4). Labelled amastigote nuclei could only be visualised inside activated macrophages producing NO infected with wild type amastigotes (Figure 4, B). Intracellular amastigote nuclei of both wild type and LiSbIIIR120 were free of label in non-activated macrophages (Figure 4, A and C), or in activated macrophages infected with LiSbIIIR120 amastigotes (Figure 4, D).

Discussion

In this study, we showed that amastigotes of *Leishmania infantum*, selected *in vitro* for resistance to trivalent antimony containing-drug potassium antimonyl tartrate, were not affected by NO leishmanicidal effect. NO donors-induced apoptotic DNA fragmentation could not be detected in antimony-resistant amastigotes, and they can thus be considered as antimony/NO cross-resistant mutants.

Chemoresistance in parasitic diseases such as leishmaniasis has emerged as a major problem in the treatment, control and eradication of parasite pathogens. Basic treatment of human and canine visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum* consists in the administration of antimonials. Increasing cases of relapses are described (Bottasso *et al.*, 1992; Durand *et al.*, 1998; Pal *et al.*, 2001), suggesting therefore that antimony-resistant parasites could be selected during treatment and then be transmitted to new hosts. Our results strongly suggest that these resistant parasites would escape the immune response of the new host, even if effective, thus establishing more rapidly the infection and increasing the severity of the disease. Moreover, classical therapies of humans or dogs infected with antimony-resistant amastigotes would become unsuccessful since efficacy of drug treatment was associated with the development of natural antimicrobial immunity (Vouldoukis *et al.*, 1996; Das *et al.*, 2001). The combined use of antimonial drugs and immunostimulant (Li *et al.*, 1997; Murray and Delph-Etienne, 2000) would also not succeed in inducing protective cytokines production involved in the antileishmanial cell-mediated immunity. Nevertheless, we demonstrated recently that second line drugs pentamidine and amphotericin B represented potentially good candidates to cure infections caused by antimony-resistant *Leishmania* parasites (Serenio *et al.*, 2000).

One of the molecular bases usually described for chemoresistance in *Leishmania* consist in the amplification of the gene encoding the target of the drug (Beverley *et al.*, 1988; Beverley, 1991; Henderson *et al.*, 1992; Papadopoulou and Ouellette, 1993; Gamarro *et al.*, 1994; Segovia, 1994; Haimeur *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2001). A model for antimony resistance was proposed in which pentavalent antimony-containing compounds, including the antileishmanial drug Glucantime®, were reduced intracellularly to trivalent antimonials (Goodwin, 1995 ; Serenio et Lemesre, 1997 ; Serenio *et al.*, 1998 ; Shaked-Mishan *et al.*, 2001), conjugated to trypanothione, and extruded by the As-thiol pump. The rate-limiting step in resistance was proposed to be formation of the metalloid-thiol pump substrates, so that

increased synthesis of trypanothione rather than an increase in the number of pump molecules produces resistance (Mukhopadhyay *et al.*, 1996). Thiols metabolism have besides been demonstrated to play an important role in resistance to Glucantime® in *L. tropica* (Arana *et al.*, 1998). On the other hand, thiol groups of proteins are currently targeted by NO (Mnaimneh *et al.*, 1997 ; Colasanti *et al.*, 1999 ; Kroncke *et al.*, 2000). An interesting hypothesis that may deserve further research would be that NO resistance of *L. infantum* antimony-resistant amastigotes was a consequence of increased trypanothione synthesis. In fact, in addition to their trivalent antimony extrusion function, high levels of trypanothione represent an important source of thiol residues that may act as NO scavengers, preventing NO-mediated cell damages in *Leishmania*.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Institut de Recherche pour le développement (IRD Institute) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM Foundation).

References

Arana FE, Perez-Victoria JM, Repetto Y, Morello A, Castanys S, Gamarro F. 1998. Involvement of thiol metabolism in resistance to glucantime in *Leishmania tropica*. *Biochem. Pharmacol.* **56**: 1201-8.

Bates PA, Robertson CD, Tetley L, Coombs GH. 1992. Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology.* **105**: 193-202.

Bates PA. 1993. Characterization of developmentally-regulated nucleases in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. *FEMS Microbiol. Lett.* **107**:53-58.

Bates PA. 1994. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology.* **108**: 1-9.

Beverley SM, Petrillo-Peixoto M. 1988. Naturally-occurring gene amplifications conferring drug resistance in *Leishmania tarentolae*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **83** Suppl 1:330-3.

Beverley SM. 1991. Gene amplification in *Leishmania*. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**:417-44.

Bottasso O, Cabrini J, Falcoff R, Falcoff E. 1992. Successful treatment of an antimony-resistant American mucocutaneous leishmaniasis: a case report. *Arch. Dermatol.* **128**: 996-7.

Brunet LR. 2001. Nitric oxide in parasitic infections. *International Immunopharmacology.* **1**: 1457-1467.

Colasanti M, Gradoni L, Mattu M, Persichini T, Salvati L, Venturini G, Ascenzi P. 2002. Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO (Review). *International Journal of Molecular Medicine.* **9**: 131-134.

Colasanti M, Persichini T, Venturini G, Ascenzi P. 1999. S-nitrosylation of viral proteins: molecular bases for antiviral effect of nitric oxide. *IUBMB Life.* **48**: 25-31.

Cysne-Finkelstein L, Temporal RM, Alves FA, Leon LL. 1998. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Exp. Parasitol.* **89**:58-62.

Das L, Datta N, Bandyopadhyay S, Das PK. 2001. Successful therapy of lethal murine visceral leishmaniasis with cystatin involves up-regulation of nitric oxide and a favorable T cell response. *J. Immunol.* **166**: 4020-8.

Durand R, Paul M, Pratlong F, Rivollet D, Dubreuil-Lemaire ML, Houin R, Astier A, Deniau M. 1998. *Leishmania infantum*: lack of parasite resistance to amphotericin B in a clinically resistant visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 2141-3.

Gamarro F, Chiquero MJ, Amador MV, Legare D, Ouellette M, Castanys S. 1994. P-glycoprotein overexpression in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Biochem. Pharmacol.* **47**: 1939-47.

Goodwin LG. 1995. Pentostam (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**: 339-41.

Haimeur A, Guimond C, Pilote S, Mukhopadhyay R, Rosen BP, Poulin R, Ouellette M. 1999. Elevated levels of polyamines and trypanothione resulting from overexpression of the ornithine decarboxylase gene in arsenite-resistant *Leishmania*. *Mol. Microbiol.* **34**: 726-35.

Henderson DM, Sifri CD, Rodgers M, Wirth DF, Hendrickson N, Ullman B. 1992. Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian *mdr1* gene. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2855-65.

Hodgkinson VH, Soong L, Duboise SM, McMahon-Pratt D. 1996. *Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms. *Exp. Parasitol.* **83**: 94-105.

Holzmuller P, Sereno D, Cavaleyra M, Mangot I, Daulouede S, Vincendeau P, Lemesre JL. 2002. Nitric Oxide-Mediated Proteasome-Dependent Oligonucleosomal DNA

Fragmentation in *Leishmania amazonensis* Amastigotes. *Infection and Immunity*. **70**: 3727-35.

Idziorek T, Estaquier J, De Bels F, Ameisen JC. 1995. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J. Immunol. Methods*. **185**: 249-258.

Kroncke KD, Suschek CV, Kolb-Bachofen V. 2000. Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity. *Antioxid. Redox Signal*. **2**: 585-605.

Lemesre JL, Blanc MP, Grebaut P, Zilberfarb V, Carrière V. 1994. Culture continue des formes amastigotes de leishmanies en condition axénique. Réalisation du cycle évolutif *in vitro*. *Médecine et Armée*. **22**: 99-100.

Lemesre JL, Sereno D, Daulouède S, Veyret B, Brajon N, Vincendeau P. 1997. *Leishmania* spp.: Nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically grown amastigote forms. *Exp. Parasitol*. **86**: 58-68.

Li J, Padigel UM, Scott P, Farrell JP. 2002. Combined treatment with interleukin-12 and indomethacin promotes increased resistance in BALB/c mice with established *Leishmania major* infections. *Infect. Immun*. **70**: 5715-20.

Mnaimneh S, Geffard M, Veyret B, Vincendeau P. 1997. Albumin nitrosylated by activated macrophages possesses antiparasitic effects neutralized by anti-NO-acetylated-cysteine antibodies. *J. Immunol*. **158**: 308-314.

Mukhopadhyay R, Dey S, Xu N, Gage D, Lightbody J, Ouellette M, Rosen BP. 1996. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 10383-7.

Murray HW, Delph-Etienne S. 2000. Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun*. **68**: 288-93.

Nathan C, Shiloh MU. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **97**, 8841-8848.

O'Brien L, Carmichael J, Lowrie DB, Andrew PW. 1994. Strains of *Mycobacterium tuberculosis* differ in susceptibility to reactive nitrogen intermediates in vitro. *Infect. Immun.* **62**: 5187-90.

Pal S, Mandal A, Duttagupta S. 2001. Studies on stibionate resistant *Leishmania donovani* isolates of Indian origin. *Indian J. Exp. Biol.* **39**: 249-54.

Papadopoulou B, Ouellette M. 1993. Frequent amplification of a short chain dehydrogenase gene in methotrexate resistant *Leishmania*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **338**:559-62.

Roy JB, Wilkerson RG. 1984. Fallibility of Griess (nitrite) test. *Urology.* **23**: 270-271.

Scott P. 1991. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* **147**:3149-55.

Segovia M. 1994. *Leishmania* gene amplification: a mechanism of drug resistance. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **88**: 123-30.

Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouaisi A, Lemesre JL. 1998. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 3097-102.

Sereno D, Guilvard E, Maquaire S, Cavaleyra M, Holzmuller P, Ouaisi A, Lemesre JL. 2001. Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotype during the *in vitro* life cycle of *Leishmania infantum*: implications for the spread of chemoresistance in endemic areas. *Acta Tropica.* **80**: 195-205.

Sereno D, Holzmuller P, Lemesre JL. 2000. Efficacy of second line drugs on antimonyl-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta Tropica.* **74**: 25-31.

Sereno D, Lemesre JL. 1997. Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **41**: 972-976.

Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M, Zilberstein D. 2001. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **276**: 3971-6.

Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K. 1982. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* **42**: 1530-6.

Ullman B. 1995. Multidrug resistance and P-glycoproteins in parasitic protozoa. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**: 77-84.

Vouldoukis I, Becherel PA, Riveros-Moreno V, Arock M, da Silva O, Debre P, Mazier D, Mossalayi MD. 1996. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur. J. Immunol.* **27**: 860-5.

Yan S, Myler PJ, Stuart K. 2001. Tetracycline regulated gene expression in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem. Parasitol.* **112**: 61-9.

Legends to the tables.

Table 1. Comparative effects of NO donors on wild type and trivalent antimony-resistant *Leishmania infantum* amastigotes clones. The effective concentrations of NO donors that inhibit the growth of wild type (WT) and trivalent antimony-resistant (SbIII R120) amastigotes by 50% (IC₅₀) were determined by the MTT-based microassay (Serenio and Lemesre, 1997).

IR: index of resistance (IC₅₀ of resistant parasites/IC₅₀ of wild type parasites).

*: values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (n = 3).

Legends to the figures.

Figure 1. Survival of wild type (WT) and resistant to 20 µg/ml and 120 µg/ml potassium antimonyl tartrate (trivalent antimony) *Leishmania infantum* amastigotes to NO. Amastigotes in PBS pH 4.5 were exposed to sodium nitrite for 2 hours, after which time the cells were washed, distributed in parasite growth medium in the presence of 2.5 µCi 3H-Thymidine, and allowed to incorporate the radiolabel for a further 24-hour incubation period. Results are expressed in percentage of inhibition compared to the control parasites incubated in the same way but in the absence of sodium nitrite. Curves represent the mean and standard deviation of two independent experiments performed in triplicate.

Figure 2. NO-dependent cytotoxicity against *L. infantum* trivalent antimony-resistant amastigotes in human leukemia monocyte cell line (THP-1 cells) activated macrophages. THP-1 macrophages were infected with *L. infantum* amastigotes at a cell:parasite ratio of 1:3 in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS. Infected cells were treated with LPS and interferon-γ for activation and NO production. NO₂⁻ levels in supernatants (figured as legend) and parasite indexes were determined 48 hours later. Results represent the mean and standard deviation from duplicate experiments.

Figure 3. Analysis of the NO-induced apoptosis process in extracellular *L. infantum* antimony-resistant amastigotes using a cytofluorometry YOPRO-1 differential staining technique. Wild type and 120 µg/ml potassium antimonyl tartrate (trivalent antimony)-resistant amastigotes (SbIII R120) were incubated for 24 hours in culture medium alone (negative control, A and B), treated for 10 minutes by 0.1% sodium dodecylsulfate (necrosis control, C and D) and treated for 24 hours by 2mg/ml geneticin (apoptosis control, E and F). Amastigotes of both wild type and SbIII R120 were incubated for 24 hours in culture medium (G, H and K, L, respectively) the presence of 500 µM DETA/NONOate (I, J and M, N, respectively). Apoptotic cell percentage (R2), corresponding to both reduced forward scatter and high fluorescence intensity, is indicated in each experimental condition. M1 shows the peak of fluorescence intensity in panels B, D, F, H, J, L and N. Experiment has been done three times in duplicate.

Figure 4. *In situ* analysis of the NO-mediated apoptosis of *L. infantum* amastigotes in human leukemia monocyte cell line (THP-1 cells). THP-1 macrophages were infected with wild type (A and B) or antimony-resistant (C and D) amastigote forms at a parasites:cell ratio of 3:1 in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS. Infected cells were activated with LPS and interferon- γ (B and D) or not (A and C and) for 48 hours. DNA fragmentation analysis was determined using the TUNEL technique and analysed under a microscope at 1000 $\times$ magnification. Magnification of 1600 $\times$ was used to identify labelled amastigotes (E). Figure is representative of two similar experiments.

Table 1

	IC ₅₀ (μM)*		Relative drug resistance (IR)
	WT	SbIII R120	SbIII R120
NO donors			
NaNO₂	315.9 +/- 5.3	6785.9 +/- 1133	21.5
SNAP	72 +/- 0.8	229.1 +/- 15.9	3
DETA/NONOate	37.7 +/- 4.25	134,2 +/- 2.3	3.5

Figure 1

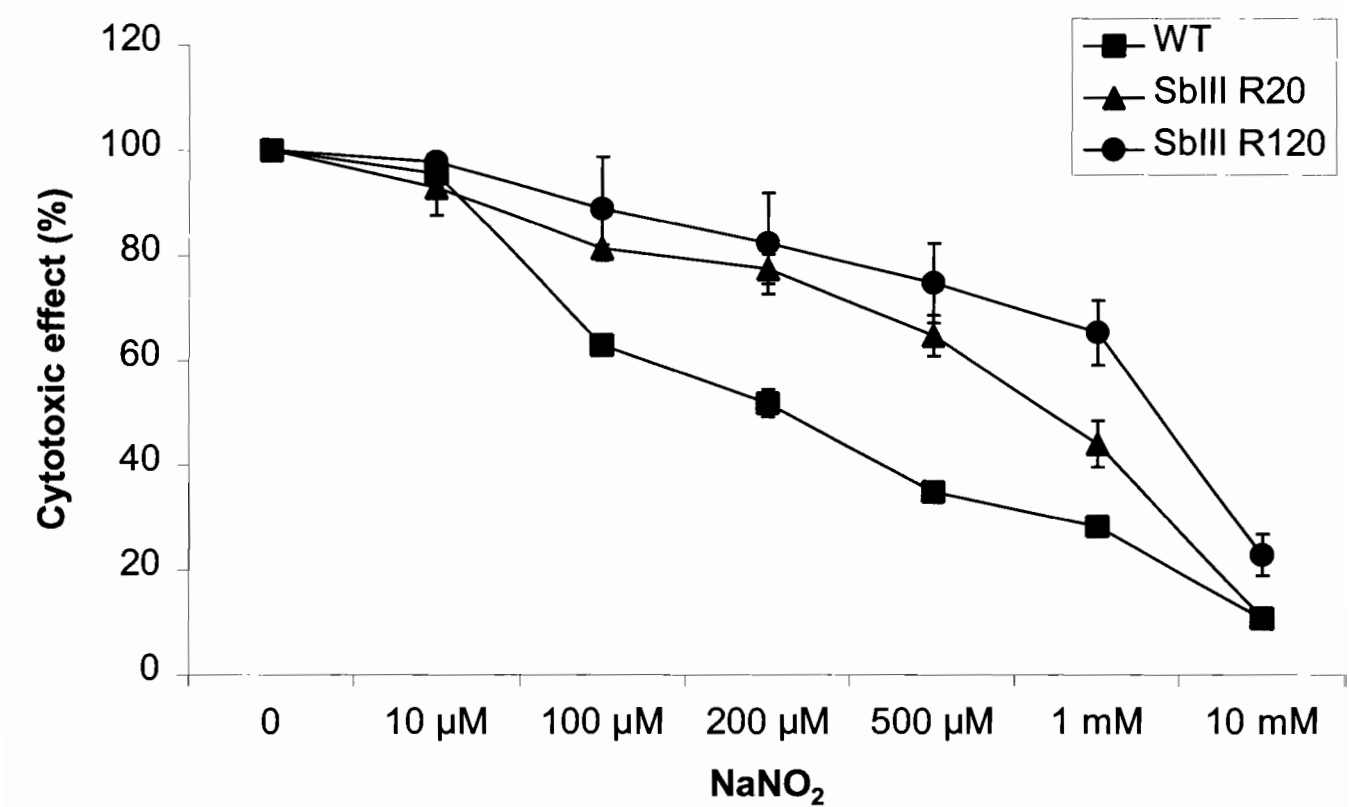


Figure 2

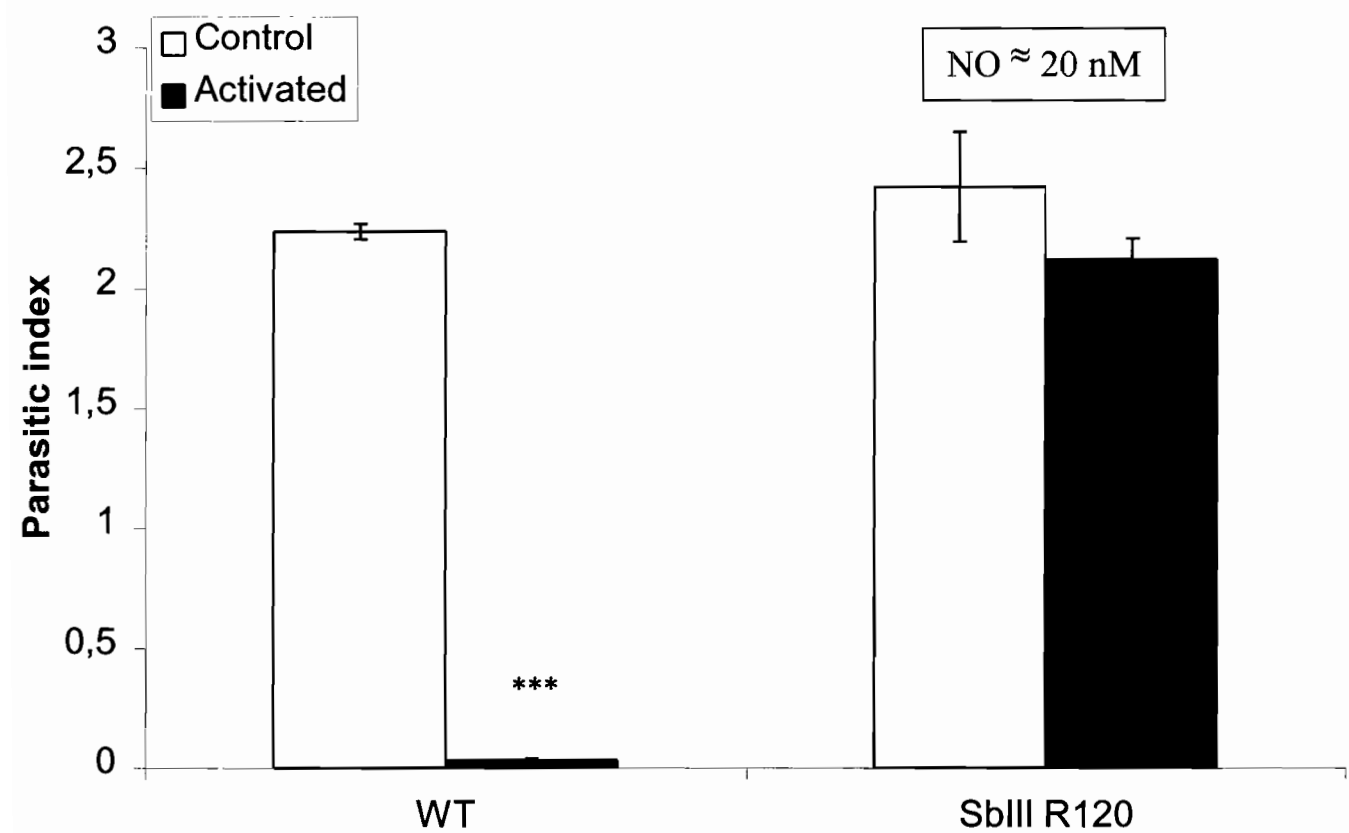


Figure 3

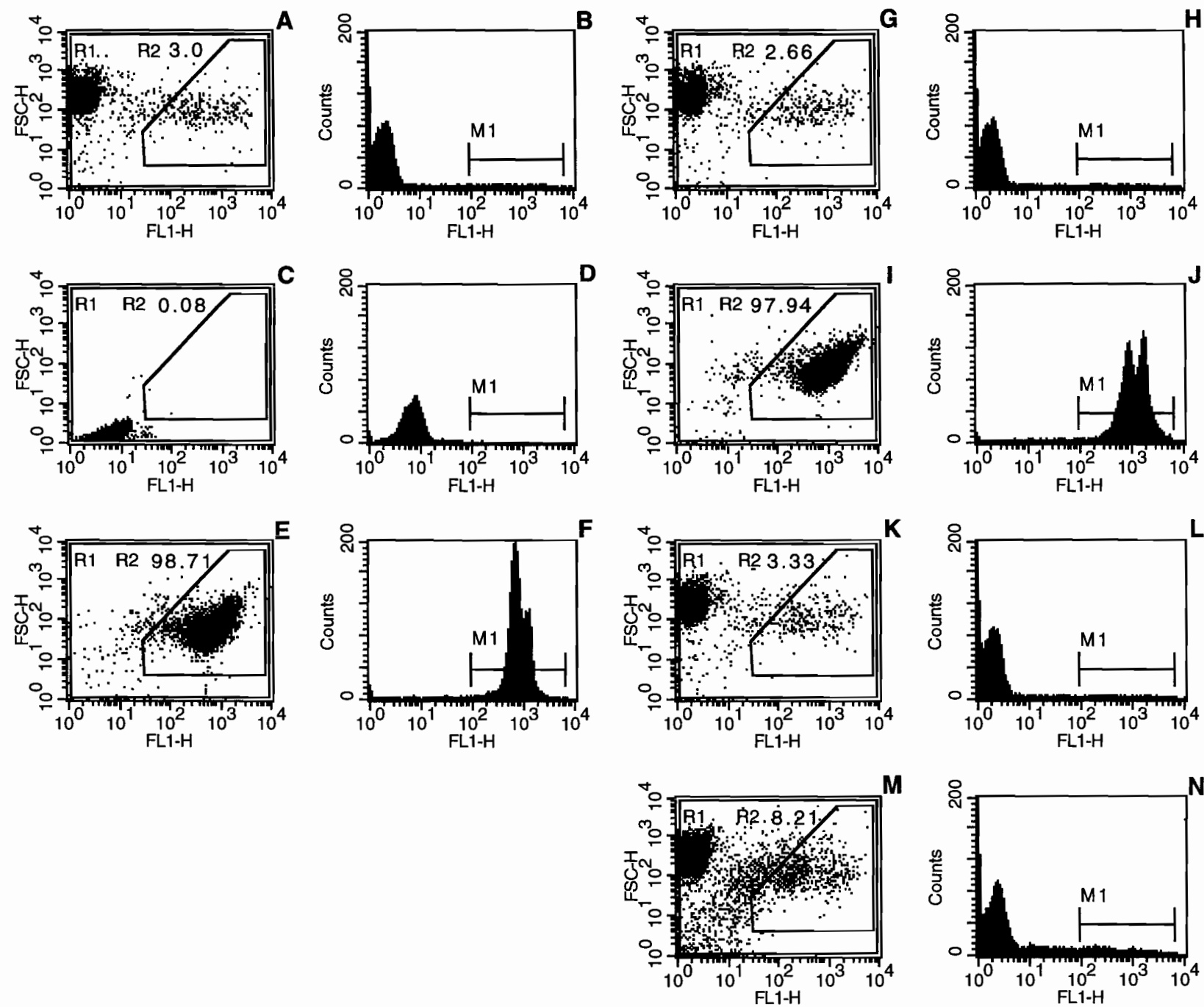
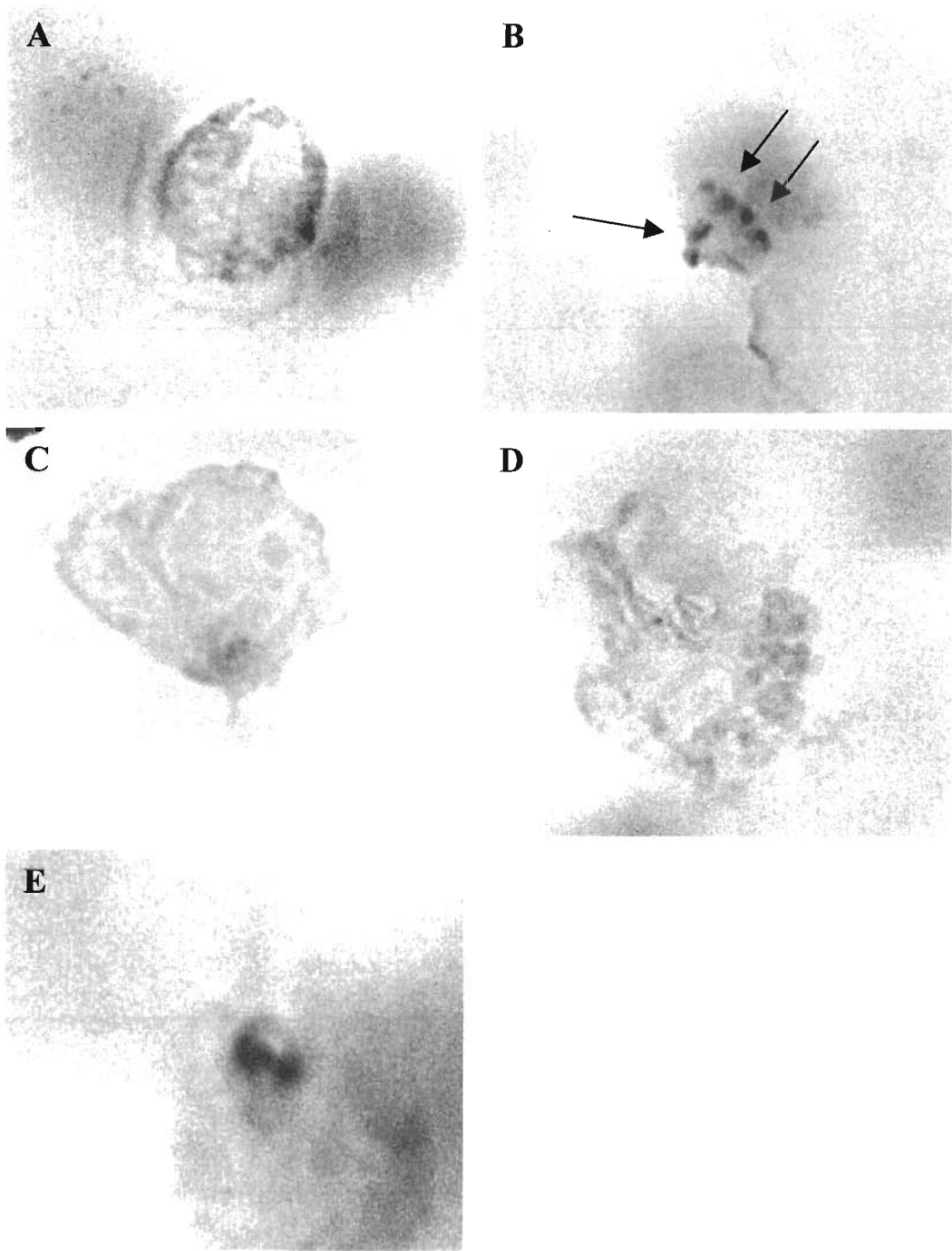


Figure 4



Article 10

Caractérisation phénotypique de formes amastigotes de *Leishmania infantum* résistantes à l'effet cytotoxique du monoxyde d'azote (NO) (En préparation).

Le monoxyde d'azote (NO) est considéré comme l'effecteur principal de l'activité leishmanicide des macrophages et nous avons montré qu'il induisait la mort par apoptose des formes amastigotes de *Leishmania*. Partant de l'observation que des formes amastigotes de *L. infantum* résistantes à l'antimoine pouvaient résister à l'action du NO, nous avons, par pression progressive de NO, sélectionné des clones mutants résistants à l'effet microbicide de donneurs de NO. Nous nous sommes intéressés à leur phénotype et à leur aptitude à résister directement au radical NO ou à l'induction du processus apoptotique qu'il induit.

Principaux résultats :

① Nous avons sélectionné 2 clones de formes amastigotes résistantes à respectivement 50 et 100 μM de NO. Ces formes ont perdu leur caractère résistant à l'antimoine par rapport au clone parental résistant à 4 $\mu\text{g/ml}$ d'antimoine trivalent. Par contre, elles présentent des indices de résistance à différents donneurs de NO de respectivement 3 et 5 fois le clone sauvage.

② Les deux clones résistants au NO sont capables de proliférer en présence d'une concentration de NO correspondant à leur sélection tandis que la souche sauvage est tuée. Néanmoins, les mutants résistants présentent des courbes de croissance atténuées en terme de nombre total de cellules produites. Ceci peut être une conséquence de leur entrée précoce en phase stationnaire de croissance.

③ Les formes amastigotes résistantes au NO sont capables de réaliser leur cycle de développement parasitaire *in vitro*. Cependant, les deux principales séquences sont fortement modifiées par rapport à la souche sauvage. Les deux phases de différenciation (*i.e.* amastigote-promastigote et promastigote-amastigote) sont plus rapide chez les mutants et dépendent du degré de résistance. Lors de la différenciation promastigote-amastigote, les

courbes de croissance sont similaires aux courbes de croissance des amastigotes en culture standard. Par contre, lors du passage amastigote-promastigote, les formes NO résistantes prolifèrent mieux et produisent d'autant plus de cellules qu'elles sont plus fortement résistantes.

④ Les mutants résistants au NO ne subissent pas l'induction par le NO d'une mort par apoptose dans les modèles d'infections macrophagiques.

⑤ Les amastigotes résistants au NO surexpriment la *cis*-aconitase et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase sont des cibles moléculaires du NO et qui sont inhibées lorsque celui-ci exerce son activité toxique. Nous montrons également que l'activité de la 6-phosphogluconate déshydrogénase est augmentée alors que cette dernière n'a encore jamais été décrite comme étant altérée par le NO.

L'induction d'une chimiorésistance au NO provoque des modifications importantes chez les leishmanies que nous avons pu caractériser sous la forme d'un nouveau phénotype. En effet, les formes résistants au NO ont un cycle de développement accéléré qui peut favoriser leur transmission. Ceci pose le problème de la gestion des chimiothérapies, qui en créant des souches résistantes aux médicaments antileishmaniens, peuvent provoquer l'émergence de souches résistantes à l'immunité naturelle de l'hôte. D'autre part, il est intéressant de constater que les leishmanies ont utilisé comme stratégie la surexpression des cibles moléculaires du NO, comme cela a déjà été décrit pour la résistance à certains médicaments antiparasitaires.

Phenotypic characterisation of *Leishmania infantum* amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity.

P. HOLZMULLER¹, D. SERENO¹, M. HIDE², AND J.-L. LEMESRE^{1*}

1. UR 008 Pathogénie des Trypanosomatidés, IRD (Institut de Recherche pour le Développement), B.P. 64501, 911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier cedex 5, France.

2. Centre d'Etudes sur le Polymorphisme des Microorganismes, UMR CNRS-IRD 9926, Centre IRD, 911 Avenue Agropolis, B.P. 64501, 34394 Montpellier cedex 5, France.

Running title: *Leishmania infantum* NO-resistant amastigotes phenotype.

*Corresponding author: Jean-Loup LEMESRE, UR 008 Pathogénie des Trypanosomatidés, IRD (Institut de Recherche pour le Développement), B.P. 64501, 911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France.

Fax: 33 (0)4 67 41 63 30

Tel: 33 (0)4 67 41 62 20

Email: lemesre@mpl.ird.fr

Abstract

Leishmaniosis represent a set of diseases whose severity mainly depends on intracellular survival and replication of *Leishmania* parasites inside macrophage. Nitric oxide (NO) has been demonstrated to be the principal effector molecule mediating intracellular killing of *Leishmania*. Starting from previous observation that antimony-resistant amastigotes of *Leishmania infantum* were not affected by NO-induced apoptotic death and using a continuous NO pressure protocol we succeeded in inducing NO resistance on amastigotes forms of *L. infantum*. Two clones resistant to 50 (LiNOR50) and 100 (LiNOR100) μM NO respectively, derived from a parental clone weakly resistant to trivalent antimony (LiSbIII R4), were selected and analysed. In absence of drug pressure, LiSbIII R4 recovered a phenotype identical to wild type and NO-resistant clones lost quite totally their antimony resistant. By contrast, they both exhibited significant resistance indexes to several NO donors. Interestingly, the parasitic developmental life cycle of NO-resistant mutants was dramatically disturbed. We shown that this last could be a consequence of overexpression of parasitic enzymes involved in both glycolysis and respiration processes. The original phenotype of both NO-resistant amastigotes clones highlights importance of preventing drug chemoresistance that may lead to emergence of parasites able to face host natural immunity.

Key words: *Leishmania*, nitric oxide, chemoresistance, developmental cycle, apoptosis, enzymes overexpression.

Introduction

Leishmania is a trypanosomatid, a flagellated parasitic protozoon that causes a variety of diseases in mammals including humans in the tropics and subtropics. The parasite alternates between sandfly and mammalian hosts and has several developmental forms. The promastigote is a motile, flagellated form that multiplies in the gut of the fly, the metacyclic promastigote is a nondividing infective form that resides in the mouthparts of the fly, and the amastigotes is a nonmotile form that lives and replicates in the phagolysosomal compartment of mammalian macrophages (Pearson *et al.*, 1983).

In experimental murine leishmaniasis a close correlation has been observed between the outcome of infection and the type of T cell response to the parasite. Susceptibility to infection was associated with activation of Th2 cells secreting interleukine (IL)-4, IL-5, IL-6 and IL-10. By contrast, when T cell response is predominated by Th1 cells producing IL-12, interferon- γ (IFN- γ) and lymphotoxin, the animals succeeded in eliminating the parasite and controlling the infection (Scott, 1991). Such dichotomic immunity against *Leishmania* become to be demonstrated also in human and canine models (Vouldoukis *et al.*, 1995, 1997; Mossalayi *et al.*, 1999; Panaro *et al.*, 1999, 2001; Pinelli *et al.*, 1994, 2000). Cytokines activated macrophages can generate large amounts of nitric oxide (NO), which has many biological functions including defense against intracellular pathogens and particularly *Leishmania* (reviewed in Nathan and Shiloh, 2000; Brunet, 2001; Colasanti *et al.*, 2002). Recently, we demonstrated that NO killed *Leishmania* parasites by inducing amastigotes apoptosis (Holzmuller *et al.*, 2002). Some molecular targets have been previously shown to be inhibited by NO, such as *cis*-aconitase (Lemesre *et al.*, 1997), glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (Mauel and Ransijn, 1997) or cysteine proteinases (Salvati *et al.*, 2001), and may be involved in initiating programmed cell death.

Several pathways are involved in chemoresistance in *Leishmania*. Resistant strains can be obtained *in vitro* by stepwise increasing drug pressure. These studies have recently shown that parasites could modify their membrane properties to face the toxicity of the drug (Chiquero *et al.*, 1998; Kundig *et al.*, 1999), but more often an amplification of the gene encoding the target enzyme of the drug was demonstrated (Beverley *et al.*, 1988; Beverley, 1991; Henderson *et al.*, 1992; Papadopoulou and Ouellette, 1993; Gamarro *et al.*, 1994; Segovia, 1994; Haimeur *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2001). By contrast, few is known about resistance to natural leishmanicidal molecules such as NO. A study demonstrated that the

protecting mechanism from NO neurotoxicity in dopaminergic neurons is based on inhibition of conversion of NO to peroxynitrite anion (Sawada *et al.*, 1996). More recently, resistance to NO was ascribed to the maintenance of ATP content in NO-treated glucose-fed human epithelial cells, which was due to their ability to derive their energy from anaerobic glycolysis (LeGoffe *et al.*, 2002). In *Leishmania*, mechanisms described for nitric oxide resistance mainly involved modulation of inducible nitric oxide synthase (NOS II) mRNA expression or enzymatic activity by parasite's molecules (Stenger *et al.*, 1996; Piani *et al.*, 1999; Linares *et al.*, 2000; Balestieri *et al.*, 2002). Moreover, NO could induce expression of stress proteins (heat shock proteins) that may confer parasite protection against its toxic effects (Adhuna *et al.*, 2000).

In this study, we described an original phenotype of *L. infantum* amastigotes that are able to resist NO-mediated apoptotic cell death. Consequences on the progress through parasitic developmental life cycle and levels of enzymes' activities were analysed. Impact of the spread of such parasite strains in the field is discussed.

Materials and methods

Reagents. Foetal calf serum was obtained from Dutscher S.A.. RPMI 1640 medium (Lot. 0MB0174) was purchased from Bio Whittaker Europe and L-Glutamine (Lot. 3414) from Bio Media. Penicillin/Streptomycin (10000 IU/ml-10000 UG/ml, Lot. 3037222) and Phosphate Buffer Saline free of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ were obtained from Life Technologies. Bacterial lipopolysaccharid (LPS), interferon γ (Mouse recombinant, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Lot. 66H5033) and potassium antimonyl tartrate trihydrate were purchased from Sigma. NO donors *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamin (SNAP) and (Z)-1-[2-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazene-1-ium-1,2-diolate (DETA/NONOate) were purchased from Alexis Biochemicals. All other cellular and molecular biology grade chemicals were obtained from Sigma. Cell-free MAA/20 culture medium for axenically-grown amastigotes was defined following Lemesre and colleagues (Lemesre et al., 1994, 1997).

Animals. Female Balb/C and C57/Black6 mice (Iffa Credo, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France) were housed under conventional conditions and given water and chow *ad libitum*. The use of the animals conformed to institutional guidelines.

Parasites and *in vitro* cultures. A cloned line of *Leishmania infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) was used in all experiments. *L. infantum* axenically-grown amastigote forms were maintained at $37\pm 1^\circ\text{C}$ by weekly subpassages in MAA/20 medium. From a starting inoculum of 5×10^5 amastigote forms/ml, cell density of about $2\text{--}3\times 10^8$ parasites/ml was obtained on day 7. Axenically-grown amastigote forms appeared homogeneous, round to ovoid, without apparent flagellum and non motile. Axenically-grown amastigotes from various *Leishmania* species clearly resembled intracellular amastigotes with regard to their ultrastructural, biological, biochemical and immunological properties (Bates *et al.*, 1992; Bates, 1993, 1994; Lemesre *et al.*, 1994, 1997; Hodgkinson, 1996; Cysne-Finkelstein *et al.*, 1998).

Promastigote cultures were derived from axenically-grown amastigote stages by subpassage at $25\pm 1^\circ\text{C}$ in medium RPMI 1640 (Gibco BRL) buffered with 25 mM HEPES and 2 mM NaHCO_3 , pH 7.2, supplemented with 10% heat-inactivated FCS. Initial parasite concentration was 1×10^6 living amastigotes per ml of medium for the differentiation

experiments. The *in vitro* parasitic developmental life cycle was achieved by subpassages of 1×10^6 resulting promastigotes in MAA/20.

Cell concentrations were determined by FacscanTM flow cytometry daily counts after propidium iodide staining and adequate dilution (1/100) in Facsflow solution (Becton Dickinson, Ivry, France). The transformations of extracellular amastigote forms into promastigote ones and of promastigotes into amastigotes were estimated microscopically after methanol fixation and Giemsa staining.

Selection of NO-resistant amastigotes of *L. infantum*. We previously demonstrated the existence of a cross-resistance between NO and potassium antimony tartrate in *L. infantum* amastigotes (Holzmüller *et al.*, *in press*). Cloned amastigotes weakly resistant to potassium antimonyl tartrate (4 µg/ml) (Serenó *et al.*, 2000) were adapted to survive in culture medium containing about 0.1 µM DETA/NONOate. After 10 subcultures in medium containing the same NO concentration, cells were cultured in medium containing increasing amounts of DETA/NONOate. These cells were subjected to stepwise increasing drug pressure until cell lines resistant to 50 and 100 µM NO were established respectively. Cells were then cloned and susceptibility of the clones to DETA/NONOate was determined. Two clones selected for further studies and designated LiNO50 and LiNOR100 were then cultured in MAA/20 in the presence of 50 and 100 µM NO, respectively.

Viability test. To estimate the IC₅₀ values, the MTT-based microassay was used as described before (Serenó *et al.*, 1997). Tetrazolium bromide has the property of being reduced by parasitic dehydrogenases into a dark-blue insoluble formazan product, the amount of which depends on the number of viable amastigotes. Briefly, amastigotes from late-log phase of growth were seeded in 96-wells microplates at 2×10^5 parasites/well in a volume of 100 µl in adequate culture conditions. Drugs were added at 1/10 of the final concentration in a volume of 10 µl in triplicate (range depending on the NO donor used). After a 72-hours incubation, 10 µl of MTT (10 mg/ml) was added to each well and plates were further incubated for 4 hours. Adding 100 µl of 50% isopropanol-10% SDS then stopped the enzymatic reaction. The plates were incubated for an additional 30 minutes while being agitated at room temperature before reading the OD value at 570 nm with a titer-tech 96-well scanner (Labsystems Multiscan EX). Two or more experiments in triplicate were performed to determine each NO donor sensitivity. Activity of the NO donors alone in culture medium was determined and no

substantial interaction was found. Results were analysed using the mathematical model described by Hills (1986).

***In vitro* macrophages infections.** Peritoneal macrophages of Balb/C (leishmaniasis susceptible model) or C57/Black6 (leishmaniasis resistant model) mice were washed with pre-warmed RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin and cultured overnight in 16 wells Lab-Tek[®] tissue culture slides (Nalge Nunc International). Non-adherent cells were removed by washing twice with pre-warmed RPMI medium and then macrophages were infected with stationary-phase extracellular amastigotes at a parasite: macrophage ratio of 3:1 for 2 hours at 37°C with 5% CO₂. Non-internalised parasites were removed by gently washing. Infected macrophages were then cultured in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS, 10 ng/ml) and interferon-γ (IFN-γ, 100 U/ml), to activate cells for NO production.

Culture supernatants were collected for nitrite production measurement 48 hours later. Macrophages were then washed with pre-warmed RPMI, fixed with methanol and stained with Giemsa for parasite counts or processed for the TUNEL technique (see below). The parasitic index (PI) was calculated, $PI = 100 - [(mean\ number\ of\ amastigotes\ per\ macrophage \times percentage\ of\ infected\ macrophages\ in\ treated\ wells) / (mean\ number\ of\ amastigotes\ per\ macrophage \times percentage\ of\ infected\ macrophages\ in\ untreated\ wells)] \times 100$.

Measurement of nitrite production. NO₂⁻ accumulation in the medium over 48 hours for the leishmanicidal assay, was used as an indicator of NO production and was assayed by the Griess reaction (Roy and Wilkerson, 1984). Briefly, 60 µl Griess reagent A (Sulfanilamide 1% in HCl 1.2N) and 60 µl Griess reagent B (N-(1-naphtyl)-ethyl-enediamine 0.3%) were added to 100 µl of each supernatant in triplicate wells in a 96-well plate. Plates were read at 540 nm in an ELISA plate reader (Labsystems Multiskan EX). NaNO₂ in RPMI was used to construct a standard curve for each plate reading.

***In situ* Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL technique).** Slides with infected macrophages were fixed for 20 min with PBS containing 4% paraformaldehyde, washed twice with PBS 0.01M pH 7.2 and stored at -20°C until use. DNA fragmentation was analysed *in situ* using a colorimetric apoptosis detection

system (Promega, Madison, USA), according to the manufacturer instructions. After the TUNEL protocol, preparations were analysed using a microscope at 1000× magnification. Apoptotic nuclei and kinetoplasts appeared dark brown. Other nuclei were not coloured.

Multilocus Enzyme Electrophoresis technique (MLEE) analysis. MLEE experiments were performed on cellulose acetate plates (Helena Laboratories) according to the method described by Ben Abderrazak (1993). Cellular pellets were lysed in an equal volume of enzyme stabilizer (EDTA, dithiotreitol, ϵ -aminocaproic, at 2mM) on an ice bed for 15 min. The lysates were centrifuged at 13.000 g for 10 min at 4°C and then the water-soluble fraction was removed and stored at –80°C until use. Five enzyme systems were studied; they were as follows. Aconitase (EC4.2.1.3), glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (EC1.2.1.12), 6-phosphogluconate dehydrogenase (EC1.1.1.44), isocitrate dehydrogenase (EC1.1.1.42), superoxide dismutase (EC1.15.1.1).

Statistical analysis. Statistical significance (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) was analysed by Student's *t*-test. All experiments were performed at least twice.

Results

Obtention of NO-resistant amastigotes forms of *L. infantum*. Using a continuous NO donor pressure protocol we obtained NO-resistant amastigotes with increasing resistance indexes (IR represents the IC_{50} value of NO-resistant clone/ IC_{50} of wild type clone for the drug considered) ranging from 3 for LiNOR50 to 5 for LiNOR100 after selection with DETA/NONOate (Table 1). As expected, both NO-resistant mutants cross-resist other NO donors, such as SNAP, with resistance indexes of again 3 and 5 for LiNOR50 and LiNOR100 respectively. Interestingly, resistance indexes to potassium antimonyl tartrate were reduced by 75 and 66 % for LiNOR50 and for LiNOR100 respectively as compared to LiSbIIIR4 clone that was used to initiate the NO donor pressure.

Interestingly, resistance indexes are stable during the in vitro life cycle of *Leishmania* (Figure 1). Both amastigotes clones resistant to 50 and 100 μ M DETA/NONOate, respectively, conserved their resistance indexes when differentiating from amastigotes into promastigotes and then back to amastigotes. A clone of *L. infantum* resistant to 10 μ M, used in the stepwise increasing NO pressure, lost its resistant index during the differentiation processes, showing the instability of NO-resistant phenotype at low NO concentration (Figure 1).

Growth of NO-resistant amastigotes of *L. infantum*. Induction of drug resistance often has a cost for the cell (Agnew *et al.*, 2001; Sereno *et al.*, 2001). As shown in figure 2, both LiNOR50 and LiNOR100 NO-resistant amastigotes clones of *L. infantum* were less fit to grow than their parental wild type clone. They produce a maximal number of parasites 1.5 to 2 times lower than the wild type. This can be the consequence of their early entry in stationary phase of growth, as early as the resistance index was high (Figure 2). Nevertheless, the parental wild type clone could readily not grow at the nitric oxide donor concentrations corresponding to the resistance indexes of both LiNOR50 and LiNOR100 clones, respectively (Figure 2). By contrast, the NO-resistant amastigotes clones that resisted 50 and 100 μ M NO respectively, were able to grow in the presence of the NO donor exhibiting growth curves similar to those obtained in a drug-free medium (data not shown).

In vitro parasite life cycle of NO-resistant amastigotes. Figure 3 indicate that both NO-resistant mutants were able to complete the two sequences of differentiation (*i.e.*

promastigote-amastigote-promastigote) representing the *in vitro* life cycle of *Leishmania* parasites. Interestingly, NO-resistant amastigotes differentiated more rapidly into promastigotes than wild type ones. After 24 hours in promastigotes culture medium, 33 and 46 % of LiNOR50 and LiNOR100 respectively, were transformed, whereas wild type amastigotes shown only 5% differentiation. Moreover, LiNOR100 amastigotes were totally differentiated into promastigotes within 3 days, which full differentiation process tooks 4 days for LiNOR50 and wild type amastigotes (Figure 3A). The same kind of speeding up was observed for the promastigote-amastigote differentiation sequence, but was less significant than previously (Figure 3B). In fact, promastigotes resulting from transformed NO-resistant and wild type amastigotes differentiated in a resistance level-dependent manner. In day 3, wild type, LiNOR50 and LiNOR100 promastigotes showed 54, 69 and 96 % differentiation, respectively. They were all fully transformed after 4 days (Figure 3B).

As a consequence of their earlier differentiation, promastigotes resulting from LiNOR100 amastigotes produced more cells than the strain resistant to 50 μ M NO (LiNOR50), which in turn produced more cells than the wild type strain (Figure 3A). By contrast, NO-resistant amastigotes resulting from the promastigote-amastigote differentiation exhibited attenuated growth curves as compared with the wild type one (Figure 3B). Interestingly, both LiNOR50 and LiNOR100 showed an early entry in stationary phase of growth, as previously observed in the proliferation experiments (Figures 2 and 3B).

Susceptibility of intracellular wild type and NO-resistant amastigotes of *L. infantum* to NO-mediated apoptosis. In two murine macrophage models, LiNOR50 and LiNOR100 variants were highly resistant towards nitrogen derivatives generated *in vitro* by γ -interferon/LPS activated peritoneal Balb/C and C57/Black6 mice macrophages, respectively (Figure 4). In Balb/C macrophages producing about 20 μ M NO, when wild type amastigotes were killed at 90%, LiNOR50 amastigotes survive in the same way as in control cells, and LiNOR100 amastigotes were able to proliferate 2 times more than in control macrophages (Figure 4A). In C57/Black6 macrophages where NO levels reached to about 60 μ M, LiNOR50 and LiNOR100 amastigotes were still resistant to NO action but with a lower efficacy. Wild type amastigotes were destroyed at more than 95% whereas parasitic indexes of LiNOR50 and LiNOR100 amastigotes were only reduced by 76 and 43 %, respectively (Figure 4B).

As previously described for *L. amazonensis* intracellular amastigotes (Holzmüller *et al.*, 2002), the *in situ* TUNEL technique revealed that the nuclear DNA fragmentation of

intracellular amastigotes also occurred in *L. infantum*-infected stimulated Balb/C macrophages (Figure 5). Labelled amastigote nuclei could be only visualised inside activated macrophages producing NO that were infected with the wild type clone (Figure 5B). Intracellular amastigote nuclei were free of label in non-activated macrophages infected with either the wild type clone or both NO-resistant ones (Figure 5, A, C and E), and in macrophages stimulated with a combination of LPS and IFN- γ infected with LiNOR50 LiNOR100 respectively (Figure 5, D and F), indicating their resistance to NO-mediated apoptosis. Nevertheless, TUNEL-labelled amastigotes of LiNOR50 could be detected in C57/Black6 macrophages (*i.e.* producing about 60 μ M NO), but in less amounts than wild type ones. LiNOR100 amastigotes were still free of label and thus non-apoptotic (data not shown).

Overexpression of NO molecular targets in NO-resistant amastigotes. Previous works have shown that NO inhibited particularly two metabolic enzymes in *Leishmania* parasites, *cis*-aconitase (Lemesre *et al.*, 1997) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Mauel and Ransijn, 1997). We studied here the differential expression between wild type and NO-resistant amastigotes of these and other enzymes by the isoenzymes assay (Figure 6). Related metabolic enzyme such as isocitrate dehydrogenase that is not targeted by NO was identically expressed in both wild type and NO-resistant amastigotes. In the same way, superoxide dismutase, an enzyme implicated in facing the oxidative burst, was not overexpressed (Figure 6). By contrast, *cis*-aconitase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase were overexpressed in NO-resistant amastigotes as compared to wild type, all the more than parasite were more resistant. Interestingly, an other enzyme was overexpressed by NO-resistant amastigotes, the 6-phosphogluconate dehydrogenase, which is, up to date, not described as a NO target (Figure 6).

Discussion

Intracellular replication of *L. infantum* inside host macrophages is essential for the establishment of infection resulting in the disease. Nitric oxide (NO) has been demonstrated to be the principal effector molecule involved in the killing of *Leishmania* amastigotes by macrophages (reviewed in Nathan and Shiloh, 2000; Brunet, 2001; Colasanti *et al.*, 2002). The findings that during experimental leishmanial infection, the killing of parasite can be completely reversed by L-NMMA, an arginine analogue that blocks NO synthesis, and can proceed normally in a macrophage cell line deficient in the respiratory burst indicate that NO is both necessary and may be sufficient, to account for the macrophage leishmanicidal activity (Liew and Cox, 1991). We tried in this study to characterise the phenotype of *Leishmania infantum* amastigotes selected *in vitro* for their ability to resist NO-mediated killing.

We first determined the resistance of mutant amastigotes to several NO donors to demonstrate their NO-resistant properties. Interestingly, the selection of a NO resistance starting from antimonyl-resistant amastigotes did not increase the antimonyl-resistance level of both NO-resistant amastigotes clones analysed. On the contrary, NO-resistant amastigotes loosed their ability to resist trivalent antimony toxic effect. This may be a consequence of cultivation in absence of antimonial drug pressure. Reversion of drug resistance have been demonstrated recently in K562 cells by magnetic resonance spectroscopy (Le Moyec *et al.*, 2000). In *Leishmania*, long-term cultured parasites exhibited a loss of virulence (Segovia *et al.*, 1992) and chemoresistant amastigotes decreased their resistant indexes when cultivated for a long time in the absence of the drug (Serenio *et al.*, 1998). NO-resistant amastigotes we obtained thus developed a new resistance mechanism that may share steps with the biochemical pathway involved in antimony resistance. Moreover, chemoresistance in *Leishmania* infections have been documented (Bottasso *et al.*, 1992; Durand *et al.*, 1998; Pal *et al.*, 2001) and the hypothesis of becoming NO-resistant strains for weakly antimony-resistant strains of *Leishmania* does exist in patients.

Selection for NO resistance as for other drugs exerted a cost in term of cell metabolism. Recent works have besides shown existence of strong interactions between wild type and chemoresistant strains of *Leishmania* (Agnew *et al.*, 2001; Serenio *et al.*, 2001). Our NO-resistant amastigotes exhibited an attenuated phase of growth as compared to wild type in number of cells produced. In fact, the early entry in a stationary phase of growth could explain this. This fact correlated with increased differentiation rates during the *in vitro*

parasitic developmental life cycle and higher cell productions in the promastigote form argue for an elevated cell metabolism in both NO-resistant mutants. In parasitic diseases, the life cycle is essential to parasite survival and to spread the infection. Since the promastigote is the parasite form that survives and develops in the sandfly, the promastigote-amastigote differentiation process is crucial in the efficiency of transmitting the disease. Our results indicated that NO-resistant amastigotes differentiated more rapidly and produced more cells than the parental wild type clone, by contrast with the results obtained with drug-resistant parasites (Agnew *et al.*, 2001; Sereno *et al.*, 2001). These two properties endow NO-resistant mutants with a higher potential to be transmitted to mammalian hosts, as they can accumulate in elevated rates in the proboscis of the insect vector, even in the case of mixed parasite populations due to multiple bloodfeeding (Pratlong *et al.*, 1989, Guzman *et al.*, 1994). Moreover, after sandfly bite, injected promastigotes resulting from NO-resistant amastigotes will differentiate again more rapidly than wild type ones. Even if their growth rates are lower than those of wild type, they will better down-regulate host macrophages activation since they are able to resist NO production resulting from macrophage non-specific activation by first-line defence cells such as natural killers (NK) (Kaye and Bancroft, 1992; Borges *et al.*, 2001).

Amplification of the genes encoding drug targets has been well documented in *Leishmania* chemoresistance (Beverley *et al.*, 1988; Beverley, 1991; Henderson *et al.*, 1992; Ouellette and Papadopolou, 1993; Gamarro *et al.*, 1994; Segovia, 1994; Haimeur *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2001). We demonstrated in this study that resistance to NO, the natural major leishmanicidal molecule, needed overexpression of enzymes usually inhibited by nitrogen derivatives. In particular, our results shown elevated amounts of the two metabolic enzymes, *cis*-aconitase (Lemesre *et al.*, 1997) and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (Mauel and Ransijn, 1997), that could play a crucial role in the programmed cell death induced by NO (Holzmuller *et al.*, 2002). Recently, NO have been shown to induce overexpression of stress proteins in *Leishmania donovani* that protected parasites from cell death (Adhuna *et al.*, 2000). In fact, parasitic NO molecular targets overexpression may protect the amastigotes both directly and indirectly. Directly, enzymes acted as NO scavenger and detoxified the cell. Indectly, amplified glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase prevented ATP depletion and consequently cell death, by engaging anaerobic glycolysis as observed in NO-treated glucose-fed human epithelial cells (LeGoffe *et al.*, 2002). Moreover, amplification of *cis*-aconitase, that is considered as a two-faced protein: enzyme and iron regulatory protein (Beinert and Kennedy, 1993), increased regulation of iron homeostasis in the parasite. In tumour cells, iron regulation played a crucial role in the cell protection from

the pro-apoptotic effect of NO (Feger *et al.*, 2001). In *Leishmania* resistance to NO may thus be a consequence of the amastigotes's resistance to an apoptotic cell death.

Finally, this first phenotypic study on NO-resistant amastigotes of *L. infantum* allowed us to strengthen the hypothesis of overexpression of molecular targets in resisting microbicidal compounds. Overexpression of key parasitic enzymes seems to have consequences on both the developmental and cell cycles of the parasite, by favouring both their transmission and their survival in infected mammalian hosts. Emergence of such parasite strains would have a dramatic impact in the management of the disease, particularly in countries where antimony chemoresistance begins to increase.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Institut de Recherche pour le développement (IRD Institute) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM Foundation).

References

- Adhuna A, Saltora P, Bhatnagar R.** 2000. Nitric oxide induced expression of stress proteins in virulent and avirulent promastigotes of *Leishmania donovani*. *Immunol. Lett.* **71**: 171-6.
- Agnew P, Holzmuller P, Michalakakis Y, Sereno D, Lemesre JL, Renaud F.** 2001. *In vitro* growth of *Leishmania amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine is dependent on interactions among strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **45**: 1928-9.
- Ben Abderrazak S, Guerrini F, Mathieu-Daude F, Truc P, Neubauer K, Lewicka K, Barnabe C, Tibayrenc M.** 1993. Isoenzyme electrophoresis for parasite characterization. *Methods in Molecular Biology.* **21**: 361-382.
- Balestieri FM, Queiroz AR, Scavone C, Costa VM, Barral-Netto M, Abrahamsohn Ide A.** 2002. *Leishmania* (L.) *amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect.* **4**:23-9.
- Bates PA, Robertson CD, Tetley L, Coombs GH.** 1992. Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology.* **105**: 193-202.
- Bates PA.** 1993. Characterization of developmentally-regulated nucleases in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. *FEMS Microbiol. Lett.* **107**:53-58.
- Bates PA.** 1994. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology.* **108**: 1-9.
- Beinert H, Kennedy MC.** 1993. Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor. *FASEB J.* **7**:1442-9.
- Beverley SM, Petrillo-Peixoto M.** 1988. Naturally-occurring gene amplifications conferring drug resistance in *Leishmania tarentolae*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **83** Suppl 1:330-3.

Beverley SM. 1991. Gene amplification in *Leishmania*. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**:417-44.

Borges MM, Campos-Neto A, Sleath P, Grabstein KH, Morrissey PJ, Skeiky YA, Reed SG. 2001. Potent stimulation of the innate immune system by a *Leishmania brasiliensis* recombinant protein. *Infect. Immun.* **69**: 5270-7.

Bottasso O, Cabrini J, Falcoff R, Falcoff E. 1992. Successful treatment of an antimony-resistant American mucocutaneous leishmaniasis: a case report. *Arch. Dermatol.* **128**: 996-7.

Brunet LR. 2001. Nitric oxide in parasitic infections. *International Immunopharmacology.* **1**: 1457-1467.

Chiquero MJ, Perez-Victoria JM, O'Valle F, Gonzalez-Ros JM, del Moral RG, Ferragut JA, Castanys S, Gamarro F. 1998. Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. *Biochem. Pharmacol.* **55**: 131-9.

Colasanti M, Gradoni L, Mattu M, Persichini T, Salvati L, Venturini G, Ascenzi P. 2002. Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO (Review). *International Journal of Molecular Medicine.* **9**: 131-134.

Cysne-Finkelstein L, Temporal RM, Alves FA, Leon LL. 1998. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Exp. Parasitol.* **89**:58-62.

Durand R, Paul M, Pratlong F, Rivollet D, Dubreuil-Lemaire ML, Houin R, Astier A, Deniau M. 1998. *Leishmania infantum*: lack of parasite resistance to amphotericin B in a clinically resistant visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 2141-3.

Feger F, Ferry-Dumazet H, Mamani Matsuda M, Bordenave J, Dupouy M, Nussler AK, Arock M, Devevey L, Nafziger J, Guillosson JJ, Reiffers J, Mossalayi MD. 2001. Role of iron in tumor cell protection from the pro-apoptotic effect of nitric oxide. *Cancer Res.* **61**: 5289-94.

- Gamarro F, Chiquero MJ, Amador MV, Legare D, Ouellette M, Castanys S.** 1994. P-glycoprotein overexpression in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Biochem. Pharmacol.* **47**: 1939-47.
- Guzman H, Walters LL, Tesh RB.** 1994. Histologic detection of multiple blood meals in *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* **31**: 890-7.
- Haimeur A, Guimond C, Pilote S, Mukhopadhyay R, Rosen BP, Poulin R, Ouellette M.** 1999. Elevated levels of polyamines and trypanothione resulting from overexpression of the ornithine decarboxylase gene in arsenite-resistant *Leishmania*. *Mol. Microbiol.* **34**: 726-35.
- Henderson DM, Sifri CD, Rodgers M, Wirth DF, Hendrickson N, Ullman B.** 1992. Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian *mdr1* gene. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2855-65.
- Hodgkinson VH, Soong L, Duboise SM, McMahon-Pratt D.** 1996. *Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms. *Exp. Parasitol.* **83**: 94-105.
- Holzmuller P, Sereno D, Cavaleyra M, Mangot I, Daulouede S, Vincendeau P, Lemesre JL.** 2002. Nitric Oxide-Mediated Proteasome-Dependent Oligonucleosomal DNA Fragmentation in *Leishmania amazonensis* Amastigotes. *Infection and Immunity.* **70**: 3727-35.
- Kaye PM, Bancroft GJ.** 1992. *Leishmania donovani* infection in scid mice: lack of tissue response and in vivo macrophage activation correlates with failure to trigger natural killer cell-derived gamma interferon production in vitro. *Infect. Immun.* **60**: 4335-42.
- Kundig C, Haimeur A, Legare D, Papadopoulou B, Ouellette M.** 1999. Increased transport of pteridines compensates for mutations in the high affinity folate transporter and contributes to methotrexate resistance in the protozoan parasite *Leishmania tarentolae*. *EMBO J.* **18**: 2342-51.

Le Goffe C, Vallette G, Charrier L, Candelon T, Bou-Hanna C, Bouhours JF, Labois CL. 2002. Metabolic control of resistance of human epithelial cells to H₂O₂ and NO stresses. *Biochem. J.* 364:349-59.

Le Moyec L, Legrand O, Larue V, Kawakami M, Marie JP, Calvo F, Hantz E, Taillandier E. 2000. Magnetic resonance spectroscopy of cellular lipid extracts from sensitive, resistant and reverting K562 cells and flow cytometry for investigating the P-glycoprotein function in resistance reversion. *NMR Biomed.* 13: 92-101.

Stenger S, Donhauser N, Thuring H, Rollinghoff M, Bogdan C. 1996. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 183:1501-14.

Lemesre JL, Blanc MP, Grebaut P, Zilberfarb V, Carrière V. 1994. Culture continue des formes amastigotes de leishmanies en condition axénique. Réalisation du cycle évolutif *in vitro*. *Médecine et Armée.* 22: 99-100.

Lemesre JL, Sereno D, Daulouède S, Veyret B, Brajon N, Vincendeau P. 1997. *Leishmania* spp.: Nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically grown amastigote forms. *Exp. Parasitol.* 86: 58-68.

Liew FY, Cox FE. 1991. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunology Today.* 12: A17-21.

Linares E, Augusto O, Barao SC, Giorgio S. 2000. *Leishmania amazonensis* infection does not inhibit systemic nitric oxide levels elicited by lipopolysaccharide in vivo. *J. Parasitol.* 86:78-82.

Mauel J, Ransijn A. 1997. *Leishmania* spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. *Exp. Parasitol.* 87:98-111.

Mossalayi MD, Arock M, Mazier D, Vincendeau P, Vouldoukis I. 1999. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. *Parasitol. Today.* 15: 342-5.

Nathan C, Shiloh MU. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **97**, 8841-8848.

Pal S, Mandal A, Duttagupta S. 2001. Studies on stibionate resistant *Leishmania donovani* isolates of Indian origin. *Indian J. Exp. Biol.* **39**: 249-54.

Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S, Lofrumento DD, Mitolo V, Sisto M, Fasanella A, Trotta T, Bertani F, Consenti B, Brandonisio O. 2001. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **24**: 187-95.

Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S, Lofrumento DD, Trotta T, Satalino R, Saccia M, Mitolo V, Brandonisio O. 1999. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Int. J. Clin. Lab. Res.* **29**:122-7.

Papadopolou B, Ouellette M. 1993. Frequent amplification of a short chain dehydrogenase gene in methotrexate resistant *Leishmania*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **338**:559-62.

Pearson RD, Wheeler DA, Harrison LH, Kay HD. 1983. The immunobiology of leishmaniasis. *Rev. Infect. Dis.* **5**:907-927.

Piani A, Ilg T, Elefanty AG, Curtis J, Handman E. 1999. *Leishmania major* proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function. *Microbes Infect.* **1**:589-99.

Pinelli E, Gebhard D, Mommaas AM, van Hoeij M, Langermans JA, Ruitenber EJ, Rutten VP. 2000. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Vet. Parasitol.* **92**: 181-9.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenbergh J. 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* **62**: 229-35.

Pratlong F, Portus M, Rispail P, Moreno G, Bastien P, Rioux JA. 1989. Simultaneous presence in dogs of 2 zymodemes of the *Leishmania infantum* complex. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **64**: 312-4.

Roy JB, Wilkerson RG. 1984. Fallibility of Griess (nitrite) test. *Urology.* **23**: 270-271.

Salvati L, Mattu M, Colasanti M, Scalone A, Venturini G, Gradoni L, Ascenzi P. 2001. NO donors inhibit *Leishmania infantum* cysteine proteinase activity. *Biochim. Biophys. Acta.* **1545**: 357-366.

Sawada H, Shimohama S, Kawamura T, Akaike A, Kitamura Y, Taniguchi T, Kimura J. 1996. Mechanism of resistance to NO-induced neurotoxicity in cultured rat dopaminergic neurons. *J. Neurosci. Res.* **46**:509-18.

Scott P. 1991. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* **147**:3149-55.

Segovia M. 1994. *Leishmania* gene amplification: a mechanism of drug resistance. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **88**: 123-30.

Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouaisi A, Lemesre JL. 1998. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 3097-102.

Sereno D, Guilvard E, Maquaire S, Cavaleyra M, Holzmüller P, Ouaisi A, Lemesre JL. 2001. Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotype during the *in vitro* life cycle of *Leishmania infantum*: implications for the spread of chemoresistance in endemic areas. *Acta Tropica.* **80**: 195-205.

Sereno D, Holzmüller P, Lemesre JL. 2000. Efficacy of second line drugs on antimonyl-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta Tropica*. **74**: 25-31.

Sereno D, Lemesre JL. 1997. Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **41**: 972-976.

Vouldoukis I, Becherel PA, Riveros-Moreno V, Arock M, da Silva O, Debre P, Mazier D, Mossalayi MD. 1996. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur. J. Immunol.* **27**: 860-5.

Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, Ouaz F, Becherel P, Debre P, Moncada S, Mossalayi MD. 1995. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* **92**: 7804-7808.

Yan S, Myler PJ, Stuart K. 2001. Tetracycline regulated gene expression in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem. Parasitol.* **112**: 61-9.

Legends to the tables.

Table 1. Comparative effects of growth inhibitory agents on wild type, trivalent antimony-resistant and NO-resistant *Leishmania infantum* amastigotes clones. The effective concentrations of antimony-containing drug and NO donors that inhibit the growth of wild type (WT), trivalent antimony-resistant (SbIII R4) and NO-resistant (NO R50 and NO R100) amastigotes by 50% (IC₅₀) were determined by the MTT-based microassay (Serenio and Lemesre, 1997).

IR: index of resistance (IC₅₀ of resistant parasites/IC₅₀ of wild type parasites).

*: values are expressed as mean ± standard deviation (n = 3).

a: IC₅₀ values of potassium antimonyl tartrate are expressed in µg/ml.

Legends to the figures.

Figure 1. Variations in IR values for three resistant *L. infantum* amastigotes clones (LiNO R10, LiNO R50 and LiNO R100) and the wild type clone (WT) during the *in vitro* life cycle. Parasits were allowed to differentiate under appropriate culture conditions without drug pressure. After two subcultures, the NO resistance of the newly transformed parasites was ascertained. Each point represent the mean value of at least three independent experiments performed in triplicate. Ama: amastigote, Pro: promastigote.

Figure 2. *Leishmania infantum* NO-resistant amastigotes growth. Proliferation experiments are preformed in the presence or absence of DETA/NONOate concentrations used to subculture NO-resistant clones. Results are expressed as the mean and standard deviation of three independent experiments performed in triplicate.

Figure 3. *Leishmania infantum* NO-resistant amastigotes *in vitro* developmental cycle. Columns represent the amastigote-promastigote (A) and promastigote-amastigote (B) differentiation rates and the growth curves represent the number of cells produced during the kinetics. Differentiation experiments were performed in NO donor-free media. Results are expressed as the mean and standard deviation of three independent experiments performed in duplicate.

Figure 4. NO-dependent cytotoxicity against *L. infantum* NO-resistant amastigotes in mouse activated macrophages. Balb/C (A) or C57/Black6 (B) macrophages were infected with *L. infantum* amastigotes at a cell:parasite ratio of 1:3 in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS. Infected cells were treated with LPS and interferon- γ for activation and NO production. NO₂⁻ levels in supernatants (figured as legends) and parasite indexes were determined 48 hours later. Results represent the mean and standard deviation from duplicate experiments.

Figure 5. *In situ* analysis of the NO-mediated apoptosis of *L. infantum* amastigotes in mouse macrophages. Balb/C peritoneal macrophages were infected with wild type (A and B) or NO-resistant to 50 (C and D) or 100 (E and F) μ M NO amastigote forms at a parasites:cell ratio of 3:1 in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS. Infected cells were activated with

LPS or interferon- γ (B, D and F) or not (A, C and E) for 48 hours. DNA fragmentation analysis was determined using the TUNEL technique and analysed under a microscope at 1000 $\times$ magnification. Figure is representative of two similar experiments.

Figure 6. MLEE profiles revealed with the aconitase (EC4.2.1.3), glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (EC1.2.1.12), 6-phosphogluconate dehydrogenase (EC1.1.1.44), isocitrate dehydrogenase (EC1.1.1.42), superoxide dismutase (EC1.15.1.1) systems. WT: wild type amastigotes, LiNO R50: amastigotes resistant to 50 μ M NO, LiNO R100: amastigotes resistant to 100 μ M NO.

Table 1

NO donors (a)	IC ₅₀ (μM)*				Relative drug resistance (IR)		
	WT	SbIII R4	NO R50	NO R100	SbIII R4	NO R50	NO R100
SNAP	72 +/- 0.8	132.4 +/- 8.1	233.3 +/- 17.6	388,8 +/- 26.2	< 2	3	5
DETA/NONOate	37.7 +/- 4.25	67.6 +/- 1.9	126 +/- 1.3	188 +/- 4	< 2	3	5
potassium antimonyl tartrate ^a	4.7 +/- 2.4	56.04 +/- 17.7	14.8 +/- 2.7	17.3 +/- 3.6	12	3	4

Figure 1

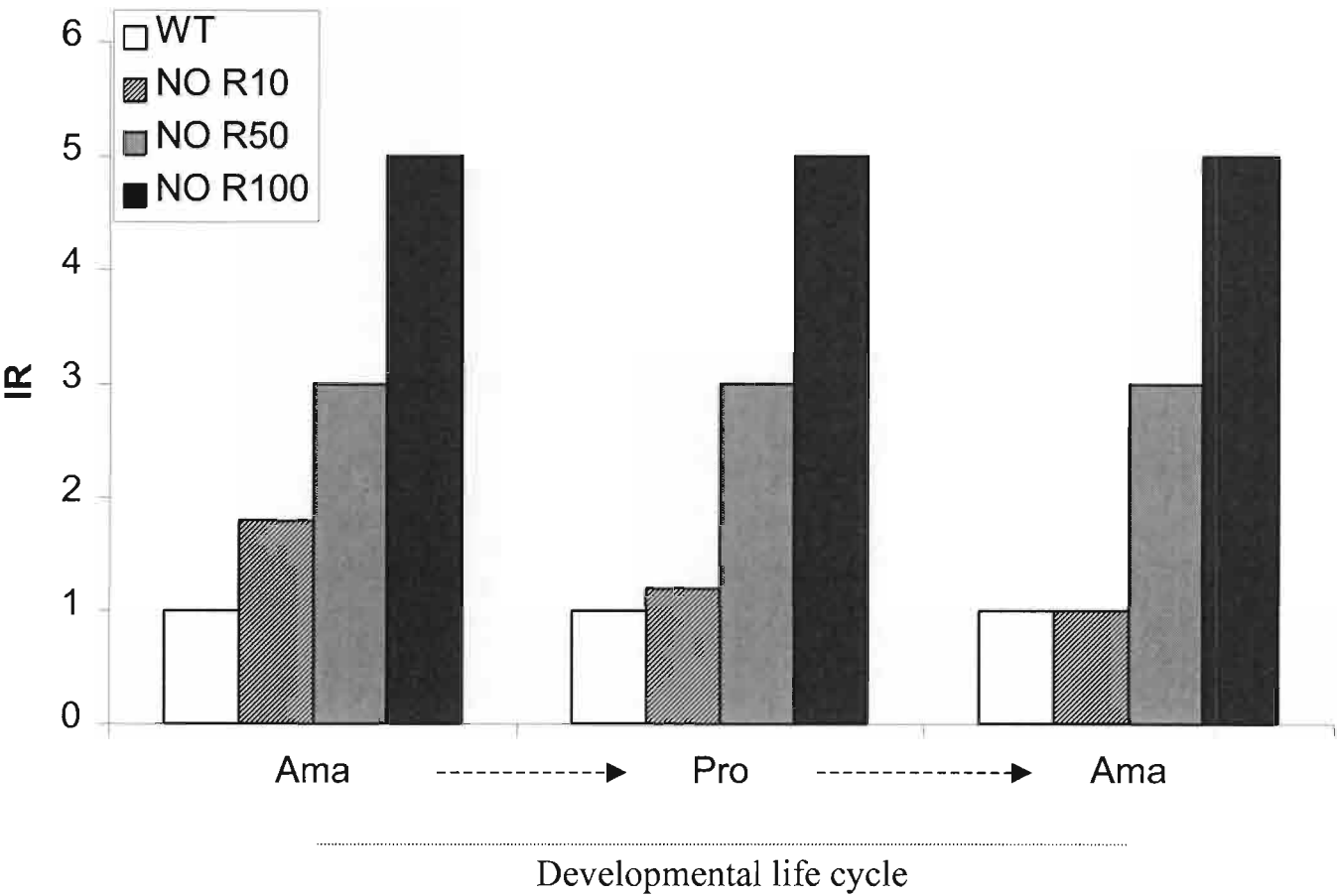


Figure 2

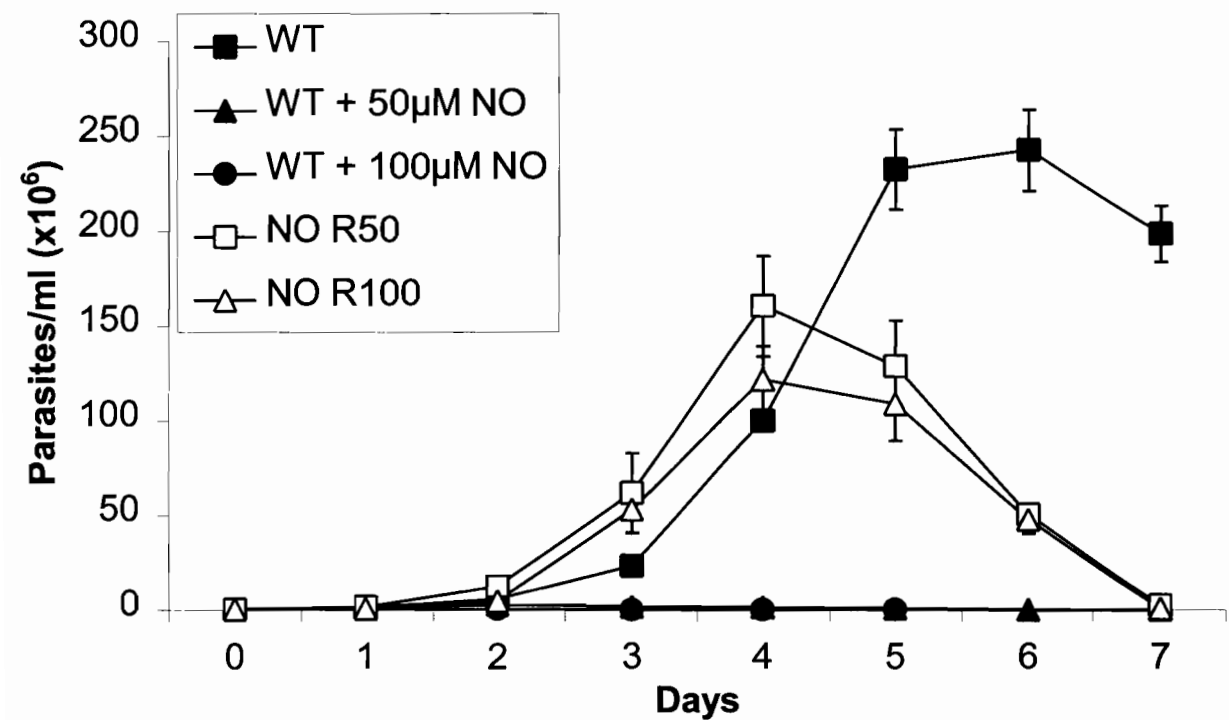


Figure 3

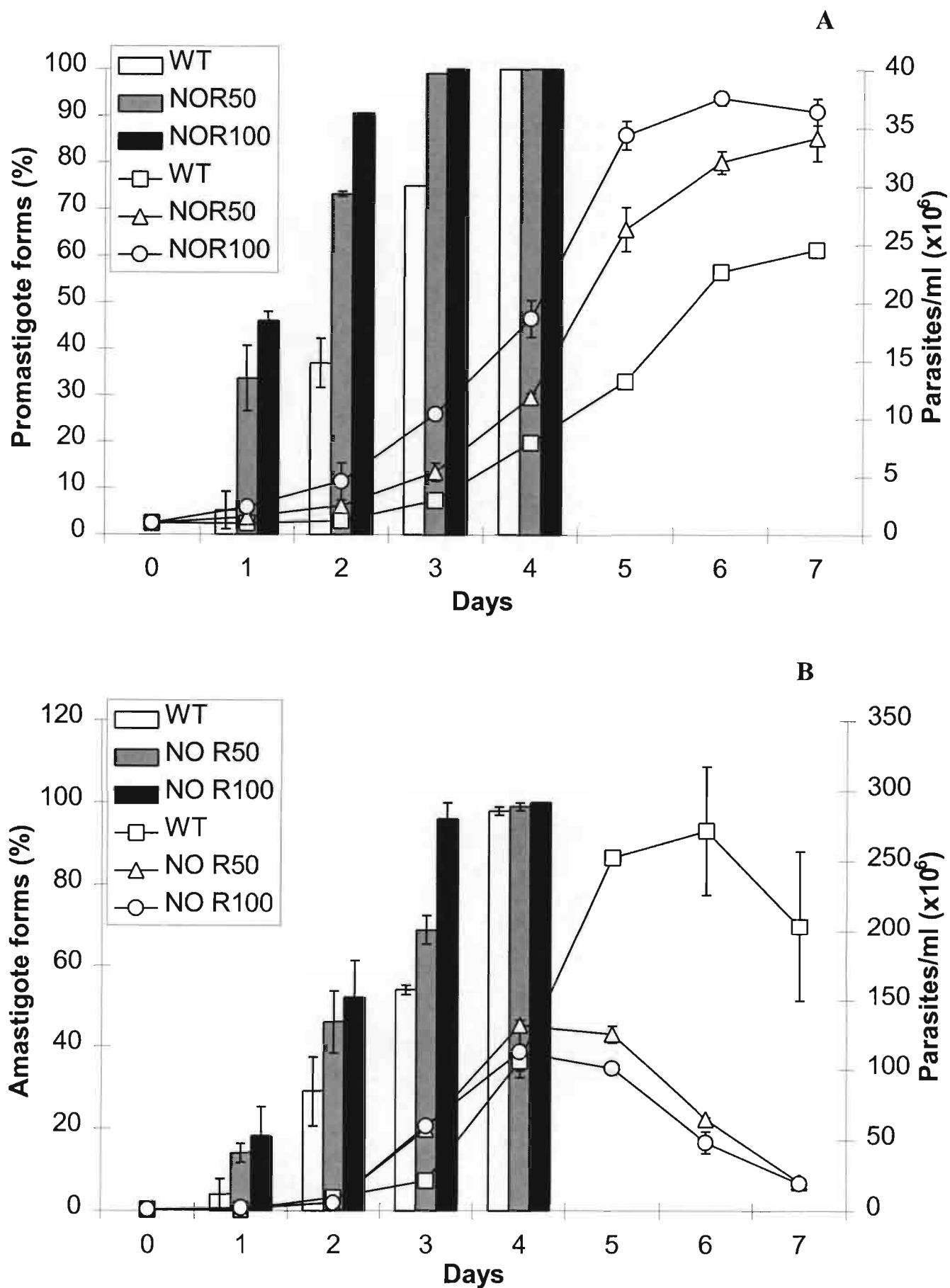


Figure 4

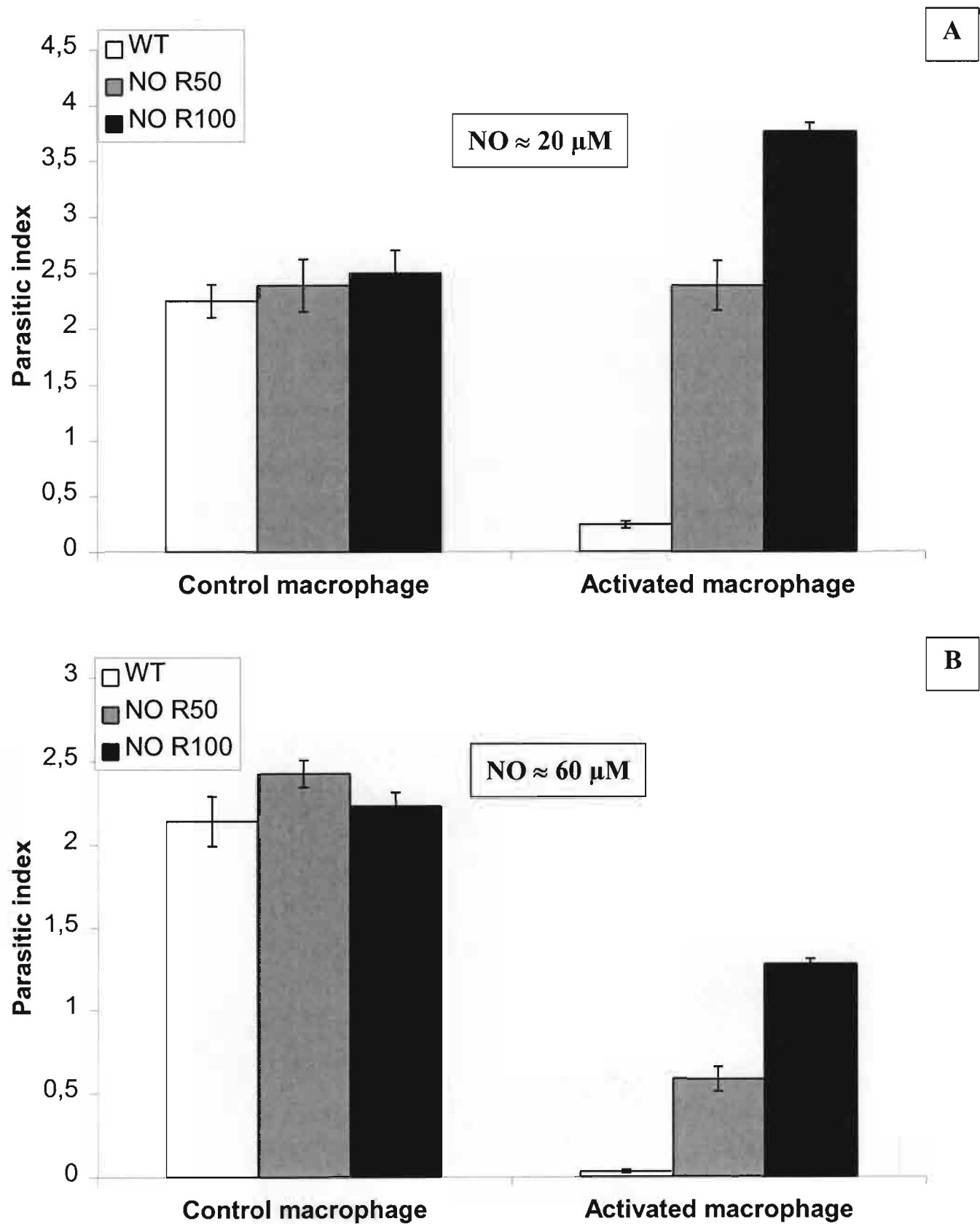


Figure 5

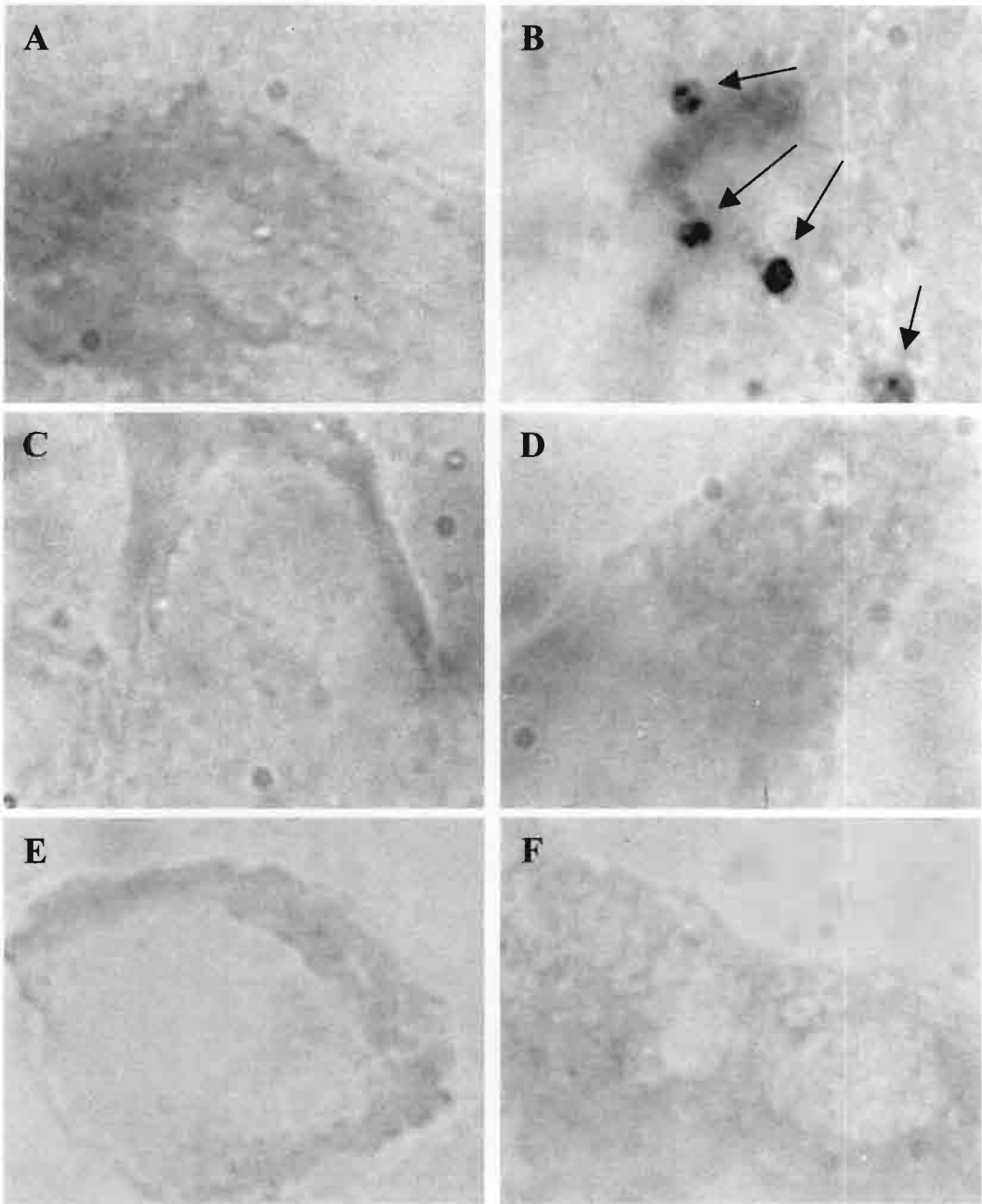
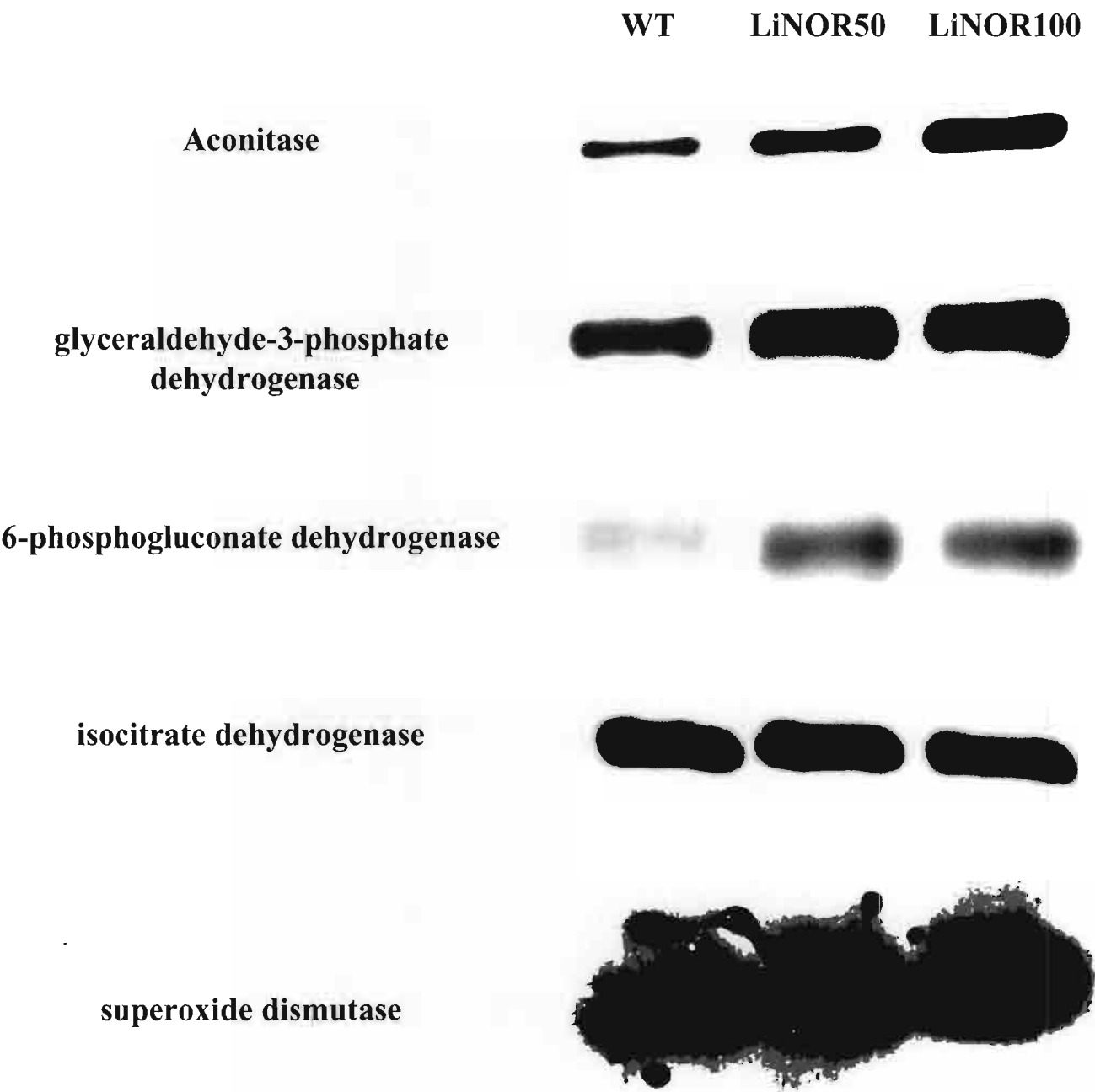


Figure 6



AUTRES RESULTATS

Autres résultats

①

La complémentation du milieu de culture avec les produits de l'aconitase et de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase prévient l'apoptose induite par le NO chez les formes amastigotes de *L. amazonensis*.

L'effet cytotoxique exercé par le NO est très complexe et semble faire intervenir divers mécanismes qui impliquent de nombreuses cibles moléculaires. Dans les premiers modèles expérimentaux étudiés, en particulier les cellules tumorales, le NO s'est avéré induire la perte de fonctions cellulaires comme la respiration mitochondriale (Brown et Borutaite, 2001), les processus énergétiques (Nishikawa *et al.*, 1996), la synthèse d'ADN (Lepoivre *et al.*, 1994). Ces pertes étaient les conséquences de dommages protéiques, incluant l'altération de centres fer-soufre, des réactions de S-nitrosylation ou la nitration des tyrosines, conduisant à l'inactivation d'enzymes (Girard et Potier, 1993), ou de dommages nucléiques avec création de mutations ou de cassures des brins d'ADN (Nguyen *et al.*, 1992). Des travaux récents ont montré que certaines cibles moléculaires mises en évidence chez les eucaryotes supérieurs pouvaient également subir l'effet toxique du NO chez les parasites du genre *Leishmania*. Il s'agit en particulier d'enzymes appartenant au métabolisme énergétique de la glycolyse comme la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Mauel et Ransijn, 1997), ou au métabolisme respiratoire comme l'aconitase (Lemesre *et al.*, 1997), ou encore des systèmes de transport membranaires (Mauel et Ransijn, 1997) ou des protéases à cystéines (Salvati *et al.*, 2001). Nous avons montré que le NO induisait la mort par apoptose des formes amastigotes de *L. amazonensis*, et il semble probable que l'inhibition d'enzymes clés du métabolisme parasitaire pourrait être à l'origine de ce suicide cellulaire. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons complété le milieu de culture des parasites avec les produits de deux enzymes, l'aconitase et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, et suivi le devenir, dans ces milieux, des formes amastigotes de *L. amazonensis* traitées au NO.

Méthodologie :

Culture parasitaire. Les formes amastigotes de *L. amazonensis* (MHOM/BR/LTB-012) sont cultivées dans un milieu monophasique liquide qui leur est propre, le MAA (Milieu pour Amastigotes Axéniques). Le milieu MAA/20 est un milieu 199 (Gibco BRL) modifié avec une solution saline de Hanks, supplémenté avec 20% de sérum de veau fœtal, 0,5% de tryptocaséine de soja (Pasteur Diagnostics, France), 0,01 mM d'acide bathoproïne disulfonique, 3 mM de L-cystéine, 15 mM de D-glucose, 5 mM de L-glutamine, 4 mM de NaHCO₃, 0,023 mM d'hémine bovine, 25 mM d'Hepes pour un pH final de 5,8. Le pH et la température ont été fixés respectivement à 5,8 et 32±1°C (température des lésions cutanées), afin de respecter l'environnement phagolysosomal que le parasite rencontre *in vivo*. Les formes amastigotes sont maintenues en culture continue par repiquage hebdomadaire de 5x10⁵ parasites/ml dans 5 ml de milieu. Les formes amastigotes axéniques apparaissent homogènes, ronds à ovoïdes, sans flagelle émergent et immobiles lors de l'observation au microscope à contraste de phase. En outre, les parasites issus de cultures axéniques sont analogues aux formes intralésionnelles correspondantes, en regard de divers critères : morphologiques, biochimiques, biologiques et immunologiques.

Traitement des parasites avec un donneur de NO : le nitrite de sodium acidifié NaNO₂. Les formes amastigotes de fin de phase exponentielle sont lavées trois fois dans du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) 0,01M ; pH 4,5 en vue d'être traitées. Les parasites sont resuspendus à raison de 10⁷ parasites par ml dans le même tampon, additionné de 3 mM de cis-aconitate plus 3 mM d'α-kétoglutarate (produits de l'aconitase) ou de 5,6 mM phosphoglycérate, 1 mM d'ATP plus 200 µM de NADH (produits de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), 3 mM de fumarate (produit de la succinate déshydrogénase), et le NaNO₂ est ajouté à la concentration de 5 mM. Aux différents temps définis pour la cinétique (2 heures, 4 heures, 8 heures), les parasites traités et non traités au NO sont prélevés en vue d'être étudiés.

Analyse par cytométrie de flux après marquage à la sonde YOPRO-1. Les pourcentages de cellules vivantes, en apoptose ou nécrotiques ont été quantifiés par cytométrie de flux en utilisant la sonde YOPRO-1 qui pénètre spécifiquement les cellules en apoptose (Idziorek *et al.*, 1995). Les amastigotes (10⁶/ml) sont incubés dans la glace avec 10 µM de YOPRO-1 pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite immédiatement analysées avec un cytomètre en

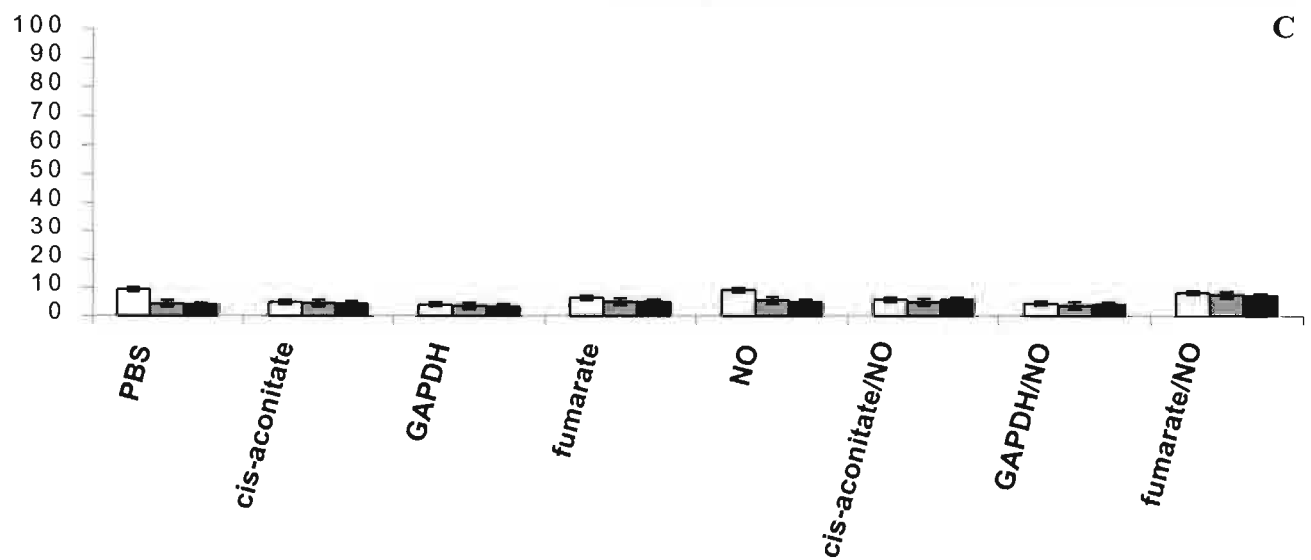
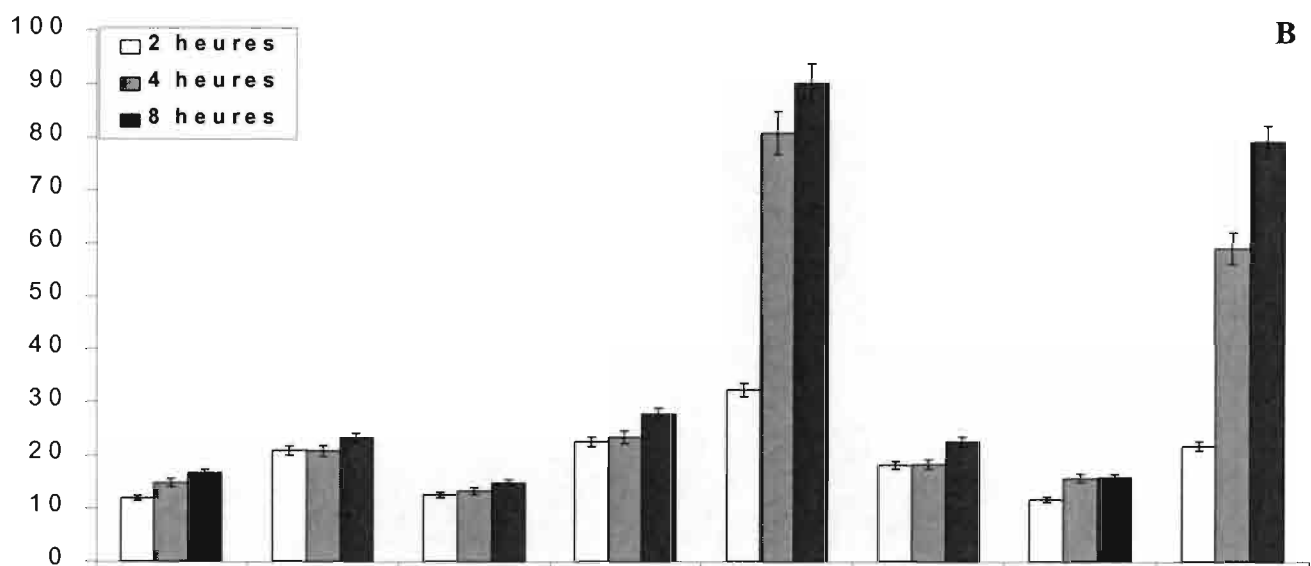
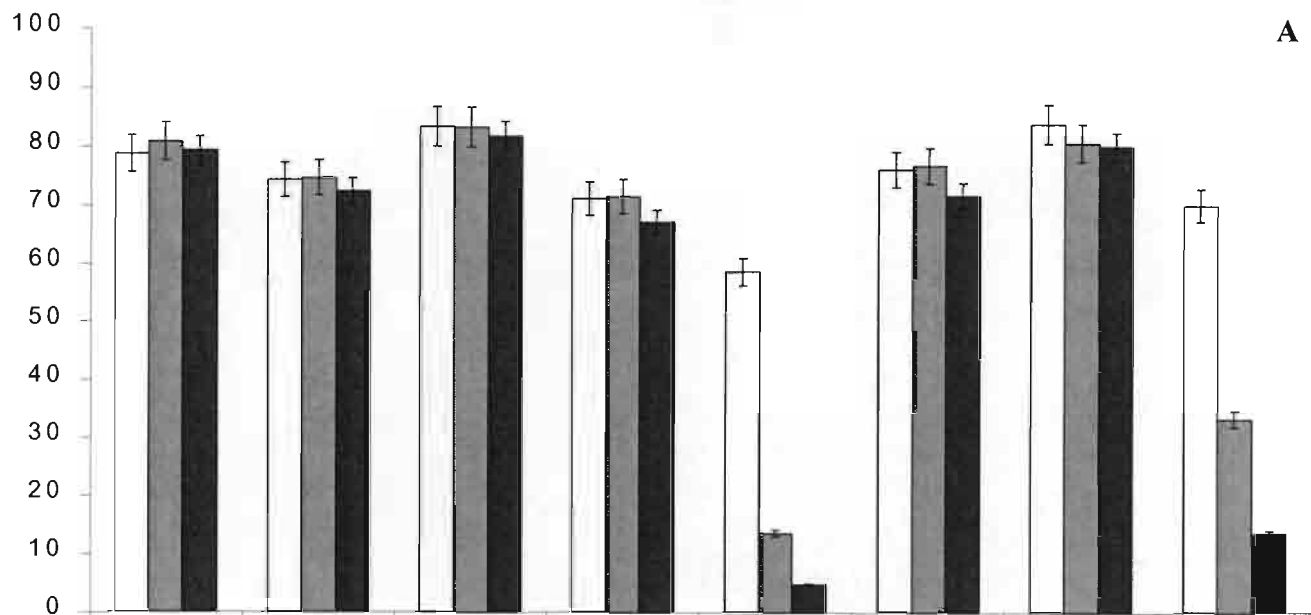
flux de type Facscan™ (Becton Dickinson, Ivry, France) utilisant un laser argon-ion à 488 nm. La fluorescence verte émise et diffractée par les cellules est collectée à travers un filtre dont la bande passante est à 525 ± 10 nm (FL1) et affichée en adoptant une amplification logarithmique.

Résultats - Discussion :

La figure 1 présente les pourcentages de cellules vivantes, apoptotiques et nécrotiques au cours des cinétiques d'incubation des formes amastigotes de *L. amazonensis* avec du NaNO_2 dans des milieux complémentés avec les produits de l'aconitase et de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase. Le premier constat est que la complémentation des milieux n'affecte pas la viabilité des parasites (Figure 1A). L'addition de 3 mM de cis-aconitate plus 3 mM d' α -kétooglutarate inhibe fortement l'apoptose induite par le NO par rapport au témoin. En effet, après 8 heures de contact avec du NO, les amastigotes incubés dans un milieu contenant 3 mM de cis-aconitate plus 3 mM d' α -kétooglutarate sont vivants à plus de 70%, alors que les amastigotes incubés dans le milieu normal sont presque tous morts (Figure 1A). La figure 1B ne montre une augmentation de la population de cellules en apoptose que pour les amastigotes incubés dans le milieu normal. De la même façon, l'addition de 5,6 mM de phosphoglycérate, 1 mM d'ATP plus 200 μM de NADH prévient de manière significative les amastigotes traités au NO d'entrer en apoptose. Les amastigotes incubés dans le milieu complémenté en produits de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase sont vivants à 80% après 8 heures de contact avec le NaNO_2 (Figure 1 A et B). Nous avons utilisé comme contrôle interne la succinate déshydrogénase du cycle de Krebs, qui transforme le succinate en fumarate. La complémentation du milieu avec le produit d'une enzyme métabolique qui n'est pas une cible du NO n'affecte pas l'induction du processus apoptotique par le NO. La figure 1 (A et B) montre un retard du suicide cellulaire mais après 8 heures de contact avec le NO, près de 90% des cellules sont apoptotiques. De manière intéressante, la population de cellules nécrotiques n'excède pas 8% quelle que soit la condition d'incubation, ce qui constitue un argument supplémentaire pour la mort par apoptose induite par le NO chez les leishmanies.

Il est actuellement clairement établi que l'altération des fonctions mitochondriales conduit à une mort cellulaire par apoptose de la cellule considérée (Petit *et al.*, 1995, Halestrap *et al.*, 2000). L'inhibition par le NO d'enzymes mitochondriales comme l'aconitase

du cycle de Krebs chez *Leishmania* (Lemesre *et al.*, 1997) peut donc activer le signal de suicide cellulaire. En plus de ses effets sur le métabolisme mitochondrial, le NO induit également l'ADP-ribosylation d'un certain nombre de protéines intracellulaires. La plus décrite est la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, une enzyme impliquée dans la production d'ATP au cours de la glycolyse (Zhang *et al.*, 1992 ; Mauel et Ransijn, 1997). En inhibant la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, le NO peut créer une déplétion énergétique de la cellule, créant un stress conduisant à l'apoptose. Il semble donc que la mort cellulaire programmée induite par le NO chez *Leishmania* soit la conséquence de l'inhibition d'enzymes clés du métabolisme du parasite.



L'effet leishmanicide de l'antimoine sur les formes amastigotes intramacrophagiques de *L. infantum* est atténué en présence d'inhibiteurs de la NO synthase inductible *in vitro*.

Le traitement classique de la leishmaniose viscérale humaine et canine due à *L. infantum* consiste en l'administration d'antimoniote de méglumine (Glucantime®). L'efficacité de ce médicament contenant de l'antimoine pentavalent repose sur sa conversion par le macrophage en dérivé trivalent qui est hautement toxique pour les amastigotes (Goodwin *et al.*, 1943 ; Goodwin, 1995). Cette hypothèse est confortée par la forte toxicité des dérivés trivalents de l'antimoine sur les deux stades parasites de différentes espèces de leishmanies (Mottram et Coombs, 1985 ; Roberts *et al.*, 1995 ; Sereno et Lemesre, 1997). D'autre part, l'utilisation de principes actifs contre *Leishmania* ne semble pas seulement tuer directement les formes amastigotes intracellulaires mais aussi stimuler le système immunitaire de l'hôte infecté afin de coordonner les effets des molécules microbicides chimique et naturelle (*i.e.* le NO). Des chimiothérapies réussies dans les modèles murin et canin ont d'ailleurs été corrélées avec l'efficacité de l'immunité naturelle (Vouldoukis *et al.*, 1996 ; Das *et al.*, 2001). L'utilisation combinée de dérivés de l'antimoine et d'immunostimulants induisent la production de cytokines activatrices d'une immunité antileishmanienne à médiation cellulaire (Li *et al.*, 1997 ; Murray et Delph-Etienne, 2000). Afin de déterminer le rôle du NO dans l'activité leishmanicide des médicaments antileishmaniens contenant de l'antimoine, nous avons co-traité des macrophages infectés avec des formes amastigotes de *L. infantum* avec soit du Glucantime® soit de l'antimonio tartrate de potassium (antimonié trivalent) et des inhibiteurs de NO synthase inductible. Nous avons ensuite analysé les variations d'indice parasite dans les différentes conditions.

Méthodologie :

Culture parasitaire. Une souche clonée de *Leishmania infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) a été utilisée pour ces travaux. Les formes amastigotes axéniques de *L. infantum* ont été cultivées à 37°C en atmosphère enrichie à 5% de CO₂, par repiquage hebdomadaire dans du MAA/20 (voir la méthodologie dans autres résultats ❶).

Cultures et infections macrophagiques. Des monocytes humains de la lignée cellulaire THP-1 (American Culture Collection, Rockville, MD) sont cultivés dans du milieu RPMI 1640 complet additionné de 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal) décomplémenté, de 100 U/ml de pénicilline et de 100 µg/ml de streptomycine. Après récolte et comptage, le culot de macrophages est resuspendu dans 1 ml de RPMI avant d'être traité avec 20 ng de PMA (phorbol myristate acétate) pour induire la différenciation des monocytes en macrophages. Les cellules sont mises à adhérer dans des chambres de culture Lab-Tek® 16 puits, à raison de 10⁵ macrophages par puits, pendant 48-72 heures à 37°C dans une étuve humide dont l'atmosphère est enrichie à 5% de CO₂. Les puits sont alors lavés 3 fois avec du RPMI pour retirer les cellules non-adhérentes. Les formes amastigotes de *L. infantum* sont lavées et préparées dans le milieu RPMI des macrophages à la concentration de 3×10⁵ formes amastigotes pour 200µl de milieu. Les parasites sont alors mis en contact avec les macrophages dans un rapport 3:1 pendant 2 heures à 37°C pour permettre l'attachement et la pénétration des amastigotes. Après 3 lavages avec du RPMI, les macrophages infectés sont mis en culture avec ou sans les réactifs suivants : Glucantime® (40, 80 et 160 µg/ml), antimonio tartrate de potassium (0,25, 0,5 et 1 µg/ml) en présence ou non de 1 mM de L-NMMA (L-N^G-monométhylarginine, analogue structural de la L-arginine inhibant la NO synthase inductible) ou de nitro-L-arginine (compétiteur antagoniste de la L-arginine inhibant la NO synthase inductible). Après 5 jours de culture en présence des différents principes actifs, les cellules sont fixées au méthanol et colorées au Giemsa. 300 macrophages sont observés au microscope optique à immersion (grossissement 1000×), et le pourcentage de macrophages parasités, ainsi que le nombre d'amastigotes par macrophage, sont déterminés. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'indice parasitaire (I.P.). Le pourcentage d'inhibition, reflétant l'effet leishmanicide, est donné par la formule : %Inhibition = 100-(I.P.×100), où l'I.P. équivaut au rapport du pourcentage de macrophages infectés dans les puits traités multiplié par le nombre d'amastigotes par macrophage sur le pourcentage de macrophages infectés dans les puits témoins multiplié par le nombre d'amastigotes par macrophage (%MΦ_{mf.} puits traité × nb amastigotes/MΦ)/(%MΦ_{mf.} puits témoin × nb amastigotes/MΦ).

Résultats – Discussion :

La figure 1 représente les effets leishmanicides de différentes concentrations de Glucantime® en présence ou non d'inhibiteurs de la NO synthase inducible. L'effet toxique du Glucantime est puissant contre les amastigotes intracellulaires, puisqu'une concentration de 40 µg/ml tue 70% des parasites dans les conditions de l'expérience et que ce pourcentage dépasse 90% dès 80 µg/ml. Les deux inhibiteurs de NO synthase utilisés ont un effet atténuateur de la cytotoxicité du Glucantime®, avec un potentiel plus important pour la nitro-L-arginine que pour la L-NMMA. En effet, l'effet leishmanicide de 40 µg/ml de Glucantime® en présence de L-NMMA baisse à 50% et jusqu'à environ 35% avec la nitro-L-arginine. Cette atténuation est moins prononcée pour les concentrations plus élevées de médicament. L'effet toxique de 80 µg/ml de Glucantime® est atténué de respectivement 8,6% et 14,7% en présence de L-NMMA et de nitro-L-arginine, et celui de 160 µg/ml de respectivement 7% et 11,8%.

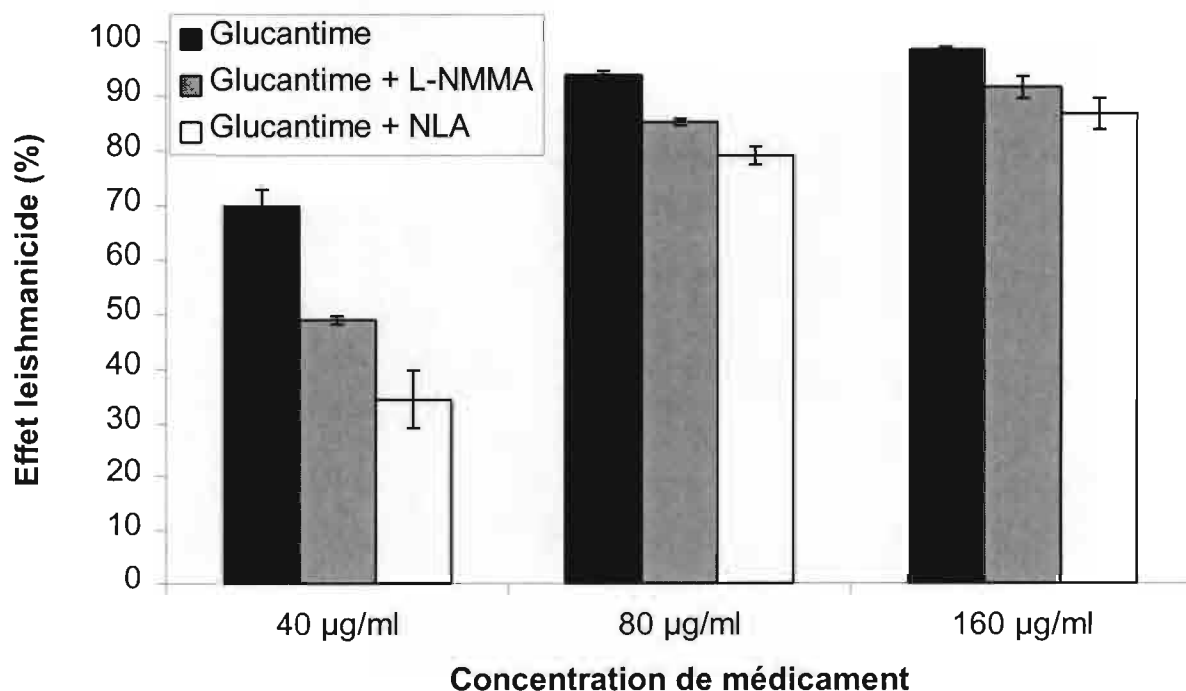


Figure 1 : Effet leishmanicide de 40, 80 et 160 µg/ml de Glucantime® en présence de 1 mM de L-N^G-monométhylarginine (L-NMMA) ou de 1mM de nitro-L-arginine (NLA), sur les formes amastigotes intramacrophagiques de *L. infantum*.

La figure 2 présente de la même façon que la figure 1 les effets d'inhibiteurs de la NO synthase inductible sur la toxicité de l'antimonio tartrate de potassium, un composé contenant de l'antimoine trivalent. De manière intéressante, il semble que les inhibiteurs de NO synthase soient bien moins efficaces lorsque la drogue antileishmanienne est déjà sous forme de dérivés trivalents. En effet, l'atténuation de l'effet leishmanicide de l'antimonio tartrate de potassium n'est pas significativement différente du témoin en présence de L-NMMA ou de nitro-L-arginine. Seule la nitro-L-arginine montre un léger effet atténuateur sur l'effet toxique de 0,25 µg/ml d'antimoine trivalent.

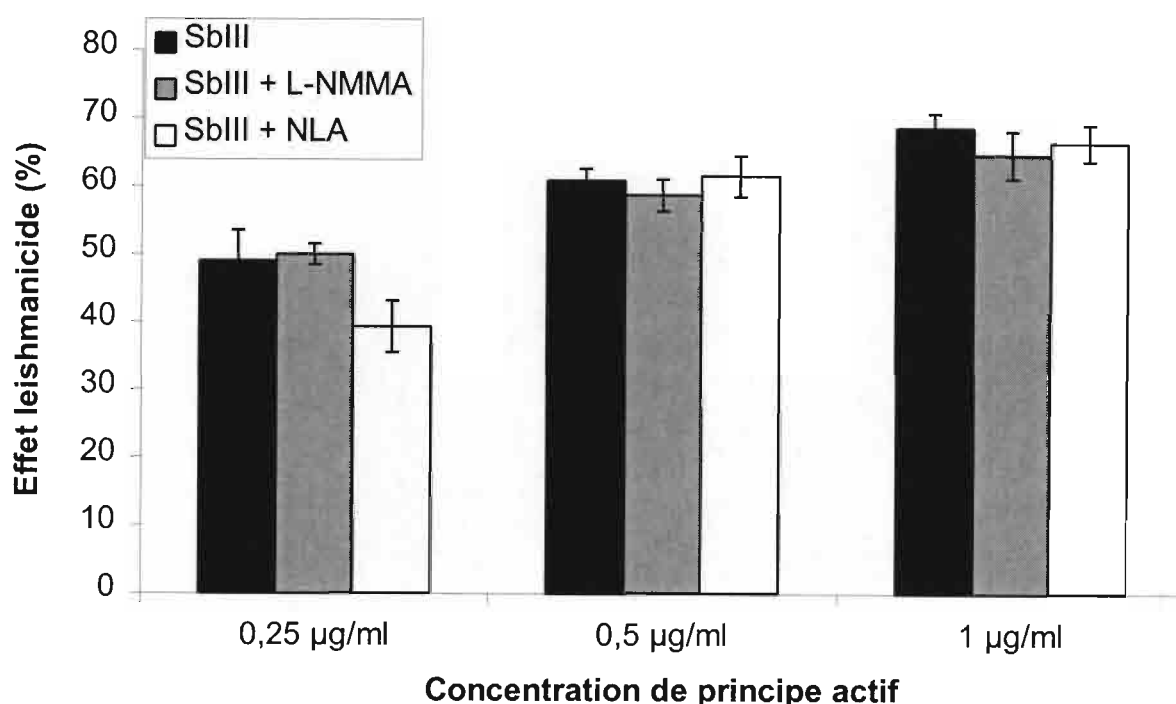


Figure 2 : Effet leishmanicide de 0,25, 0,5 et 1 µg/ml d'antimonio tartrate de potassium (antimonié trivalent) en présence de 1 mM de L-N^G-monométhylarginine (L-NMMA) ou de 1mM de nitro-L-arginine (NLA), sur les formes amastigotes intramacrophagiques de *L. infantum*.

Les résultats précédents suggèrent fortement une implication de la machinerie microbicide naturelle (*i.e.* voie du NO) dans la toxicité du principal médicament antileishmanien qu'est le Gucantime®. De manière intéressante, il semble que se soit la conversion des dérivés pentavalents de l'antimoine en dérivés trivalents qui entraîne l'activation de la NO synthase inductible du macrophage infecté, ce qui pourrait expliquer en partie les résultats observés lors de chimiothérapies réussies dans les modèles animaux (Vouldoukis *et al.*, 1996 ; Das *et al.*, 2001). Ceci est encore renforcé par le fait que les

inhibiteurs de NO synthase utilisée dans les expériences précédentes sont plus efficaces lorsque c'est le médicament qui est employé que lorsqu'il s'agit de sa forme toxique déjà réduite. Afin de renforcer cette hypothèse, il serait intéressant de tester le pouvoir du Glucantime® sur la transcription du gène de la NO synthase inductible dans des expériences *in vitro*.

DISCUSSION
CONCLUSION-PERSPECTIVES

Discussion

Les difficultés, toujours actuelles, rencontrées dans le traitement des leishmanioses ainsi que la diversité et la complexité des mécanismes de suppression ou d'inactivation élaborés par les leishmanies pour déjouer le système immunitaire de l'hôte visant à contrôler l'infection, nous ont conduit à rechercher comment agissaient les deux principales molécules leishmanicides que sont l'antimoine et le monoxyde d'azote (NO). En effet, le mode d'action des composés microbicides peut influencer l'efficacité du traitement en favorisant notamment l'émergence de formes résistantes aux médicaments ou, au contraire, en permettant l'établissement d'une immunité protectrice. Il nous a donc semblé intéressant : (i) d'analyser les facteurs qui pouvaient moduler la sensibilité/résistance des leishmanies aux médicaments antiparasitaires, et (ii) de déterminer le(s) mécanisme(s) cellulaire(s) et les cibles moléculaires impliqués dans la mort du stade médicalement important (forme amastigote présente chez l'hôte infecté). La sélection *in vitro* de formes amastigotes chimiorésistantes nous a également permis : (i) de mettre en évidence l'existence d'une résistance croisée aux composés leishmanicides chimique (antimoine) et naturel (NO) et (ii) de caractériser, pour la première fois, le phénotype de parasites résistants au NO.

I – Apport des nouveaux modèles expérimentaux et des outils modernes de la biochimie dans l'analyse des paramètres biologiques qui régissent les interactions entre les leishmanies et leurs hôtes.

Le cycle évolutif des protozoaires du genre *Leishmania* se partage classiquement entre un hôte vecteur invertébré, le phlébotome, et de nombreux hôtes vertébrés mammifères dont l'homme. Le cycle de développement est digénétique et alterne 2 formes parasitaires principales : une forme promastigote flagellée extracellulaire mobile rencontrée principalement chez l'insecte vecteur et qui va rapidement infecter les phagocytes mononucléés des hôtes vertébrés, et une forme amastigote intracellulaire conservant un flagelle non émergent et vivant exclusivement à l'intérieur des phagolysosomes des macrophages parasités de l'hôte vertébré.

Les recherches fondamentales et appliquées sur les leishmanioses passent traditionnellement par la culture des formes promastigotes en conditions axéniques. L'obtention des formes amastigotes, quant à elle, que ce soit à partir de culture de macrophages ou de tissus prélevés sur des animaux expérimentalement infectés, nécessite des procédés d'isolement longs, fastidieux et peu productifs. En outre, les parasites obtenus sont toujours contaminés par des molécules dérivées des macrophages ou des tissus de l'hôte, et peuvent être partiellement dégradés pendant les manipulations conduisant à leur isolement. Enfin, les formes amastigotes ainsi isolées sont incapables de se multiplier et ne survivent pas plus de deux à trois jours. En 1984, Pan décrit pour la première fois une méthode de culture continue des formes amastigotes de *L. pifanoi* en conditions axéniques. Ces formes de culture semblent identiques aux formes isolées de tissus, selon des critères antigéniques, biochimiques et moléculaires. Plus récemment, Al-Bashir *et al.* en 1992 adaptent *L. donovani* et *L. major* en culture axénique et montrent que leurs capacités d'infection sont similaires à leurs homologues vis-à-vis de souris. Un modèle original, permettant d'adapter en culture axénique, les formes amastigotes de *L. mexicana* isolées de lésions de souris expérimentalement infectées, proposé par Bates *et al.* (1992) permet de produire des formes amastigotes qui sont morphologiquement, biochimiquement et biologiquement similaires aux formes amastigotes isolées de lésions. Tous ces procédés de culture font intervenir des conditions de milieux de culture, de température et de pH spécifiques. Le développement au laboratoire de la culture axénique *in vitro* des formes amastigotes des principales espèces de leishmanies a conduit à mieux cerner les différents paramètres de la culture *in vitro* et à modéliser le cycle évolutif des leishmanies en optimisant la reproductibilité des conditions expérimentales (Lemesre *et al.*, 1994 ; Lemesre J.-L., Brevet N° 6458581). Ce modèle original de cultures axéniques et asériques, dans des milieux complètement définis ayant la particularité de ne contenir aucune macromolécule en tant que substituts sérique et cellulaire, nous a permis de caractériser le processus cellulaire et les molécules régissant le type de mort induit par le NO et par les médicaments antileishmaniens, directement sur le stade parasitaire médicalement important, qui présente normalement une position intracellulaire stricte. En reproduisant *in vitro* les principales séquences du cycle de développement parasitaire, nous avons également déterminé certains paramètres biologiques qui influencent la transmission des parasites chimiorésistants.

Les progrès importants des techniques d'investigation en biologie se sont également avérés précieux tout au long de cette étude. La cytométrie de flux nous a, par exemple, permis de multiplier les expériences au cours des cinétiques de croissance ou d'étudier la croissance

des parasites au cours des phases de différenciation, dans des conditions simples et rapides, et ou l'expérimentateur n'induit pas de biais comme cela peut être le cas lors de comptages sur hématimètre de Thoma. L'apoptose est un processus cellulaire qui commence à être bien cerné dans les modèles eucaryotes supérieurs, avec la mise au point de nombreuses techniques permettant d'en étudier un grand nombre de paramètres. L'extrapolation ou l'adaptation de certaines de ces méthodes à des parasites, eucaryotes considérés comme inférieurs tels que *Leishmania*, nous a permis d'appréhender pour la première fois la mort cellulaire des leishmanies induite par des xénobiotiques. Le marquage par la technique du TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling) des extrémités des brins d'ADN générés lors de la fragmentation apoptotique de l'ADN génomique ou encore l'utilisation de la sonde YOPRO-1, sonde fluorescente qui pénètre les cellules lors du réarrangement des phospholipides membranaires, spécifique de cellules en apoptose (Idzioreck *et al.*, 1995), ont été des arguments forts pour démontrer un phénomène de mort cellulaire programmée chez *Leishmania*. L'optimisation des techniques de dosage, l'apparition de nouveaux donneurs de NO, auront été déterminant pour affirmer la place prépondérante du NO en tant qu'effecteur final de l'immunité contre les leishmanies.

L'inconvénient majeur de cette technologie de pointe est qu'elle ne met en évidence que des phénomènes se produisant *in vitro*. Néanmoins, les expériences que nous avons menées grâce à ces nouveaux outils, en dépit de leur aspect réductionniste, nous auront permis de lever le voile sur un certain nombre d'aspects importants de la relation entre la leishmanie et son hôte.

II – Facteurs modulant la chimiorésistance chez *Leishmania*.

Les médicaments anti-leishmaniens de première intention dans le traitement des leishmanioses, renferment comme principe actif de l'antimoine sous sa forme pentavalente (SBV). Celui-ci est réduit par la cellule hôte en antimoine trivalent (SbIII) qui est responsable de l'activité leishmanicide (Goodwin, 1995 ; Sereno et Lemesre, 1997 ; Sereno *et al.*, 1998 ; Shaked-Mishan *et al.*, 2001). La toxicité des médicaments classiquement utilisés pour traiter l'infection leishmanienne est bien connue et des cas de non-réponse au traitement ont été décrits (Wali *et al.*, 1992 ; Sundar *et al.*, 1994). Néanmoins, nous avons montré que l'amphotéricine B et la pentamidine étaient toujours actives sur les parasites résistants à l'antimoine, et qui plus est que les parasites résistants sont plus sensibles à ces drogues que les

parasites sauvages. Ces résultats rassurants suggèrent que ces médicaments représentent de bons candidats pour traiter les cas réfractaires aux dérivés stibiés. Cependant, l'induction du processus biochimique de résistance aux dérivés de l'antimoine ou à d'autres drogues comme la pentamidine, de même que les paramètres qui régissent cette chimiorésistance, sont encore mal connus. En effet, de nombreux facteurs intrinsèques ou extrinsèques peuvent moduler l'acquisition ou la perte d'un caractère chimiorésistant chez les leishmanies. Le premier d'entre eux est certainement le degré de résistance lui-même, qui va induire la stabilité ou non du phénotype de chimiorésistance. L'aptitude à résister à d'autres composés microbicides va être un avantage à la transmission d'un phénotype chimiorésistant. Par contre, la compétition entre souches sauvages et résistantes pour l'exploitation d'un environnement, peut devenir un handicap au développement de parasites chimiorésistants. Enfin, la réalisation du cycle de développement parasitaire, qui va définir le caractère virulent des parasites, constitue une régulation, positive ou négative, de l'émergence de leishmanies chimiorésistantes. La vie et la mort des leishmanies étant d'ailleurs étroitement liées au bon déroulement de leur cycle biologique.

Un facteur important qui semble influencer l'établissement de la chimiorésistance est l'acquisition même d'un degré de résistance suffisant. En effet, la sélection *in vitro* de formes promastigotes ou amastigotes chimiorésistantes n'est possible que pour des concentrations assez élevées de la drogue utilisée. Des travaux réalisés au laboratoire montrent clairement que la stabilité d'un phénotype chimiorésistant, lors de cultures à long terme en absence de pression médicamenteuse, est dépendante du degré de chimiorésistance induit. Des parasites ayant un faible niveau de résistance le perdent très rapidement au cours du temps, pour revenir à un phénotype sauvage, alors que des parasites fortement chimiorésistants vont conserver leur phénotype (Serenio et Lemesre, 1997). Néanmoins, le développement d'un nouveau caractère biologique, en l'occurrence l'aptitude à résister aux dérivés de l'antimoine, a un coût pour le parasite, et de nombreux travaux montrent que l'acquisition d'une chimiorésistance chez les leishmanies est associée à un dérèglement de leur métabolisme. Ces changements peuvent concerner la structure membranaire du parasite (Chiquero *et al.*, 1998 ; Gazola *et al.*, 2001), des activités enzymatiques (Garcia *et al.*, 2000), la synthèse protéique (Papadopoulou *et al.*, 1994) ; Basselin *et al.*, 1997), ou encore le statut énergétique de la cellule (Singh et Lee, 1999). Dans cette étude, nous avons montré que des amastigotes résistants aux antimoniés trivalents étaient plus sensibles à la pentamidine que le clone parental sauvage. En outre, comme l'avaient suggéré Berman *et al.* (1987), le macrophage semble jouer un rôle soit en métabolisant, soit en concentrant la pentamidine, de manière

comparable à la réduction des antimonies pentavalents en antimonies trivalents (Goodwin, 1995 ; Sereno et Lemesre, 1997 ; Sereno *et al.*, 1998 ; Shaked-Mishan *et al.*, 2001). D'autre part, le fait que les parasites chimiorésistants soient sensibles à d'autres drogues indique que les P-glycoprotéines, dont le membre PGPA semblait impliqué dans la résistance à l'antimoine trivalent (Callahan *et al.*, 1994) et qui sont fortement liées à la résistance aux drogues chez *Leishmania* (Ouellette et Borst, 1991 ; Henderson *et al.*, 1992 ; Gamarro *et al.*, 1994 ; Ullman, 1995 ; Legare *et al.*, 2001), n'interviennent pas ou peu chez nos amastigotes chimiorésistants. Par contre, une augmentation du substrat de la drogue, le trypanothion, pourrait constituer un nouveau mode de chimiorésistance (Mukhopadhyay *et al.*, 1996) ; le métabolisme des thiols semblant d'ailleurs jouer un rôle dans la résistance aux antimonies chez *Leishmania* (Arana *et al.*, 1998). L'outil que représentent les formes amastigotes de *L. infantum* chimiorésistantes aux antimonies trivalents offre des possibilités intéressantes pour appréhender les bases moléculaires permettant aux leishmanies de développer un fort niveau de résistance.

L'acquisition par les leishmanies d'une chimiorésistance pour un principe actif donné, peut s'accompagner d'une résistance croisée à d'autres médicaments ou à d'autres composés cytotoxiques. Des formes amastigotes de *L. mexicana* sont, par exemple, résistantes à la primaquine, à l'acéturate de diminazène et à l'arsénite de sodium (Sereno *et al.*, 1997). Cette forme de résistance multiple pourrait permettre aux parasites chimiorésistants de survivre à différents traitements et de pouvoir ainsi se transmettre. Nous montrons dans cette étude que des formes amastigotes résistantes à l'antimoine trivalent sont également résistantes au NO. Ces parasites vont donc non seulement résister au traitement chimiothérapeutique, mais aussi à l'action du système immunitaire de l'hôte infecté. Ce type de parasite a acquis un avantage considérable pour infecter de nouveaux hôtes. Ils constituent également un excellent modèle pour étudier les mécanismes biochimiques communs impliqués dans la résistance à ces deux molécules microbicides.

Un autre point important pouvant moduler la chimiorésistance des leishmanies est le comportement des mutants lors de et surtout après l'acquisition de leur nouveau phénotype. En effet, chez l'hôte infecté, en cas d'échec au traitement ou d'infections multiples (Pratlong *et al.*, 1989 ; Guzman *et al.*, 1994), des souches de parasites avec différents degrés de chimiorésistance vont devoir coexister. Partant de ce constat, nous avons cherché à déterminer s'il existait des interactions compétitives entre le parent sauvage et les clones chimiorésistants qui en étaient issus. Deux études, l'une menée sur des formes promastigotes de *L. amazonensis* résistantes à la pentamidine, l'autre menée sur des formes amastigotes axéniques

de *L. infantum* résistantes à l'antimoine, ont démontré que la réalisation du cycle de développement parasitaire était régulée par des interactions entre souches. Deux observations directes peuvent être faites aux vues des résultats obtenus avec les souches de *L. amazonensis* sensible et résistantes à la pentamidine. Premièrement, la croissance d'un mélange de souches sensible et résistante est réduite par rapport à la croissance de la souche correspondante seule. Deuxièmement, le potentiel de transmission des souches chimiorésistantes est réduit par rapport à la souche sauvage. Peu d'informations existent sur la compétition entre souches de parasites résistants et sauvages. Une étude réalisée chez le moustique montre cependant que des mâles résistants à un insecticide sont désavantagés lorsqu'ils entrent en compétition avec des mâles sensibles pour l'accouplement à une femelle (Berticat *et al.*, 2002). Cette idée est comparable à la transmissibilité réduite des promastigotes résistants à la pentamidine. En fait, si l'émergence d'une chimiorésistance paraît être un avantage pour le parasite lui-même, elle a un coût conséquent sur son devenir. Selon une approche similaire, les formes amastigotes axéniques de *L. infantum* résistantes à l'antimoine nous ont permis de déterminer la transmission du caractère chimiorésistant lors de mélange avec le clone sauvage dans différentes proportions (50/50, 90/10, 10/90) après 1 ou 2 cycles de développement *in vitro*. Nous avons montré que les mutants qui étaient 12, 28, 35 et 44 fois plus résistants que le clone parental, conservaient partiellement leur phénotype lors de culture à long terme en absence de pression médicamenteuse ainsi qu'au cours du cycle de développement parasitaire *in vitro*. Cependant, lors des mélanges de mutants chimiorésistants avec le clone sauvage, les mutants n'étaient plus détectables dans la population de parasites sélectionnés après 1 ou 2 cycles de développement, quel que soit le ratio du mélange initial. Ces résultats peuvent s'expliquer par une capacité réduite des mutants chimiorésistants à réaliser les étapes de différenciation au cours du cycle de développement parasitaire. Cette inhibition peut en partie être imputée à l'amplification de gène impliqués dans la chimiorésistance (Grondin *et al.*, 1997 ; Haimeur et Ouellette, 1998 ; Singh *et al.*, 2001), qui, s'ils n'ont pas de conséquence directe sur la division des parasites peuvent avoir un effet retardateur sur la transcription de l'ensemble des gènes nécessaires au processus de différenciation. Il ne faut cependant pas négliger la persistance de parasites chimiorésistants chez l'hôte infecté, qui en perdant leur caractère chimiorésistant avec le temps, pourraient retrouver leur potentiel virulent et aggraver les processus physiopathologiques.

Les expériences d'interactions entre souches sensibles et résistantes aux médicaments antileishmaniens mettent en évidence un point capital de la modulation de la chimiorésistance qui est la perturbation du cycle de développement parasitaire. En effet, nos résultats montrent

que les formes amastigotes de *L. infantum* résistantes à l'antimoine sont tout à fait capables de réaliser leur cycle biologique et qu'elles sont aussi virulentes que des parasites sauvages envers des macrophages humains ou murins *ex vivo*. Ces souches chimiorésistantes sont donc parfaitement transmissibles et pourraient aisément être disséminées dans la nature. Par contre, lors de l'étude des propriétés biologiques des différents clones de *L. amazonensis* résistants à la pentamidine, nous avons observé que leur virulence *ex vivo* à l'encontre de macrophages péritonéaux de souris et *in vivo* dans un modèle d'infection expérimentale murin est fortement diminuée en fonction du degré de chimiorésistance. L'existence de souches de *Leishmania* atténuées ou même avirulentes a déjà été décrite dans différentes expériences ; lors de la culture à long terme (Wilson *et al.*, 1989 ; Liu et Chang, 1992 ; Sanyal *et al.*, 1994 ; Heard *et al.*, 1996), lors de traitements chimiques avec la tunicamycine ou la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (Nolan et Farrel, 1985 ; MacGurn *et al.*, 1990 ; Wilson et Hardin, 1990), ou par des manipulations génétiques (Titus *et al.*, 1995 ; Dumas *et al.*, 1997 ; Alexander *et al.*, 1998). L'infectivité des formes promastigotes de *Leishmania* et l'établissement durable du parasitisme dépendent du bon déroulement des différentes étapes du cycle de développement parasitaire : attachement aux macrophages par des interactions récepteur-ligand, phagocytose, différenciation, survie et prolifération des formes amastigotes. Nous montrons que la perte de virulence des parasites chimiorésistants est corrélée à leur incapacité à survivre dans les macrophages. Lorsque les clones résistants à la pentamidine réalisent leur cycle biologique *in vitro*, les formes amastigotes qui en résultent sont viables mais incapables de se diviser. Ce blocage du cycle cellulaire induit un stress tel que les formes amastigotes vont engager un processus de suicide cellulaire ayant certaines caractéristiques phénotypiques de l'apoptose des eucaryotes supérieurs. L'acquisition d'une chimiorésistance entraîne un dysfonctionnement au niveau des formes promastigotes qui se traduit par un blocage en phase de non-division suivi par la mort du stade parasitaire suivant, régulant négativement la transmission du caractère chimiorésistant et ainsi la dissémination de telles souches dans la nature.

Enfin, nous montrons que l'antimoine tue les leishmanies en induisant un processus biochimique présentant des similitudes avec la mort cellulaire par apoptose. L'acquisition et la modulation de la transmission d'une chimiorésistance au principal médicament antileishmanien pourrait dépendre, en partie, de la répression des mécanismes moléculaires impliqués dans la mort cellulaire programmée des leishmanies.

III – Effet leishmanicide et mort cellulaire programmée (apoptose) : mécanismes cellulaires, cibles moléculaires et rôle dans les interactions hôte/parasite.

La nécrose et l'apoptose représentent pour une cellule deux manières de mourir qui couvrent un large spectre de changements morphologiques et physiologiques (Steller, 1995), et le NO ainsi que des molécules chimiques sont capable d'induire ces deux grands types de mort cellulaire (Melino *et al.*, 1997 ; Tolomeo *et al.*, 1998 ; Kim *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2000 ; Sato *et al.*, 2000 ; Trudeau *et al.*, 2001). En outre, de nombreux travaux ont été consacrés à l'analyse des conséquences de l'exposition de cellules eucaryotes au NO sur leur mort cellulaire programmée et ont rapporté des résultats divergents, le NO activant les voies conduisant à l'entrée des cellules en apoptose ou au contraire les protégeant de l'apoptose spontanée ou induite (Dimmeler et Zeiher, 1997 ; Nicotera *et al.*, 1997 ; Laskin et Mariano, 1998 ; Brüne *et al.*, 1998a, 1998b). La nécrose apparaît comme un processus cellulaire dénué de régulation, passif, ne nécessitant aucune synthèse protéique ni d'acides nucléiques et déclenché par des stimuli non-physiologiques, incluant les agents chimiothérapeutiques. Par contre, l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus actif hautement régulé qui requiert de l'énergie pour synthétiser les protéines effectrices et s'exécuter (Hengartner, 2000).

Bien connue chez les organismes pluricellulaires, l'existence d'un processus de mort cellulaire programmée « ancestral » chez les eucaryotes unicellulaires a été mis en évidence ces dernières années (Cornillon *et al.*, 1994 ; Ameisen *et al.*, 1995 ; Billaut-Mulot *et al.*, 1996 ; Picot *et al.*, 1997 ; Welburn *et al.*, 1998, 1999 ; DosReis et Barcinski, 2001). Ainsi, l'apoptose chez *Leishmania* a été décrite tout d'abord chez des formes promastigotes ayant subi un choc thermique (Moreira *et al.*, 1996), soumis au stress oxydatif (Das *et al.*, 2001 ; Mukherjee *et al.*, 2002) ou par des agents toxiques (Mittra *et al.*, 2000 ; Arnoult *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2002 ; Zangger *et al.*, 2002). En utilisant différentes techniques de référence incluant la mise en évidence de la fragmentation d'ADN en gel d'agarose, ainsi que des marquages *in situ* et fluorescents par la technique du TUNEL et avec la sonde YOPRO-1 (Idzioreck *et al.*, 1995), nous démontrons, pour la première fois, que les deux molécules leishmanicides les plus importantes que sont le NO et l'antimoine, induisent chez les formes amastigotes de *Leishmania*, c'est à dire celles qui sont réellement en contact avec ces composés toxiques dans la nature, une mort cellulaire ayant les caractéristiques phénotypiques de l'apoptose. Ce phénomène a été démontré aussi bien sur les formes amastigotes axéniques que sur les formes amastigotes intracellulaires dans des expériences d'infections

macrophagiques. Grâce à la cytométrie de flux, nous avons, dans un 2^{ème} temps, commencé à caractériser la voie métabolique conduisant à la mort cellulaire puisque les principaux inhibiteurs de caspases (protéases de l'apoptose) se sont avérés inefficaces à bloquer l'apoptose induite tant par l'antimoine que par le NO. Bien que les inhibiteurs de caspases n'aient pas été testés dans leur ensemble, les inhibiteurs que nous avons utilisés sont reconnus pour bloquer les caspases-clés intervenant directement et indirectement dans l'activation des endonucléases dans la majorité des voies métaboliques de l'apoptose. Ces résultats concordent avec les observations qui avaient été faites sur *Trypanosoma brucei brucei* exposé aux dérivés actifs de l'oxygène (Ridgley *et al.*, 1999). En outre une mort cellulaire de phénotype apoptotique indépendante de l'activation de caspases a été démontré chez le protiste *Dicystelium discoideum* (Cornillon *et al.*, 1994 ; Olie *et al.*, 1998), un microorganisme proche des protozoaires sur l'échelle de l'évolution. Des travaux récents montrent en outre que l'antimonio tartrate de potassium (dérivé trivalent de l'antimoine) induisait aussi une mort apoptotique indépendante des caspases chez des cellules leucémiques humaines (Lecureur *et al.*, 2002). Cependant, une différence existe entre les processus apoptotiques induits par le NO et l'antimoine. En effet, tandis que des inhibiteurs spécifiques du protéasome ou de calpaïnes étaient capables de bloquer le processus apoptotique induit par le NO, ils se sont révélés sans effet sur le processus de mort cellulaire programmée enclenché par les leishmanies exposées aux antimoniés trivalents. Ce dernier résultat, pour l'antimoine, reste en adéquation avec l'étude de Ridgley *et al.* (1999) sur les Trypanosomes africains. Des études récentes montrent qu'une mort cellulaire ayant des caractéristiques de l'apoptose peut survenir en l'absence de l'activation des caspases, par translocation du facteur d'induction d'apoptose (AIF, Apoptosis-Inducing Factor), et cela même chez des microorganismes unicellulaires (Pardo *et al.*, 2001 ; Arnoult *et al.*, 2001). Récemment, Joseph *et al.* (2002) ont montré que des médicaments pouvaient induire l'apoptose de cellules cancéreuses par translocation de la protéine AIF de la mitochondrie vers le noyau de la cellule, sans activation des caspases. De plus, l'arsénite est capable d'induire l'apoptose par une action directe sur le pore de perméabilité mitochondrial (Larochette *et al.*, 1999), et les antimoniés ont des propriétés chimiques communes avec les arséniés. Nous proposons que ce type de phénomène puisse exister chez les formes amastigotes de *L. infantum* traitées avec des antimoniés trivalents. La mort cellulaire programmée induite par le NO présente, quant à elle, une régulation atypique faisant intervenir le complexe multicatalytique du protéasome. Considérant les multiples facettes que peut revêtir l'apoptose, des arguments sont maintenant en faveur de l'implication de protéases différentes des caspases, comme les cathepsines, les

calpaïnes ou les granzymes, ainsi que celles du protéasome dans l'induction et la régulation de la mort cellulaire. De plus, des études récentes ont mis en évidence l'existence chez deux espèces de *Leishmania*, d'un protéasome opérationnel et actif, qui présente de fortes homologues avec les protéasomes décrits chez d'autres eucaryotes (Orlowski, 1999 ; Johnson, 2000). Nos résultats montrent aussi que la complémentation du milieu de culture des formes amastigotes de *L. amazonensis* avec les produits de 2 enzymes-cibles du NO, la *cis*-aconitase (Lemesre *et al.*, 1997) et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Mauel et Ransjin, 1997), prévenait l'entrée en apoptose des formes amastigotes traitées avec un donneur de NO. En outre, ces molécules voient leurs activités significativement augmentées chez les formes amastigotes résistantes au NO. Or, l'action du peroxy-nitrite, produit de la réaction du NO avec l'anion superoxyde, et encore plus toxique que ses réactifs (Beckman et Koppenol, 1996 ; Estevez et Jordan, 2002), augmente la dégradation de l'aconitase par le protéasome (Grune *et al.*, 1998). Une partie du processus biochimique intervenant dans le suicide cellulaire par apoptose induit par le NO chez *Leishmania* pourrait donc résider dans l'activation des différentes protéases du complexe multicatalytique du protéasome par la dégradation des cibles moléculaires du parasite.

Les cibles moléculaires du NO incluent principalement les protéines possédant un centre fer-soufre ou des groupements thiols au niveau du site catalytique, certaines métalloprotéines, et l'ADN (Colasanti *et al.*, 1999 ; Kroncke *et al.*, 2000 ; Bogdan, 2001 ; Heck, 2001 ; Kroncke, 2001 ; Colasanti *et al.*, 2002). Chez *Leishmania*, le NO a un impact fort sur le cycle biologique par l'inhibition de deux enzymes-clés du métabolisme parasitaire, la *cis*-aconitase (Lemesre *et al.*, 1997) et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Mauel et Ransjin, 1997). Plus récemment, Salvati *et al.* (2001) ont montré que des donneurs de NO pouvaient inhiber les activités cystéine-protéases de *L. infantum*. En réalisant des lysats de formes amastigotes de *L. amazonensis* traitées avec différents donneurs de NO, nous avons mis en évidence, après électrophorèse, une dérégulation des activités protéasiques chez les formes amastigotes de *L. amazonensis*. Il est apparu deux faits intéressants : une inhibition des deux doublets cystéine-protéases de 33/35 kDa et 25/27 kDa, certainement due à la nitrosylation des groupements thiols des résidus cystéine du site catalytique, et une activation du complexe métalloprotéasique de 59 à 90 kDa, avec plus particulièrement une forte activité de la gp63 (métallo-protéase majeure de surface des promastigotes), et des métallo-protéases de haut poids moléculaire (supérieur à 140 kDa). Les cystéines-protéases jouent un rôle important dans la survie des amastigotes dans le macrophage (Bates 1994; Alexander *et al.* 1998), puisque leur croissance est bloquée par des inhibiteurs de cystéines-protéases

(Mottram *et al.*, 1996). De la même façon, les métalloprotéases, et notamment la leishmanolysine gp63, interviennent dans le cycle de développement parasitaire ainsi que dans la survie intracellulaire (Schneider *et al.*, 1992, Roberts *et al.*, 1995). Si l'inhibition d'activités enzymatiques cruciales comme les cystéines-protéases peut être aisément reliée au processus d'apoptose induit par le NO, la surexpression des activités métalloprotéases l'est moins. La gp63 est une enzyme importante pour le développement des formes promastigotes métacycliques infectieuses (Davies *et al.*, 1990). La surexpression d'une telle enzyme chez le stade amastigote pourrait ajouter un stress supplémentaire au parasite, qui accentuerait son orientation vers la mort cellulaire par apoptose.

Par ailleurs, grâce à une collaboration avec l'industrie (Société Bio Vétro Test) pour des essais d'immunisation chez le chien, réservoir naturel de la leishmaniose viscérale du Bassin Méditerranéen, il nous a été possible de confirmer, chez cet hôte, les résultats précédemment obtenus dans le modèle murin. En effet, en réalisant des co-cultures de macrophages canins infectés par *L. infantum*, et de lymphocytes sensibilisés aux antigènes solubles de leishmanies, nous avons mis en évidence plusieurs observations originales et importantes. Tout d'abord les macrophages de chien infectés jouent leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes puisqu'elles sont capables d'induire la prolifération spécifique de lymphocytes T mémoires de type CD4+, comme c'est le cas chez des chiens guéris après traitement aux antimoniés ou à l'amphotéricine B (Cenini *et al.*, 1993; Bourdoiseau *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, 1999 ; Rhalem *et al.*, 1999). Cette lymphoprolifération et les cytokines produites conduisent à l'activation des macrophages infectés qui synthétisent du NO et exercent un effet leishmanicide sur les formes amastigotes de *L. infantum*. Ce n'est d'ailleurs que récemment qu'un lien direct entre la production de NO (mise en évidence par dosage) et une activité antileishmanienne a été démontré chez le chien (Panaro *et al.*, 1998a, 1998b ; Pinelli *et al.*, 2000). En outre, les techniques de référence utilisées précédemment nous ont permis de démontrer que la mort cellulaire des parasites présentait les caractéristiques principales de l'apoptose. L'induction d'une mort cellulaire programmée par le NO au cours d'une réponse immune à médiation cellulaire semble donc être la voie d'éradication des leishmanies également chez le réservoir naturel de la maladie, et, certaines molécules parasitaires seraient capables de stimuler l'immunité de l'hôte afin d'enclencher ce processus. Néanmoins, la mise en place d'un processus aussi complexe que l'apoptose chez *Leishmania* doit avoir un intérêt pour le parasite, et pourrait jouer un rôle important dans les stratégies utilisées par les parasites pour échapper à la réponse immunitaire et inflammatoire, et persister chez les hôtes qu'ils infectent. Le NO pourrait aussi intervenir en perturbant la réponse

immunitaire de l'hôte, comme c'est le cas pour la femme enceinte chez laquelle l'utérus et le placenta sont d'excellentes sources de NOS-II et produisent des quantités micromolaires de NO, permettant l'immunotolérance de l'embryon (Miller *et al.*, 1996). Chez *Leishmania*, l'induction d'un processus de suicide cellulaire des parasites par le NO, et le dérèglement de la réponse immunitaire de l'hôte pourraient conduire à un maintien à bas bruit du parasite. L'idée illustre le principe même du parasitisme, impliquant la capacité d'une colonie d'agents infectieux unicellulaires à réguler, en fonction des signaux de son environnement, la survie et la mort de chacune des cellules de la colonie, dans le but d'exploiter au maximum les réserves de l'hôte. Cette régulation des formes amastigotes au sein des macrophages, via le NO ou les médicaments antiparasitaires, pourrait également jouer un rôle important dans la transmission de la maladie. En effet, le maintien d'une charge parasitaire modérée ne conférant pas de signes cliniques, comme cela peut être le cas chez les chiens dits asymptomatiques, en fait une source non-négligeable de parasites transmissibles à l'homme.

IV – Implications d'une résistance croisée des leishmanies à l'antimoine et au NO.

Disposant du modèle de formes amastigotes de *L. infantum* résistantes à l'antimoine et aux vues des similitudes d'induction d'une mort cellulaire de phénotype apoptotique tant par l'antimoine que par le NO, nous nous sommes intéressés à l'éventuelle existence d'une résistance croisée entre ces 2 molécules. Nous avons ainsi mis en évidence que les formes amastigotes de *L. infantum* résistantes à l'antimonio tartrate de potassium (antimonié trivalent) résistent au suicide cellulaire par apoptose induit par le NO. Il existe peu d'informations sur les bases moléculaires de la résistance aux antimoniés, même s'il semble qu'une amplification génique, comme cela a été démontré pour les P-glycoprotéines, soit l'hypothèse la plus vraisemblable (Ullman, 1995). D'autre part, l'efficacité de la chimiothérapie semble étroitement liée à l'immunité naturelle représentée par la voie du NO (Vouldoukis *et al.*, 1996 ; Murray et Delph-Etienne, 2000 ; Das *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2002). Il est donc possible que l'acquisition d'une résistance au principe actif chimiothérapeutique soit corrélée à l'acquisition d'une résistance aux dérivés actifs de l'azote. Une hypothèse intéressante résiderait dans l'existence de cibles moléculaires communes. Chez *Leishmania*, l'augmentation du trypanothion et du métabolisme des thiols semble jouer un rôle important dans la résistance aux antimoniés (Mukhopadhyay *et al.*, 1996 ; Arana *et al.*, 1998). Or les thiols sont des cibles moléculaires du NO par excellence (Mnaimneh *et al.*, 1997 ; Colasanti *et*

al., 1999 ; Kroncke *et al.*, 2000). Nous suggérons donc que la résistance croisée de formes amastigotes de *L. infantum* résistantes à l'antimoine avec l'effet du NO soit la conséquence d'une surproduction de trypanothion, qui, en plus d'extruder via une pompe métalloïdes-thiols l'antimoine trivalent qu'il aura conjugué, jouerait le rôle de piègeur de NO.

Forts de ces résultats et utilisant un donneur de NO synthétique adéquat mimant la production de NO par des macrophages activés (DETA/NONOate), nous avons sélectionné *in vitro* des formes amastigotes de *L. infantum* mutantes capables de résister à l'effet leishmanicide du NO. Les deux clones résistants présentent une dérégulation du cycle de développement parasitaire. En effet, les séquences de différenciation amastigote-promastigote-amastigote sont accélérées par rapport au clone sauvage. Des différences sont également notables au niveau de leurs courbes de croissance, puisque la croissance des formes amastigotes résistantes au NO est atténuée, tandis que la croissance des promastigotes issus des amastigotes résistants est exacerbée, et cela de manière dépendante du degré de résistance. En outre, les mutants amastigotes résistants au NO ne sont pas soumis au suicide cellulaire par apoptose au sein de macrophages activés. La dérégulation de ces paramètres biologiques peut être la conséquence de la surexpression d'enzymes métaboliques du parasite, comme la *cis*-aconitase (Lemesre *et al.*, 1997), la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Mauel et Ransijn, 1997), et la 6-phosphogluconate déshydrogénase. D'autre part, l'augmentation des cibles moléculaires du NO chez le parasite va avoir tendance à en diminuer les effets toxiques. En outre, l'amplification du gène et/ou de l'activité de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase peut empêcher la déplétion de la cellule en ATP, qui est significative dans l'orientation d'une cellule vers l'apoptose (LeGoffe *et al.*, 2002). L'activité IRP (Iron Regulatory Protein) de l'aconitase va augmenter la régulation des taux de fer intracellulaires, dont le potentiel protecteur contre les effets pro-apoptotiques du NO ont été démontré récemment pour les cellules tumorales (Feger *et al.*, 2001). La sensibilité ou la résistance des leishmanies au NO, comme d'ailleurs aux dérivés de l'antimoine, peut être une conséquence directe de la modulation de l'expression des cibles moléculaires de ces composés toxiques. Une hypothèse plus originale, et pouvant compléter la première, serait que, chez *Leishmania*, la sensibilité ou la résistance au NO et aux antimoniés soit dépendante de l'induction ou de la répression d'un processus apoptotique.

Conclusions-Perspectives

La position intramacrophagique obligatoire des formes amastigotes de *Leishmania* rend délicate l'étude des paramètres qui interviennent dans l'effet toxique des médicaments et des molécules de l'immunité naturelle. L'outil de culture *in vitro* en conditions axéniques et asériques développé au laboratoire, nous aura permis d'appréhender le mode d'action des deux molécules leishmanicides majeures que sont le NO et l'antimoine.

La première partie de notre travail a porté sur la chimiorésistance des parasites, qui est un redoutable problème de santé publique actuellement, en raison d'un arsenal thérapeutique limité pour soigner efficacement les leishmanioses. De manière rassurante, nous avons mis en évidence que l'acquisition d'une chimiorésistance à l'antimoine ne conférait pas de résistance aux deux principales molécules de seconde intention que sont la pentamidine et l'amphotéricine B. D'autre part, le modèle de culture *in vitro* nous a permis d'induire une chimiorésistance chez les parasites par pression médicamenteuse, et d'étudier certains facteurs intervenant dans la modulation de la chimiorésistance au cours du cycle de développement parasitaire. Nous montrons ainsi que la modulation de la chimiorésistance chez *Leishmania* est complexe et fait intervenir des facteurs intrinsèques comme le degré de résistance ou la réalisation du cycle biologique, mais aussi des facteurs extrinsèques comme l'environnement ou la compétition entre parasites ayant des degrés de chimiorésistance différents. Le coût de la chimiorésistance pour les leishmanies peut également se traduire par une virulence moindre chez l'hôte infecté. L'outil que représentent les formes amastigotes de *Leishmania* chimiorésistantes à différents principes actifs antiparasitaires nous permet d'envisager une étude des facteurs impliqués dans la virulence des parasites et associés à la régulation du cycle cellulaire. Ces travaux nous permettraient de mettre en évidence des cibles thérapeutiques précoces et/ou spécifiques influençant la survie des amastigotes. La détermination au niveau moléculaire des gènes codant ces molécules, cruciales pour les phases de prolifération et de différenciation parasitaire, associée aux outils modernes de biologies moléculaires, pourrait conduire à la production de souches de parasites à virulence atténuées pouvant être utilisées dans de nouvelles approches vaccinales.

Dans un second volet de notre étude, nous avons étudié les activités cytotoxiques de la molécule antileishmanienne chimique qu'est l'antimoine, mais aussi de la molécule microbicide naturelle de la réponse immune de l'hôte infecté qu'est le monoxyde

d'azote NO. Nous avons mis en évidence que ces deux molécules étaient capables d'induire chez le parasite une mort cellulaire programmée ayant certaines caractéristiques phénotypiques de l'apoptose. Des travaux sur le phénomène d'apoptose induit par le NO, sont actuellement en cours dans une étude *in vivo* sur un modèle murin résistant à l'infection par *Leishmania* par rapport à un modèle sensible. Il est important de prouver l'existence de l'apoptose *in vivo* pour pouvoir définitivement caractériser la mort des leishmanies chez leur hôte vertébré. En particulier si l'implication d'un tel processus dans la relation hôte-parasite confère un avantage pour les leishmanies en ne suscitant pas d'immunité mémoire chez les hôtes en cas d'infection avortive. En outre, nous avons déterminé des cibles moléculaires nouvelles du NO et démontré que certaines enzymes inhibées par l'action du NO sur les leishmanies se trouvaient surexprimées chez des formes amastigotes mutantes sélectionnées pour leur résistance au suicide cellulaire induit par le NO. Une étude approfondie faisant appel aux outils de la biologie moléculaire est nécessaire pour confirmer et affiner ces résultats. Par ailleurs, la caractérisation aux plans cellulaire et moléculaire de ces mutants ouvre des perspectives pharmacologiques intéressantes. En effet, des molécules exprimées différemment chez les mutants résistants au NO pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques et ouvrir la voie vers des études de modélisation moléculaire visant à mettre au point de nouveaux principes actifs antileishmaniens.

Enfin, des essais d'immunisation chez le chien, réservoir naturel de la leishmaniose viscérale du pourtour du Bassin Méditerranéen, ont démontré que certaines molécules parasitaires étaient capables d'induire une immunité à médiation cellulaire, qui se traduit par une activation des cellules infectées entraînant la production de NO et la mort par apoptose des parasites. La caractérisation des molécules parasitaires capables d'induire une telle immunité permettra de définir des candidats vaccinaux et/ou immunothérapeutiques potentiels.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Abdelhak S, Louzir H, Timm J, Blél L, Benlasfar Z, Lagranderie M, Gheorghiu M, Dellagi K, and Gicquel B. 1995. Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen Gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Microbiology* **141**: 1585-92.
- Adams LB, Hibbs JB, Jr., Taintor RR, and Krahenbuhl JL. 1990. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol* **144**: 2725-9.
- Aebischer T, Moody SF, and Handman E. 1993. Persistence of virulent *Leishmania major* in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host. *Infect Immun* **61**: 220-6.
- Aebischer T, Morris L, and Handman E. 1994. Intravenous injection of irradiated *Leishmania major* into susceptible BALB/c mice: immunization or protective tolerance. *Int Immunol* **6**: 1535-43.
- Agabian N. 1990. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* **61**: 1157-60.
- Aisa MJ, Castillejo S, Gallego M, Fisa R, Riera MC, de Colmenares M, Torras S, Roura X, Sentis J, and Portus M. 1998. Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *Am J Trop Med Hyg* **58**: 154-9.
- Akiba H, Miyahira Y, Atsuta M, Takeda K, Nohara C, Futagawa T, Matsuda H, Aoki T, Yagita H, and Okumura K. 2000. Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis. *J Exp Med* **191**: 375-80.
- al-Bashir NT, Rassam MB, and al-Rawi BM. 1992. Axenic cultivation of amastigotes of *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and their infectivity. *Ann Trop Med Parasitol* **86**: 487-502.
- Albina JE, Cui S, Mateo RB, and Reichner JS. 1993. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* **150**: 5080-5.
- Albina JE, and Reichner JS. 1998. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer Metastasis Rev* **17**: 39-53.
- Alderton WK, Cooper CE, and Knowles RG. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**: 593-615.
- Alexander J, Coombs GH, and Mottram JC. 1998. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol* **161**: 6794-801.
- Alexander J, and Russell DG. 1992. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv Parasitol* **31**: 175-254.
- Alfieri SC, Shaw E, Zilberfarb V, and Rabinovitch M. 1989. *Leishmania amazonensis*: involvement of cysteine proteinases in the killing of isolated amastigotes by L-leucine methyl ester. *Exp Parasitol* **68**: 423-31.
- Altet L, Francino O, Solano-Gallego L, Renier C, and Sanchez A. 2002. Mapping and sequencing of the canine NRAMPI gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infect Immun* **70**: 2763-71.
- Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, Molina R, and Moreno J. 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* **10**: 298-319.
- Alvarez F, Robello C, and Vignali M. 1994. Evolution of codon usage and base contents in kinetoplastid protozoans. *Mol Biol Evol* **11**: 790-802.
- Amorim AG, Carrington M, Miles MA, Barker DC, and de Almeida ML. 1996. Identification of the C-terminal region of 70 kDa heat shock protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis* as a target for the humoral immune response. *Cell Stress Chaperones* **1**: 177-87.
- Andersen KA, Britigan BE, and Wilson ME. 1996. Short report: regulation of inducible heat shock protein 70 genes in *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* **54**: 471-4.
- Anderson S, David JR, and McMahon-Pratt D. 1983. In vivo protection against *Leishmania mexicana* mediated by monoclonal antibodies. *J Immunol* **131**: 1616-8.
- Andrews NW. 1990. The acid-active hemolysis of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* **71**: 241-4.
- Angel SO, Requena JM, Soto M, Criado D, and Alonso C. 1996. During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. *Acta Trop* **62**: 45-56.
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, and Nicotera P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* **15**: 961-73.
- Anthony RL, Christensen HA, and Johnson CM. 1980. Micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of New World leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* **29**: 190-4.
- Antoine JC, Jouanne C, Ryter A, and Zilberfarb V. 1987. *Leishmania mexicana*: a cytochemical and quantitative study of lysosomal enzymes in infected rat bone marrow-derived macrophages. *Exp Parasitol* **64**: 485-98.
- Antoine JC, Lang T, Prina E, Courret N, and Hellio R. 1999. H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages and internalized by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*. *J Cell Sci* **112**: 2559-70.

- Antoine JC, Prina E, Lang T, and Courret N. 1998. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol* 6: 392-401.
- Antunes CM, Mayrink W, Magalhaes PA, Costa CA, Melo MN, Dias M, Michalick MS, Williams P, Lima AO, Vieira JB, and et al. 1986. Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. *Int J Epidemiol* 15: 572-80.
- Arana FE, Perez-Victoria JM, Repetto Y, Morello A, Castanys S, and Gamarro F. 1998. Involvement of thiol metabolism in resistance to glucantime in *Leishmania tropica*. *Biochem Pharmacol* 56: 1201-8.
- Argov S, Jaffe CL, Krupp M, Slor H, and Shoenfeld Y. 1989. Autoantibody production by patients infected with *Leishmania*. *Clin Exp Immunol* 76: 190-7.
- Arnoult D, Akarid K, Grodet A, Petit PX, Estaquier J, and Ameisen JC. 2002. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania* major involves cysteine proteinase activation and mitochondrial permeabilization. *Cell Death Differ* 9: 65-81.
- Ashford RW. 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1269-81.
- Badaro R, Benson D, Eulalio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, Pedral-Sampaio D, Madureira C, Burns JM, Houghton RL, David JR, and Reed SG. 1996. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 173: 758-61.
- Badaro R, Falcoff E, Badaro FS, Carvalho EM, Pedral-Sampaio D, Barral A, Carvalho JS, Barral-Netto M, Brandely M, Silva L, and et al. 1990. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. *N Engl J Med* 322: 16-21.
- Bahr V, Stierhof YD, Ilg T, Demar M, Quinten M, and Overath P. 1993. Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 58: 107-21.
- Balanco JM, Pral EM, da Silva S, Bijovsky AT, Mortara RA, and Alfieri SC. 1998. Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. *Parasitology* 116: 103-13.
- Balestieri FM, Queiroz AR, Scavone C, Costa VM, Barral-Netto M, and Abrahamsohn Ide A. 2002. *Leishmania* (L.) amazonensis-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect* 4: 23-9.
- Balmer P, Phillips HM, Maestre AE, McMonagle FA, and Phillips RS. 2000. The effect of nitric oxide on the growth of *Plasmodium falciparum*, *P. chabaudi* and *P. berghei* in vitro. *Parasite Immunol* 22: 97-106.
- Bandyopadhyay P, Ghosh DK, De A, Ghosh KN, Chaudhuri PP, Das P, and Bhattacharya A. 1991. Metacyclogenesis of *Leishmania* spp: species-specific in vitro transformation, complement resistance, and cell surface carbohydrate and protein profiles. *J Parasitol* 77: 411-6.
- Barbieri CL, Brown K, and Rabinovitch M. 1985. Depletion of secondary lysosomes in mouse macrophages infected with *Leishmania mexicana amazonensis*: a cytochemical study. *Z Parasitenkd* 71: 159-68.
- Barral A, Barral-Netto M, Yong EC, Brownell CE, Twardzik DR, and Reed SG. 1993. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3442-6.
- Bart G, Coombs GH, and Mottram JC. 1995. Isolation of lmcpc, a gene encoding a *Leishmania mexicana* cathepsin-B-like cysteine proteinase. *Mol Biochem Parasitol* 73: 271-4.
- Basselin M, Badet-Denisot MA, Lawrence F, and Robert-Gero M. 1997. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type, pentamidine-treated, and pentamidine-resistant *Leishmania*. *Exp Parasitol* 85: 274-82.
- Bastien P, Blaineau C, and Pages M. 1992. Molecular karyotype analysis in *Leishmania*. *Subcell Biochem* 18: 131-87.
- Bates PA. 1993. Characterization of developmentally-regulated nucleases in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. *FEMS Microbiol Lett* 107: 53-8.
- Bates PA, and Dwyer DM. 1987. Biosynthesis and secretion of acid phosphatase by *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 26: 289-96.
- Bates PA, Gottlieb M, and Dwyer DM. 1988. *Leishmania donovani*: identification of glycoproteins released by promastigotes during growth in vitro. *Exp Parasitol* 67: 199-209.
- Bates PA, Robertson CD, and Coombs GH. 1994. Expression of cysteine proteinases by metacyclic promastigotes of *Leishmania mexicana*. *J Eukaryot Microbiol* 41: 199-203.
- Bates PA, Robertson CD, Tetley L, and Coombs GH. 1992. Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology* 105: 193-202.
- Bates PA, and Tetley L. 1993. *Leishmania mexicana*: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. *Exp Parasitol* 76: 412-23.
- Beach DH, Goad LJ, and Holz GG, Jr. 1988. Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 31: 149-62.
- Beach R, Kiilu G, and Leeuwenburg J. 1985. Modification of sand fly biting behavior by *Leishmania* leads to increased parasite transmission. *Am J Trop Med Hyg* 34: 278-82.
- Beckman JS, and Koppenol WH. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-37.
- Beebe AM, Cua DJ, and Coffman RL. 1999. Genetic control of T helper subset differentiation in *Leishmania* major infection of mice. *Microbes Infect* 1: 89-94.
- Beebe AM, Mauze S, Schork NJ, and Coffman RL. 1997. Serial backcross mapping of multiple loci associated with resistance to *Leishmania major* in mice. *Immunity* 6: 551-7.

- Beetham JK, Myung KS, McCoy JJ, Wilson ME, and Donelson JE. 1997. Glycoprotein 46 mRNA abundance is post-transcriptionally regulated during development of *Leishmania chagasi* promastigotes to an infectious form. *J Biol Chem* 272: 17360-6.
- Beinert H, and Kennedy MC. 1993. Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor. *Faseb J* 7: 1442-9.
- Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, and Sacks DL. 2001. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med* 194: 1497-506.
- Belkaid Y, Von Stebut E, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, Udey MC, and Sacks D. 2002. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* 168: 3992-4000.
- Berens RL, Brun R, and Krassner SM. 1976. A simple monophasic medium for axenic culture of hemoflagellates. *J Parasitol* 62: 360-5.
- Berman JD, Gallalee JV, and Hansen BD. 1987. *Leishmania mexicana*: uptake of sodium stibogluconate (Pentostam) and pentamidine by parasite and macrophages. *Exp Parasitol* 64: 127-31.
- Berman JD, Waddell D, and Hanson BD. 1985. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother* 27: 916-20.
- Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, and Dunan S. 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* 55: 273-7.
- Berticat C, Boquien G, Raymond M, and Chevillon C. 2002. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genet Res* 79: 41-7.
- Billaut-Mulot O, Fernandez-Gomez R, Loyens M, and Ouaisi A. 1996. *Trypanosoma cruzi* elongation factor 1- α : nuclear localization in parasites undergoing apoptosis. *Gene* 174: 19-26.
- Blackwell J, Freeman J, and Bradley D. 1980. Influence of H-2 complex on acquired resistance to *Leishmania donovani* infection in mice. *Nature* 283: 72-4.
- Blackwell JM. 1985. Receptors and recognition mechanisms of *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79: 606-12.
- Blackwell JM. 1996. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. *Parasitology* 112: S67-74.
- Blackwell JM, Hale C, Roberts MB, Ulczak OM, Liew FY, and Howard JG. 1985. An H-11-linked gene has a parallel effect on *Leishmania major* and *L. donovani* infections in mice. *Immunogenetics* 21: 385-95.
- Blackwell JM, Roach TI, Atkinson SE, Ajioka JW, Barton CH, and Shaw MA. 1991. Genetic regulation of macrophage priming/activation: the Lsh gene story. *Immunol Lett* 30: 241-8.
- Blaineau C, Bastien P, and Pages M. 1992. Multiple forms of chromosome I, II and V in a restricted population of *Leishmania infantum* contrasting with monomorphism in individual strains suggest haploidy or automixy. *Mol Biochem Parasitol* 50: 197-204.
- Blum B, Bakalara N, and Simpson L. 1990. A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell* 60: 189-98.
- Blum JJ, and Opperdoes FR. 1994. Secretion of sucrase by *Leishmania donovani*. *J Eukaryot Microbiol* 41: 228-31.
- Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907-16.
- Bogdan C, Donhauser N, Doring R, Rollinghoff M, Diefenbach A, and Rittig MG. 2000. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med* 191: 2121-30.
- Bogdan C, and Nathan C. 1993. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. *Ann NY Acad Sci* 685: 713-39.
- Bogdan C, and Rollinghoff M. 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 28: 121-34.
- Bosca L, and Hortelano S. 1999. Mechanisms of nitric oxide-dependent apoptosis: involvement of mitochondrial mediators. *Cell Signal* 11: 239-44.
- Bottasso O, Cabrini J, Falcoff R, and Falcoff E. 1992. Successful treatment of an antimony-resistant American mucocutaneous leishmaniasis: a case report. *Arch Dermatol* 128: 996-7.
- Boucher JL, Moali C, and Tenu JP. 1999. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci* 55: 1015-28.
- Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, and Chabanne L. 1997. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 59: 21-30.
- Bouvier J, Bordier C, Vogel H, Reichelt R, and Etges R. 1989. Characterization of the promastigote surface protease of *Leishmania* as a membrane-bound zinc endopeptidase. *Mol Biochem Parasitol* 37: 235-45.
- Bouvier J, Schneider P, and Etges R. 1995. Leishmanolysin: surface metalloproteinase of *Leishmania*. *Methods Enzymol* 248: 614-33.
- Brandonisio O, Carelli G, Altamura M, Varvara B, and Ceci L. 1990. Circulating immune complexes and autoantibodies in canine leishmaniasis. *Parassitologia* 32: 275-81.

- Brandonisio O, Panaro MA, Sisto M, Acquafredda A, Fumarola L, Leogrande D, and Mitolo V. 2001. Nitric oxide production by Leishmania-infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins. *Parassitologia* 43 Suppl 1: 1-6.
- Bredt DS, Hwang PM, and Snyder SH. 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347: 768-70.
- Brito ME, Mendonca MG, Gomes YM, Jardim ML, and Abath FG. 2000. Identification of potentially diagnostic Leishmania braziliensis antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. *Clin Diagn Lab Immunol* 7: 318-21.
- Britto C, Ravel C, Bastien P, Blaineau C, Pages M, Dedet JP, and Wincker P. 1998. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World Leishmania genomes. *Gene* 222: 107-17.
- Brodin TN, Heath S, and Sacks DL. 1992. Genes selectively expressed in the infectious (metacyclic) stage of Leishmania major promastigotes encode a potential basic-zipper structural motif. *Mol Biochem Parasitol* 52: 241-50.
- Brune B, and Lapetina EG. 1990. Properties of a novel nitric oxide-stimulated ADP-ribosyltransferase. *Arch Biochem Biophys* 279: 286-90.
- Brune B, Sandau K, and von Knethen A. 1998. Apoptotic cell death and nitric oxide: activating and antagonistic transducing pathways. *Biochemistry (Mosc)* 63: 817-25.
- Brune B, von Knethen A, and Sandau KB. 1998. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 351: 261-72.
- Burchmore RJ, and Hart DT. 1995. Glucose transport in amastigotes and promastigotes of Leishmania mexicana mexicana. *Mol Biochem Parasitol* 74: 77-86.
- Button LL, and McMaster WR. 1988. Molecular cloning of the major surface antigen of leishmania. *J Exp Med* 167: 724-9.
- Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H, and Alexander J. 1998. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol* 76: 173-80.
- Callahan HL, Roberts WL, Rainey PM, and Beverley SM. 1994. The PGPA gene of Leishmania major mediates antimony (SbIII) resistance by decreasing influx and not by increasing efflux. *Mol Biochem Parasitol* 68: 145-9.
- Calza L, Marinacci G, Manfredi R, Colangeli V, Fortunato L, and Chiodo F. 2001. Pentamidine isethionate as treatment and secondary prophylaxis for disseminated cutaneous leishmaniasis during HIV infection: case report. *J Chemother* 13: 653-7.
- Campbell KA, Ovendale PJ, Kennedy MK, Fanslow WC, Reed SG, and Maliszewski CR. 1996. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to Leishmania major. *Immunity* 4: 283-9.
- Cardenosa N, Riera C, Cortes P, March F, Munoz C, Portus M, and Prats G. 1995. Detection and characterization by immunoblot analysis of potentially diagnostic Leishmania infantum polypeptides in human visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 17: 509-16.
- Carrera L, Fermin ML, Tesouro M, Garcia P, Rollan E, Gonzalez JL, Mendez S, Cuquerella M, and Alunda JM. 1996. Antibody response in dogs experimentally infected with Leishmania infantum: infection course antigen markers. *Exp Parasitol* 82: 139-46.
- Carrera L, Gazzinelli RT, Badolato R, Hieny S, Muller W, Kuhn R, and Sacks DL. 1996. Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med* 183: 515-26.
- Carvalho FA, Charest H, Tavares CA, Matlashewski G, Valente EP, Rabello A, Gazzinelli RT, and Fernandes AP. 2002. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant Leishmania donovani A2 antigen. *Diagn Microbiol Infect Dis* 43: 289-95.
- Castro L, Rodriguez M, and Radi R. 1994. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem* 269: 29409-15.
- Cenini P, Berhe N, Hailu A, McGinnes K, and Frommel D. 1993. Mononuclear cell subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. *J Infect Dis* 168: 986-93.
- Ceulemans H, De Maeyer M, Stalmans W, and Bollen M. 1999. A capping domain for LRR protein interaction modules. *FEBS Lett* 456: 349-51.
- Champs J, and McMahon-Pratt D. 1988. Membrane glycoprotein M-2 protects against Leishmania amazonensis infection. *Infect Immun* 56: 3272-9.
- Chaudhuri G, and Chang KP. 1988. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from Leishmania mexicana promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 27: 43-52.
- Chiquero MJ, Perez-Victoria JM, O'Valle F, Gonzalez-Ros JM, del Moral RG, Ferragut JA, Castanys S, and Gamarro F. 1998. Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant Leishmania tropica line. *Biochem Pharmacol* 55: 131-9.
- Christensen CB, Jorgensen L, Jensen AT, Gasim S, Chen M, Kharazmi A, Theander TG, and Andresen K. 2000. Molecular characterization of a Leishmania donovani cDNA clone with similarity to human 20S proteasome a-type subunit. *Biochim Biophys Acta* 1500: 77-87.

- Cibrelus P, Precigout E, Sereno D, Carcy B, Lemesre JL, and Gorenflot A. 1999. Secreted antigens of the amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum* inducing a humoral response in humans and dogs. *Parasite* 6: 121-9.
- Clayton C, Adams M, Almeida R, Baltz T, Barrett M, Bastien P, Belli S, Beverley S, Biteau N, Blackwell J, Blaineau C, Boshart M, Bringaud F, Cross G, Cruz A, Degraeve W, Donelson J, El-Sayed N, Fu G, Ersfeld K, Gibson W, Gull K, Ivens A, Kelly J, Vanhamme L, and et al. 1998. Genetic nomenclature for *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 97: 221-4.
- Coffman RL, and Beebe AM. 1998. Genetic control of the T cell response to *Leishmania major* infection. *Adv Exp Med Biol* 452: 61-6.
- Colasanti M, Gradoni L, Mattu M, Persichini T, Salvati L, Venturini G, and Ascenzi P. 2002. Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO (Review). *Int J Mol Med* 9: 131-4.
- Colasanti M, Persichini T, Venturini G, and Ascenzi P. 1999. S-nitrosylation of viral proteins: molecular bases for antiviral effect of nitric oxide. *IUBMB Life* 48: 25-31.
- Conceicao-Silva F, Hahne M, Schroter M, Louis J, and Tschopp J. 1998. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. *Eur J Immunol* 28: 237-45.
- Connell ND, Medina-Acosta E, McMaster WR, Bloom BR, and Russell DG. 1993. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guerin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11473-7.
- Coombs GH, and Baxter J. 1984. Inhibition of *Leishmania* amastigote growth by antipain and leupeptin. *Ann Trop Med Parasitol* 78: 21-4.
- Coombs GH, and Mottram JC. 1997. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. *Parasitology* 114 Suppl: S61-80.
- Coons T, Hanson S, Bitonti AJ, McCann PP, and Ullman B. 1990. Alpha-difluoromethylornithine resistance in *Leishmania donovani* is associated with increased ornithine decarboxylase activity. *Mol Biochem Parasitol* 39: 77-89.
- Cornillon S, Foa C, Davoust J, Buonavista N, Gross JD, and Golstein P. 1994. Programmed cell death in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* 107: 2691-704.
- Corry DB, Reiner SL, Linsley PS, and Locksley RM. 1994. Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 153: 4142-8.
- Coulson RM, Connor V, Chen JC, and Ajioka JW. 1996. Differential expression of *Leishmania major* beta-tubulin genes during the acquisition of promastigote infectivity. *Mol Biochem Parasitol* 82: 227-36.
- Coulson RM, and Smith DF. 1990. Isolation of genes showing increased or unique expression in the infective promastigotes of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 40: 63-75.
- Cox FE, and Liew FY. 1992. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunol Today* 13: 445-8.
- Croft SL, Davidson RN, and Thornton EA. 1991. Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 28 Suppl B: 111-8.
- Cruz A, Coburn CM, and Beverley SM. 1991. Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7170-4.
- Cysne-Finkelstein L, Temporal RM, Alves FA, and Leon LL. 1998. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Exp Parasitol* 89: 58-62.
- Da Costa JM, Neogy AB, Vouldoukis I, Silva ML, Gentilini M, and Monjour L. 1996. Antigenic components of partially purified antigens of *Leishmania donovani* infantum recognized by sera from dogs with asymptomatic or active visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 55: 511-5.
- Da Silva RP, Hall BF, Joiner KA, and Sacks DL. 1989. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J Immunol* 143: 617-22.
- Das M, Mukherjee SB, and Shaha C. 2001. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Cell Sci* 114: 2461-9.
- Davidson RN, Croft SL, Scott A, Maini M, Moody AH, and Bryceson AD. 1991. Liposomal amphotericin B in drug-resistant visceral leishmaniasis. *Lancet* 337: 1061-2.
- Davidson RN, Yardley V, Croft SL, Konecny P, and Benjamin N. 2000. A topical nitric oxide-generating therapy for cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 319-22.
- Davies CR, Cooper AM, Peacock C, Lane RP, and Blackwell JM. 1990. Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology* 101 Pt 3: 337-43.
- de Andrade CR, Kirchhoff LV, Donelson JE, and Otsu K. 1992. Recombinant *Leishmania* Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas' disease patients. *J Clin Microbiol* 30: 330-5.
- de Freitas Balanco JM, Moreira ME, Bonomo A, Bozza PT, Amarante-Mendes G, Pirmez C, and Barcinski MA. 2001. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol* 11: 1870-3.
- de Gorgolas M, and Miles MA. 1994. Visceral leishmaniasis and AIDS. *Nature* 372: 734.

- de la Loma A, Alvar J, Martinez Galiano E, Blazquez J, Alcala Munoz A, and Najera R. 1985. Leishmaniasis or AIDS? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79: 421-2.
- De Souza Leao S, Lang T, Prina E, Hellio R, and Antoine JC. 1995. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci* 108: 3219-31.
- Decker-Jackson JE, and Honigberg BM. 1978. Glycoproteins released by *Leishmania donovani*: immunologic relationships with host and bacterial antigens and preliminary biochemical analysis. *J Protozool* 25: 514-25.
- Dedet JP, Pratlong F, Lanotte G, and Ravel C. 1999. Cutaneous leishmaniasis. The parasite. *Clin Dermatol* 17: 261-8.
- Depaquit J, Leger N, and Ferte H. 1999. *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *marismortui* Theodor, 1947, synonym of *P. (Pa.) alexandri* Sinton, 1928. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 560.
- Descoteaux A, Matlashewski G, and Turco SJ. 1992. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Immunol* 149: 3008-15.
- Desjeux P. 1992. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Stat Q* 45: 267-75.
- Desjeux P. 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol* 14: 417-23.
- Desjeux P, Piot B, O'Neill K, and Meert JP. 2001. [Co-infections of leishmania/HIV in south Europe]. *Med Trop (Mars)* 61: 187-93.
- Dimmeler S, and Zeiher AM. 1997. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide* 1: 275-81.
- Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, and Snyder SH. 1994. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4214-8.
- Docampo R, and Moreno SN. 1999. Acidocalcisome: A novel Ca^{2+} storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitol Today* 15: 443-8.
- Dole VS, Raj VS, Ghosh A, Madhubala R, Myler PJ, and Stuart KD. 2000. Immunization with recombinant LD1 antigens protects against experimental leishmaniasis. *Vaccine* 19: 423-30.
- Dong Z, Qi X, Xie K, and Fidler IJ. 1993. Protein tyrosine kinase inhibitors decrease induction of nitric oxide synthase activity in lipopolysaccharide-responsive and lipopolysaccharide-nonresponsive murine macrophages. *J Immunol* 151: 2717-24.
- Doran TL, and Herman R. 1981. Characterization of populations of promastigotes of *Leishmania donovani*. *J Protozool* 28: 345-50.
- dos Santos JJ, Morgado MG, and Galvao-Castro B. 1987. Human visceral leishmaniasis: analysis of the specificity of humoral immune response to polypeptides of *Leishmania donovani* chagasi. *Am J Trop Med Hyg* 37: 263-70.
- DosReis GA, and Barcinski MA. 2001. Apoptosis and parasitism: from the parasite to the host immune response. *Adv Parasitol* 49: 133-61.
- Doyle JJ, Behin R, Mauel J, and Rowe DS. 1974. Antibody-induced movement of membrane components of *Leishmania enriettii*. *J Exp Med* 139: 1061-9.
- Doyle JJ, Behin R, Mauel J, and Rowe DS. 1975. Antibody-induced movement of protozoan surface membrane antigens. *Ann NY Acad Sci* 254: 315-25.
- Doyle PS, Engel JC, Pimenta PF, da Silva PP, and Dwyer DM. 1991. *Leishmania donovani*: long-term culture of axenic amastigotes at 37 degrees C. *Exp Parasitol* 73: 326-34.
- Drapier JC, and Hibbs JB, Jr. 1988. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Immunol* 140: 2829-38.
- Duarte MI, Laurenti MD, Brandao Nunes VL, Rego Junior AF, Oshiro ET, and Corbett CE. 1986. Interstitial pneumonitis in canine visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 28: 431-6.
- Duboise SM, Vannier-Santos MA, Costa-Pinto D, Rivas L, Pan AA, Traub-Cseko Y, De Souza W, and McMahon-Pratt D. 1994. The biosynthesis, processing, and immunolocalization of *Leishmania pifanoi* amastigote cysteine proteinases. *Mol Biochem Parasitol* 68: 119-32.
- Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, Tamar S, Olivier M, and Papadopoulos B. 1997. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *Embo J* 16: 2590-8.
- Dunan S, Frommel D, Monjour L, Ogunkolade BW, Cruz A, and Quilici M. 1989. Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. Phocan Veterinary Study Group on Visceral Leishmaniasis. *Parasite Immunol* 11: 397-402.
- Duval DL, Miller DR, Collier J, and Billings RE. 1996. Characterization of hepatic nitric oxide synthase: identification as the cytokine-inducible form primarily regulated by oxidants. *Mol Pharmacol* 50: 277-84.
- Dwyer DM. 1976. Antibody-induced modulation of *Leishmania donovani* surface membrane antigens. *J Immunol* 117: 2081-91.
- Dye C, Vidor E, and Dereure J. 1993. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol Infect* 110: 647-56.
- Efron DT, Kirk SJ, Regan MC, Wasserkrug HL, and Barbul A. 1991. Nitric oxide generation from L-arginine is required for optimal human peripheral blood lymphocyte DNA synthesis. *Surgery* 110: 327-34.

- Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, Hurn PD, Traystman RJ, Bao J, Pieper A, Wang ZQ, Dawson TM, Snyder SH, and Dawson VL. 1997. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat Med* 3: 1089-95.
- Elledge RM, Green S, Howes L, Clark GM, Berardo M, Allred DC, Pugh R, Ciocca D, Ravdin P, O'Sullivan J, Rivkin S, Martino S, and Osborne CK. 1997. bcl-2, p53, and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 15: 1916-22.
- El-On J, Bradley DJ, and Freeman JC. 1980. Leishmania donovani: action of excreted factor on hydrolytic enzyme activity of macrophages from mice with genetically different resistance to infection. *Exp Parasitol* 49: 167-74.
- El-On J, Schnur LF, and Greenblatt CL. 1979. Leishmania donovani: physicochemical, immunological, and biological characterization of excreted factor from promastigotes. *Exp Parasitol* 47: 254-69.
- Eperon S, and McMahon-Pratt D. 1989. Extracellular cultivation and morphological characterization of amastigote-like forms of Leishmania panamensis and L. braziliensis. *J Protozool* 36: 502-10.
- Ephros M, Paz A, and Jaffe CL. 1994. Asymptomatic visceral leishmaniasis in Israel. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 651-2.
- Erb K, Blank C, Ritter U, Bluethmann H, and Moll H. 1996. Leishmania major infection in major histocompatibility complex class II-deficient mice: CD8⁺ T cells do not mediate a protective immune response. *Immunobiology* 195: 243-60.
- Estevez AG, Crow JP, Sampson JB, Reiter C, Zhuang Y, Richardson GJ, Tarpey MM, Barbeito L, and Beckman JS. 1999. Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science* 286: 2498-500.
- Estevez AG, and Jordan J. 2002. Nitric oxide and superoxide, a deadly cocktail. *Ann N Y Acad Sci* 962: 207-11.
- Etges R, Bouvier J, and Bordier C. 1986. The major surface protein of Leishmania promastigotes is a protease. *J Biol Chem* 261: 9098-101.
- Falcoff E, Gimenez LA, Bernabo JG, and Bottasso O. 1994. [Interferon gamma as an immunological strategy for the treatment of human leishmaniasis]. *Medicina (B Aires)* 54: 265-71.
- Fargeas C, Hommel M, Maingon R, Dourado C, Monsigny M, and Mayer R. 1996. Synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 34: 241-8.
- Feger F, Ferry-Dumazet H, Mamani Matsuda M, Bordenave J, Dupouy M, Nussler AK, Arock M, Devevey L, Nafziger J, Guillosson JJ, Reiffers J, and Mossalayi MD. 2001. Role of iron in tumor cell protection from the pro-apoptotic effect of nitric oxide. *Cancer Res* 61: 5289-94.
- Fernandez-Perez FJ, Mendez S, de la Fuente C, Cuquerella M, Gomez MT, and Alunda JM. 1999. Value of Western blotting in the clinical follow-up of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest* 11: 170-3.
- Ferrer L, Aisa MJ, Roura X, and Portus M. 1995. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Rec* 136: 514-6.
- Fisa R, Gallego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrio J, Gallego J, and Portus M. 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet Parasitol* 83: 87-97.
- Flinn HM, and Smith DF. 1992. Genomic organisation and expression of a differentially-regulated gene family from Leishmania major. *Nucleic Acids Res* 20: 755-62.
- Flohe S, Lang T, and Moll H. 1997. Synthesis, stability, and subcellular distribution of major histocompatibility complex class II molecules in Langerhans cells infected with Leishmania major. *Infect Immun* 65: 3444-50.
- Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H, and Tracey WR. 1994. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions
- Isoforms of nitric-oxide synthase: purification and regulation. *Hypertension* 23: 1121-31.
- Forstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, and Murad F. 1991. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 42: 1849-57.
- Fortenberry JD, Owens ML, Brown MR, Atkinson D, and Brown LA. 1998. Exogenous nitric oxide enhances neutrophil cell death and DNA fragmentation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 421-8.
- Frommel D, Ogunkolade BW, Vouldoukis I, and Monjour L. 1988. Vaccine-induced immunity against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Infect Immun* 56: 843-8.
- Fruth U, Solioz N, and Louis JA. 1993. Leishmania major interferes with antigen presentation by infected macrophages. *J Immunol* 150: 1857-64.
- Gamarro F, Chiquero MJ, Amador MV, Legare D, Ouellette M, and Castanys S. 1994. P-glycoprotein overexpression in methotrexate-resistant Leishmania tropica. *Biochem Pharmacol* 47: 1939-47.
- Garcez LM, Silveira FT, el Harith A, Lainson R, and Shaw JJ. 1997. Experimental cutaneous leishmaniasis. IV. The humoral response of Cebus apella (Primates: Cebidae) to infections of Leishmania (Leishmania) amazonensis, L. (Viannia) lainsoni and L. (V.) braziliensis using the direct agglutination test. *Acta Trop* 68: 65-76.
- Garcia N, Figarella K, Mendoza-Leon A, and Ponte-Sucre A. 2000. Changes in the infectivity, pyruvate kinase activity, acid phosphatase activity and P-glycoprotein expression in glibenclamide-resistant Leishmania mexicana. *Parasitol Res* 86: 899-904.

- Garin YJ, Sulahian A, Pratlong F, Meneceur P, Gangneux JP, Prina E, Dedet JP, and Derouin F. 2001. Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. *Infect Immun* 69: 7365-73.
- Gazola KC, Ferreira AV, Anacleto C, Michalick MS, Andrade AF, and Moreira ES. 2001. Cell surface carbohydrates and in vivo infectivity of glucanase-sensitive and resistant *Leishmania* (*Viannia*) *guyjanensis* cell lines. *Parasitol Res* 87: 935-40.
- Ghafourifar P, Klein SD, Schucht O, Schenk U, Pruschy M, Rocha S, and Richter C. 1999. Ceramide induces cytochrome c release from isolated mitochondria. Importance of mitochondrial redox state. *J Biol Chem* 274: 6080-4.
- Ghafourifar P, and Richter C. 1997. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett* 418: 291-6.
- Ghafourifar P, and Richter C. 1999. Mitochondrial nitric oxide synthase regulates mitochondrial matrix pH. *Biol Chem* 380: 1025-8.
- Ghafourifar P, Schenk U, Klein SD, and Richter C. 1999. Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J Biol Chem* 274: 31185-8.
- Giacchino R, Giambartolomei G, Tasso L, Timitilli A, Castagnola E, Brisigotti M, and Micalizzi C. 1993. Treatment with liposomal amphotericin B of a child affected with drug-resistant visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 310.
- Giannini MS. 1974. Effects of promastigote growth phase, frequency of subculture, and host age on promastigote-initiated infections with *Leishmania donovani* in the golden hamster. *J Protozool* 21: 521-7.
- Giulivi C, Poderoso JJ, and Boveris A. 1998. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* 273: 11038-43.
- Glaser TA, Baatz JE, Kreishman GP, and Mukkada AJ. 1988. pH homeostasis in *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 7602-6.
- Glockzin S, von Knethen A, Scheffner M, and Brune B. 1999. Activation of the cell death program by nitric oxide involves inhibition of the proteasome. *J Biol Chem* 274: 19581-6.
- Gobert AP, Daulouede S, Lepoivre M, Boucher JL, Bouteille B, Buguet A, Cespuglio R, Veyret B, and Vincendeau P. 2000. L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infect Immun* 68: 4653-7.
- Goncalves da Costa S, Santos EB, and Lagrange PH. 1988. Vaccination of mice against *Leishmania mexicana amazonensis* with microsomal fraction associated with BCG. *Ann Inst Pasteur Immunol* 139: 143-56.
- Goodwin LG. 1995. Pentostam (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89: 339-41.
- Gopfert U, Goehring N, Klein C, and Ilg T. 1999. Proteophosphoglycans of *Leishmania mexicana*. Molecular cloning and characterization of the *Leishmania mexicana* ppg2 gene encoding the proteophosphoglycans aPPG and pPPG2 that are secreted by amastigotes and promastigotes. *Biochem J* 344 Pt 3: 787-95.
- Gotoh T, Sonoki T, Nagasaki A, Terada K, Takiguchi M, and Mori M. 1996. Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. *FEBS Lett* 395: 119-22.
- Gramiccia M, Gradoni L, di Martino L, Romano R, and Ercolini D. 1992. Two syntopic zymodemes of *Leishmania infantum* cause human and canine visceral leishmaniasis in the Naples area, Italy. *Acta Trop* 50: 357-9.
- Granger DL, Hibbs JB, Jr., Perfect JR, and Durack DT. 1988. Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbistatic activity of murine macrophages. *J Clin Invest* 81: 1129-36.
- Granger DL, and Lehninger AL. 1982. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. *J Cell Biol* 95: 527-35.
- Green PJ, Feizi T, Stoll MS, Thiel S, Prescott A, and McConville MJ. 1994. Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. *Mol Biochem Parasitol* 66: 319-28.
- Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Jr., and Nacy CA. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania* major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol* 144: 278-83.
- Greenblatt CL. 1980. The present and future of vaccination for cutaneous leishmaniasis. *Prog Clin Biol Res* 47: 259-85.
- Greenlund AC, Farrar MA, Viviano BL, and Schreiber RD. 1994. Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *Embo J* 13: 1591-600.
- Greis KD, Turco SJ, Thomas JR, McConville MJ, Homans SW, and Ferguson MA. 1992. Purification and characterization of an extracellular phosphoglycan from *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 267: 5876-81.
- Grondin K, Haimeur A, Mukhopadhyay R, Rosen BP, and Ouellette M. 1997. Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene gsh1 and of the ABC transporter gene pgpA in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*. *Embo J* 16: 3057-65.
- Grune T, Blasig IE, Sitte N, Roloff B, Haseloff R, and Davies KJ. 1998. Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome. *J Biol Chem* 273: 10857-62.
- Gurunathan S, Stobie L, Prussin C, Sacks DL, Glaichenhaus N, Iwasaki A, Fowell DJ, Locksley RM, Chang JT, Wu CY, and Seder RA. 2000. Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. *J Immunol* 165: 915-24.

- Haendeler J, Weiland U, Zeiher AM, and Dimmeler S. 1997. Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity. *Nitric Oxide* 1: 282-93.
- Hahn UK, Bender RC, and Bayne CJ. 2001. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol* 87: 778-85.
- Haimeur A, and Ouellette M. 1998. Gene amplification in *Leishmania tarentolae* selected for resistance to sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1689-94.
- Handman E, Button LL, and McMaster RW. 1990. *Leishmania major*: production of recombinant gp63, its antigenicity and immunogenicity in mice. *Exp Parasitol* 70: 427-35.
- Handman E, Jarvis HM, and Mitchell GF. 1984. *Leishmania major*: identification of stage-specific antigens and antigens shared by promastigotes and amastigotes. *Parasite Immunol* 6: 223-33.
- Handman E, Noormohammadi AH, Curtis JM, Baldwin T, and Sjolander A. 2000. Therapy of murine cutaneous leishmaniasis by DNA vaccination. *Vaccine* 18: 3011-7.
- Handman E, Osborn AH, Symons F, van Driel R, and Cappai R. 1995. The *Leishmania* promastigote surface antigen 2 complex is differentially expressed during the parasite life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 74: 189-200.
- Handman E, Symons FM, Baldwin TM, Curtis JM, and Scheerlinck JP. 1995. Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response. *Infect Immun* 63: 4261-7.
- Hashimoto T, and Taniguchi I. 1988. Measurement of intracochlear current flow. *Prog Brain Res* 74: 305-12.
- Hausladen A, and Fridovich I. 1994. Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J Biol Chem* 269: 29405-8.
- Heard PL, Lewis CS, and Chaudhuri G. 1996. *Leishmania mexicana amazonensis*: differential display analysis and cloning of mRNAs from attenuated and infective forms. *J Eukaryot Microbiol* 43: 409-15.
- Heck DE. 2001. *NO, RSNO, ONOO-, NO+, *NOO, NOx--dynamic regulation of oxidant scavenging, nitric oxide stores, and cyclic GMP-independent cell signaling. *Antioxid Redox Signal* 3: 249-60.
- Henderson DM, Sifri CD, Rodgers M, Wirth DF, Hendrickson N, and Ullman B. 1992. Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian *mdr1* gene. *Mol Cell Biol* 12: 2855-65.
- Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-6.
- Hermoso T, and Jaffe CL. 1993. Phosphorylation of proteins in virulent promastigotes from *Leishmania major*. *Biol Res* 26: 267-71.
- Herwaldt BL. 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-9.
- Herwaldt BL, and Berman JD. 1992. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am J Trop Med Hyg* 46: 296-306.
- Hibbs JB, Jr., Taintor RR, and Vavrin Z. 1987. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235: 473-6.
- Hibbs JB, Jr., Taintor RR, Vavrin Z, and Rachlin EM. 1988. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 87-94.
- Hibbs JB, Jr., Vavrin Z, and Taintor RR. 1987. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 138: 550-65.
- Hocking AM, Shinomura T, and McQuillan DJ. 1998. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol* 17: 1-19.
- Hodgkinson VH, Soong L, Duboise SM, and McMahon-Pratt D. 1996. *Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms. *Exp Parasitol* 83: 94-105.
- Holaday BJ. 2000. Role of CD8+ T cells in endogenous interleukin-10 secretion associated with visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 217-20.
- Hoover DL, Berger M, Hammer CH, and Meltzer MS. 1985. Complement-mediated serum cytotoxicity for *Leishmania major* amastigotes: killing by serum deficient in early components of the membrane attack complex. *J Immunol* 135: 570-4.
- Horta MF. 1997. Pore-forming proteins in pathogenic protozoan parasites. *Trends Microbiol* 5: 363-6.
- Howard MK, Sayers G, and Miles MA. 1987. *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation in vitro, lectin agglutination, complement resistance, and infectivity. *Exp Parasitol* 64: 147-56.
- Huang J, and Van der Ploeg LH. 1991. Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *Embo J* 10: 3877-85.
- Huber M, Timms E, Mak TW, Rollinghoff M, and Lohoff M. 1998. Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice. *Infect Immun* 66: 3968-70.
- Hyman MR, and Arp DJ. 1991. Kinetic analysis of the interaction of nitric oxide with the membrane-associated, nickel and iron-sulfur-containing hydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochim Biophys Acta* 1076: 165-72.
- Idziorek T, Estaquier J, De Bels F, and Ameisen JC. 1995. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J Immunol Methods* 185: 249-58.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, and Chaudhuri G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 9265-9.

- Ilg T, Craik D, Currie G, Multhaup G, and Bacic A. 1998. Stage-specific proteophosphoglycan from *Leishmania mexicana* amastigotes. Structural characterization of novel mono-, di-, and triphosphorylated phosphodiester-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* **273**: 13509-23.
- Ilg T, Handman E, and Stierhof YD. 1999. Proteophosphoglycans from *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Biochem Soc Trans* **27**: 518-25.
- Ilg T, Harbecke D, and Overath P. 1993. The lysosomal gp63-related protein in *Leishmania mexicana* amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acidic pH optimum. *FEBS Lett* **327**: 103-7.
- Ilg T, Stierhof YD, Etges R, Adrian M, Harbecke D, and Overath P. 1991. Secreted acid phosphatase of *Leishmania mexicana*: a filamentous phosphoglycoprotein polymer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 8774-8.
- Ilg T, Stierhof YD, Wiese M, McConville MJ, and Overath P. 1994. Characterization of phosphoglycan-containing secretory products of *Leishmania*. *Parasitology* **108** Suppl: S63-71.
- Incze K, Farkas J, Mihalyi V, and Zukal E. 1974. Antibacterial effect of cysteine-nitrosothiol and possible precursors thereof. *Appl Microbiol* **27**: 202-5.
- Iniesta V, Gomez-Nieto LC, and Corraliza I. 2001. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med* **193**: 777-84.
- Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelen J, Miron C, Alonso C, and Corraliza I. 2002. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol* **24**: 113-8.
- Iyengar R, Stuehr DJ, and Marletta MA. 1987. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6369-73.
- Jacobson RL, and Schlein Y. 1997. Cellulase activity of *Leishmania major* in the sandfly vector and in culture. *J Eukaryot Microbiol* **44**: 216-9.
- Jaffe CL, Perez L, and Schnur LF. 1990. Lipophosphoglycan and secreted acid phosphatase of *Leishmania tropica* share species-specific epitopes. *Mol Biochem Parasitol* **41**: 233-40.
- Jaffe CL, Rachamim N, and Sarfstein R. 1990. Characterization of two proteins from *Leishmania donovani* and their use for vaccination against visceral leishmaniasis. *J Immunol* **144**: 699-706.
- Jaffe CL, and Zalis M. 1988. Use of purified parasite proteins from *Leishmania donovani* for the rapid serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* **157**: 1212-20.
- James SL, and Glaven J. 1989. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J Immunol* **143**: 4208-12.
- Jardim A, Alexander J, Teh HS, Ou D, and Olafson RW. 1990. Immunoprotective *Leishmania major* synthetic T cell epitopes. *J Exp Med* **172**: 645-8.
- Jefferies D, Livesey JL, and Molyneux DH. 1986. Fluid mechanics of bloodmeal uptake by *Leishmania*-infected sandflies. *Acta Trop* **43**: 43-53.
- Jensen AT, Gaafar A, Ismail A, Christensen CB, Kemp M, Hassan AM, Kharazmi A, and Theander TG. 1996. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis: assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay using a peptide sequence from gene B protein. *Am J Trop Med Hyg* **55**: 490-5.
- Jensen AT, Gasim S, Moller T, Ismail A, Gaafar A, Kemp M, el Hassan AM, Kharazmi A, Alce TM, Smith DF, and Theander TG. 1999. Serodiagnosis of *Leishmania donovani* infections: assessment of enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant *L. donovani* gene B protein (GBP) and a peptide sequence of *L. donovani* GBP. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **93**: 157-60.
- Jimenez-Ruiz A, Boceta C, Bonay P, Requena JM, and Alonso C. 1998. Cloning, sequencing, and expression of the PSA genes from *Leishmania infantum*. *Eur J Biochem* **251**: 389-97.
- Joseph B, Marchetti P, Formstecher P, Kroemer G, Lewensohn R, and Zhivotovsky B. 2002. Mitochondrial dysfunction is an essential step for killing of non-small cell lung carcinomas resistant to conventional treatment. *Oncogene* **21**: 65-77.
- Joshi M, Dwyer DM, and Nakhasi HL. 1993. Cloning and characterization of differentially expressed genes from in vitro-grown 'amastigotes' of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* **58**: 345-54.
- Joshi PB, Sacks DL, Modi G, and McMaster WR. 1998. Targeted gene deletion of *Leishmania major* genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63). *Mol Microbiol* **27**: 519-30.
- Kaneshiro ES, Gottlieb M, and Dwyer DM. 1982. Cell surface origin of antigens shed by *Leishmania donovani* during growth in axenic culture. *Infect Immun* **37**: 558-67.
- Kaul P, Malla N, Kaur S, Mahajan RC, and Ganguly NK. 2000. Evaluation of a 200-kDa amastigote-specific antigen of *L. donovani* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **94**: 173-5.
- Kellina OI. 1965. [A comparative study of the virulence of *Leishmania tropica* major strains]. *Med Parazitol (Mosk)* **34**: 309-17.
- Kellina OI. 1981. Problem and current lines in investigations on the epidemiology of leishmaniasis and its control in the U.S.S.R. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* **74**: 306-18.
- Kenney RT, Sacks DL, Sypek JP, Vilela L, Gam AA, and Evans-Davis K. 1999. Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* **163**: 4481-8.

- Kharazmi A, Jepsen S, and Valerius NH. 1984. Polymorphonuclear leucocytes defective in oxidative metabolism inhibit in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. Evidence against an oxygen-dependent mechanism. *Scand J Immunol* 20: 93-6.
- Killick-Kendrick R. 1990. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp* 65 Suppl 1: 37-42.
- Killick-Kendrick R, and Molyneux DH. 1981. Transmission of leishmaniasis by the bite of phlebotomine sandflies: possible mechanisms. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75: 152-4.
- Killick-Kendrick R, Wallbanks KR, Molyneux DH, and Lavin DR. 1988. The ultrastructure of *Leishmania major* in the foregut and proboscis of *Phlebotomus papatasi*. *Parasitol Res* 74: 586-90.
- Kim CN, Wang X, Huang Y, Ibrado AM, Liu L, Fang G, and Bhalla K. 1997. Overexpression of Bcl-X(L) inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res* 57: 3115-20.
- Kim NY, Pae HO, Oh GS, Kang TH, Kim YC, Rhew HY, and Chung HT. 2001. Butein, a plant polyphenol, induces apoptosis concomitant with increased caspase-3 activity, decreased Bcl-2 expression and increased Bax expression in HL-60 cells. *Pharmacol Toxicol* 88: 261-6.
- Kim YM, Chung HT, Simmons RL, and Billiar TR. 2000. Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J Biol Chem* 275: 10954-61.
- Kim YM, Talanian RV, and Billiar TR. 1997. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 272: 31138-48.
- Klein C, Gopfert U, Goehring N, Stierhof YD, and Ilg T. 1999. Proteophosphoglycans of *Leishmania mexicana*. Identification, purification, structural and ultrastructural characterization of the secreted promastigote proteophosphoglycan pPPG2, a stage-specific glycoisoform of amastigote aPPG. *Biochem J* 344 Pt 3: 775-86.
- Kroncke KD. 2001. Zinc finger proteins as molecular targets for nitric oxide-mediated gene regulation. *Antioxid Redox Signal* 3: 565-75.
- Kroncke KD, Suschek CV, and Kolb-Bachofen V. 2000. Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity. *Antioxid Redox Signal* 2: 585-605.
- Kumar R, Pai K, Pathak K, and Sundar S. 2001. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 1220-4.
- Kunz D, Walker G, Eberhardt W, Messmer UK, Huwiler A, and Pfeilschifter J. 1997. Platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor differentially regulate interleukin 1 β - and cAMP-induced nitric oxide synthase expression in rat renal mesangial cells. *J Clin Invest* 100: 2800-9.
- Kuyucu N, Kara C, Bakirtac A, and Tezic T. 2001. Successful treatment of visceral leishmaniasis with allopurinol plus ketoconazole in an infant who developed pancreatitis caused by meglumine antimoniate. *Pediatr Infect Dis J* 20: 455-7.
- Kweider M, Lemesre JL, Darcy F, Kusnierz JP, Capron A, and Santoro F. 1987. Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65,000-dalton surface antigen. *J Immunol* 138: 299-305.
- Lainson R. 1987. Further comments on cutaneous leishmaniasis in Belize, Central America. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 702.
- Lamothe J. 2001. Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract* 42: 170-5.
- Lancaster JR, Jr. 1996. Diffusion of free nitric oxide. *Methods Enzymol* 268: 31-50.
- Lang T, de Chastellier C, Frehel C, Hellio R, Metezeau P, Leao Sde S, and Antoine JC. 1994. Distribution of MHC class I and of MHC class II molecules in macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Cell Sci* 107: 69-82.
- Lanzavecchia A, and Sallusto F. 2000. From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr Opin Immunol* 12: 92-8.
- Larochette N, Decaudin D, Jacotot E, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Zamzami N, Xie Z, Reed J, and Kroemer G. 1999. Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Exp Cell Res* 249: 413-21.
- Lasri S, Sahibi H, Sadak A, Jaffe CL, and Rhalem A. 1999. Immune responses in vaccinated dogs with autoclaved *Leishmania major* promastigotes. *Vet Res* 30: 441-9.
- Le Goffe C, Vallette G, Charrier L, Candelon T, Bou-Hanna C, Bouhours JF, and Labois CL. 2002. Metabolic control of resistance of human epithelial cells to H₂O₂ and NO stresses. *Biochem J* 364: 349-59.
- LeBowitz JH, Smith HQ, Rusche L, and Beverley SM. 1993. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev* 7: 996-1007.
- Lecureur V, Lagadic-Gossman D, and Fardel O. 2002. Potassium antimonyl tartrate induces reactive oxygen species-related apoptosis in human myeloid leukemic HL60 cells. *Int J Oncol* 20: 1071-6.
- Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, and Nakhasi HL. 2002. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death Differ* 9: 53-64.
- Legare D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof YD, Rosen BP, Haimeur A, Papadopoulou B, and Ouellette M. 2001. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem* 276: 26301-7.

- Leiper J, and Vallance P. 1999. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43: 542-8.
- Lemesre JL, Darcy F, Kweider M, Capron A, and Santoro F. 1988. Requirements of defined cultivation conditions for standard growth of *Leishmania* promastigotes in vitro. *Acta Trop* 45: 99-108.
- Lemesre JL, Sereno D, Daulouede S, Veyret B, Brajon N, and Vincendeau P. 1997. *Leishmania* spp.: nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically grown amastigote forms. *Exp Parasitol* 86: 58-68.
- Leon LL, Soares MJ, and Temporal RM. 1995. Effects of temperature on promastigotes of several species of *Leishmania*. *J Eukaryot Microbiol* 42: 219-23.
- Leon W, Fouts DL, and Manning J. 1978. Sequence arrangement of the 16S and 26S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellate *Leishmania donovani*. *Nucleic Acids Res* 5: 491-504.
- Lepoivre M, Fieschi F, Coves J, Thelander L, and Fontcave M. 1991. Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 179: 442-8.
- Lepoivre M, Flaman JM, and Henry Y. 1992. Early loss of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase of adenocarcinoma cells producing nitric oxide. *J Biol Chem* 267: 22994-3000.
- Lezama-Davila CM, and Gallagher G. 1995. CD4+, CD8+ and CD4- CD8- T cell-subsets can confer protection against *Leishmania m. mexicana* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 51-8.
- Li H, and Yuan J. 1999. Deciphering the pathways of life and death. *Curr Opin Cell Biol* 11: 261-6.
- Li HC, Yashiki S, Sonoda J, Lou H, Ghosh SK, Byrnes JJ, Lema C, Fujiyoshi T, Karasuyama M, and Sonoda S. 2000. Green tea polyphenols induce apoptosis in vitro in peripheral blood T lymphocytes of adult T-cell leukemia patients. *Jpn J Cancer Res* 91: 34-40.
- Li J, Sutterwala S, and Farrell JP. 1997. Successful therapy of chronic, nonhealing murine cutaneous leishmaniasis with sodium stibogluconate and gamma interferon depends on continued interleukin-12 production. *Infect Immun* 65: 3225-30.
- Liew FY, and Cox FE. 1991. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol Today* 12: A17-21.
- Liew FY, Howard JG, and Hale C. 1984. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. III. Protection against fatal *Leishmania tropica* infection induced by irradiated promastigotes involves Lyt-1+2- T cells that do not mediate cutaneous DTH. *J Immunol* 132: 456-61.
- Liew FY, Millott SM, and Schmidt JA. 1990. A repetitive peptide of *Leishmania* can activate T helper type 2 cells and enhance disease progression. *J Exp Med* 172: 1359-65.
- Linares E, Augusto O, Barao SC, and Giorgio S. 2000. *Leishmania amazonensis* infection does not inhibit systemic nitric oxide levels elicited by lipopolysaccharide in vivo. *J Parasitol* 86: 78-82.
- Lipton SA. 1993. Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Trends Neurosci* 16: 527-32.
- Liu X, and Chang KP. 1992. The 63-kilobase circular amplicon of tunicamycin-resistant *Leishmania amazonensis* contains a functional N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase gene that can be used as a dominant selectable marker in transfection. *Mol Cell Biol* 12: 4112-22.
- Lizasoain I, Moro MA, Knowles RG, Darley-Usmar V, and Moncada S. 1996. Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem J* 314: 877-80.
- Londner MV, Frankenburg S, Slutzky GM, and Greenblatt CL. 1983. Action of leishmanial excreted factor (EF) on human lymphocyte blast transformation. *Parasite Immunol* 5: 249-56.
- Lopez-Jaramillo P, Ruano C, Rivera J, Teran E, Salazar-Irigoyen R, Esplugues JV, and Moncada S. 1998. Treatment of cutaneous leishmaniasis with nitric-oxide donor. *Lancet* 351: 1176-7.
- Love DC, Esko JD, and Mosser DM. 1993. A heparin-binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans. *J Cell Biol* 123: 759-66.
- Love DC, Mentink Kane M, and Mosser DM. 1998. *Leishmania amazonensis*: the phagocytosis of amastigotes by macrophages. *Exp Parasitol* 88: 161-71.
- Lovelace JK, and Gottlieb M. 1986. Comparison of extracellular acid phosphatases from various isolates of *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg* 35: 1121-8.
- Lowenstein CJ, Glatt CS, Bredt DS, and Snyder SH. 1992. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6711-5.
- Lucumi A, Robledo S, Gama V, and Saravia NG. 1998. Sensitivity of *Leishmania viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1990-5.
- Lytton SD, Mozes E, and Jaffe CL. 1993. Effect of macrophage infection by *Leishmania* on the proliferation of an antigen-specific T-cell line, TPB1, to a non-parasite antigen. *Parasite Immunol* 15: 489-92.
- MacFarlane J, Blaxter ML, Bishop RP, Miles MA, and Kelly JM. 1990. Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. *Eur J Biochem* 190: 377-84.
- Malherbe L, Filippi C, Julia V, Foucras G, Moro M, Appel H, Wucherpfennig K, Guery JC, and Glischenhaus N. 2000. Selective activation and expansion of high-affinity CD4+ T cells in resistant mice upon infection with *Leishmania major*. *Immunity* 13: 771-82.

- Mallinson DJ, and Coombs GH. 1989a.** Biochemical characteristics of the metacyclic forms of *Leishmania major* and *L. mexicana mexicana*. *Parasitology* **98**: 7-15.
- Mallinson DJ, and Coombs GH. 1989b.** Interaction of leishmania metacyclics with macrophages. *Int J Parasitol* **19**: 647-56.
- Mallinson DJ, Lackie JM, and Coombs GH. 1989.** The oxidative response of rabbit peritoneal neutrophils to leishmanias and other trypanosomatids. *Int J Parasitol* **19**: 639-45.
- Marino M, Braun L, Cossart P, and Ghosh P. 1999.** Structure of the *lmlB* leucine-rich repeats, a domain that triggers host cell invasion by the bacterial pathogen *L. monocytogenes*. *Mol Cell* **4**: 1063-72.
- Martiny A, Meyer-Fernandes JR, de Souza W, and Vannier-Santos MA. 1999.** Altered tyrosine phosphorylation of ERK1 MAP kinase and other macrophage molecules caused by *Leishmania* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol* **102**: 1-12.
- Martiny A, Vannier-Santos MA, Borges VM, Meyer-Fernandes JR, Assreuy J, Cunha e Silva NL, and de Souza W. 1996.** *Leishmania*-induced tyrosine phosphorylation in the host macrophage and its implication to infection. *Eur J Cell Biol* **71**: 206-15.
- Marty P, Le Fichoux Y, Giordana D, and Brugnetti A. 1992.** Leishmanin reaction in the human population of a highly endemic focus of canine leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **86**: 249-50.
- Marty P, Le Fichoux Y, Pratlong F, and Gari-Toussaint M. 1994.** Human visceral leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France: epidemiological characteristics for the period 1985-1992. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **88**: 33-4.
- Marty P, Lelievre A, Quaranta JF, Rahal A, Gari-Toussaint M, and Le Fichoux Y. 1994.** Use of the leishmanin skin test and western blot analysis for epidemiological studies in visceral leishmaniasis areas: experience in a highly endemic focus in Alpes-Maritimes (France). *Trans R Soc Trop Med Hyg* **88**: 658-9.
- Marty P, Lelievre A, Quaranta JF, Suffia I, Eulalio M, Gari-Toussaint M, Le Fichoux Y, and Kubar J. 1995.** Detection by Western blot of four antigens characterizing acute clinical leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **89**: 690-1.
- Mary C, Auriault V, Faugere B, and Dessein AJ. 1999.** Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigen-specific T cells. *Infect Immun* **67**: 5559-66.
- Mathews SA, and Sriprakash KS. 1994.** R17 coat protein binding site: a convenient reporter for in vitro transcription. *Nucleic Acids Res* **22**: 534-5.
- Mattner J, Schindler H, Diefenbach A, Rollinghoff M, Gresser I, and Bogdan C. 2000.** Regulation of type 2 nitric oxide synthase by type 1 interferons in macrophages infected with *Leishmania major*. *Eur J Immunol* **30**: 2257-67.
- Mattson DL, Roman RJ, and Cowley AW, Jr. 1992.** Role of nitric oxide in renal papillary blood flow and sodium excretion. *Hypertension* **19**: 766-9.
- Mauel J. 1996.** Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol* **38**: 1-51.
- Mauel J, and Ransijn A. 1997.** *Leishmania* spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. *Exp Parasitol* **87**: 98-111.
- Mauel J, Ransijn A, Corradin SB, and Buchmuller-Rouiller Y. 1995.** Effect of PGE2 and of agents that raise cAMP levels on macrophage activation induced by IFN-gamma and TNF-alpha. *J Leukoc Biol* **58**: 217-24.
- Mayrink W, da Costa CA, Magalhaes PA, Melo MN, Dias M, Lima AO, Michalick MS, and Williams P. 1979.** A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **73**: 385-7.
- Mayrink W, Genaro O, Silva JC, da Costa RT, Tafuri WL, Toledo VP, da Silva AR, Reis AB, Williams P, and da Costa PW. 1996.** Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **91**: 695-7.
- Mayrink W, Magalhaes PA, Dias M, Da Costa CA, Melo MN, and Lima AO. 1978.** Responses to Montenegro antigen after immunization with killed *Leishmania* promastigotes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **72**: 676.
- Mayrink W, Williams P, da Costa CA, Magalhaes PA, Melo MN, Dias M, Oliveira Lima A, Michalick MS, Ferreira Carvalho E, Barros GC, and et al. 1985.** An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espirito Santo, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* **79**: 259-69.
- Mbow ML, Bleyenbergh JA, Hall LR, and Titus RG. 1998.** *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* **161**: 5571-7.
- McConnell EE, Chaffee EF, Cashell IG, and Garner FM. 1970.** Visceral leishmaniasis with ocular involvement in a dog. *J Am Vet Med Assoc* **156**: 197-203.
- McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MA, and Sacks DL. 1992.** Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *Embo J* **11**: 3593-600.
- McGurn M, Boon T, Louis JA, and Titus RG. 1990.** *Leishmania major*: nature of immunity induced by immunization with a mutagenized avirulent clone of the parasite in mice. *Exp Parasitol* **71**: 81-9.
- McKean PG, Delahay R, Pimenta PF, and Smith DF. 1997.** Characterisation of a second protein encoded by the differentially regulated *LmcDNA16* gene family of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* **85**: 221-31.

- McMahon-Pratt D, Rodriguez D, Rodriguez JR, Zhang Y, Manson K, Bergman C, Rivas L, Rodriguez JF, Lohman KL, Ruddle NH, and et al. 1993. Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against Leishmania infection. *Infect Immun* 61: 3351-9.
- McMaster WR, Morrison CJ, MacDonald MH, and Joshi PB. 1994. Mutational and functional analysis of the Leishmania surface metalloproteinase GP63: similarities to matrix metalloproteinases. *Parasitology* 108 Suppl: S29-36.
- McNeely TB, Rosen G, Londner MV, and Turco SJ. 1989. Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite Leishmania. *Biochem J* 259: 601-4.
- McNeely TB, and Turco SJ. 1987. Inhibition of protein kinase C activity by the Leishmania donovani lipophosphoglycan. *Biochem Biophys Res Commun* 148: 653-7.
- Medina-Acosta E, Karess RE, and Russell DG. 1993. Structurally distinct genes for the surface protease of Leishmania mexicana are developmentally regulated. *Mol Biochem Parasitol* 57: 31-45.
- Medina-Acosta E, Karess RE, Schwartz H, and Russell DG. 1989. The promastigote surface protease (gp63) of Leishmania is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. *Mol Biochem Parasitol* 37: 263-73.
- Melby PC, Ogden GB, Flores HA, Zhao W, Geldmacher C, Biediger NM, Ahuja SK, Uranga J, and Melendez M. 2000. Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library. *Infect Immun* 68: 5595-602.
- Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corasaniti MT, Nistico G, and Finazzi-Agro A. 1997. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature* 388: 432-3.
- Meller-Melloul C, Farnarier C, Dunan S, Faugere B, Franck J, Mary C, Bongrand P, Quilici M, and Kaplanski S. 1991. Evidence of subjects sensitized to Leishmania infantum on the French Mediterranean coast: differences in gamma interferon production between this population and visceral leishmaniasis patients. *Parasite Immunol* 13: 531-6.
- Messmer UK, Reimer DM, Reed JC, and Brune B. 1996. Nitric oxide induced poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in RAW 264.7 macrophage apoptosis is blocked by Bcl-2. *FEBS Lett* 384: 162-6.
- Mihas AA, Maliakkal RJ, Mihas TA, Kanji VK, and Markov AK. 1997. Effects of fructose-1,6-diphosphate on the activity of rat liver nitric oxide synthase in vitro. *Pharmacology* 54: 43-8.
- Millar AE, Sternberg J, McSharry C, Wei XQ, Liew FY, and Turner CM. 1999. T-Cell responses during Trypanosoma brucei infections in mice deficient in inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun* 67: 3334-8.
- Miller CM, Smith NC, and Johnson AM. 1999. Cytokines, nitric oxide, heat shock proteins and virulence in Toxoplasma. *Parasitol Today* 15: 418-22.
- Mitchell GF, and Handman E. 1986. The glycoconjugate derived from a Leishmania major receptor for macrophages is a suppressogenic, disease-promoting antigen in murine cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 8: 255-63.
- Mitsuyama T, Takeshige K, and Minakami S. 1993. Tyrosine phosphorylation is involved in the respiratory burst of electroporabilized human neutrophils at a step before diacylglycerol formation by phospholipase C. *FEBS Lett* 322: 280-4.
- Mittra B, Saha A, Chowdhury AR, Pal C, Mandal S, Mukhopadhyay S, Bandyopadhyay S, and Majumder HK. 2000. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Mol Med* 6: 527-41.
- Mnaimneh S, Geffard M, Veyret B, and Vincendeau P. 1997. Albumin nitrosylated by activated macrophages possesses antiparasitic effects neutralized by anti-NO-acetylated-cysteine antibodies. *J Immunol* 158: 308-14.
- Mohr S, Zech B, Lapetina EG, and Brune B. 1997. Inhibition of caspase-3 by S-nitrosation and oxidation caused by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 238: 387-91.
- Moll H. 1993. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today* 14: 383-7.
- Momeni AZ, Jalayer T, Emamjomeh M, Khamesipour A, Zicker F, Ghassemi RL, Dowlati Y, Sharifi I, Aminjavaheri M, Shafiei A, Alimohammadian MH, Hashemi-Fesharki R, Nasseri K, Godal T, Smith PG, and Modabber F. 1999. A randomised, double-blind, controlled trial of a killed L. major vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Vaccine* 17: 466-72.
- Moncada S, and Higgs EA. 1991. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 21: 361-74.
- Monjour L, Silva OA, Vouldoukis I, Neogy AB, Brito ME, Filho SP, and Jardim ML. 1992. Immunoprophylaxis in cutaneous leishmaniasis. *Lancet* 340: 1098-9.
- Monjour L, Vouldoukis I, Ogunkolade BW, Hetzel C, Ichen M, and Frommel D. 1988. Vaccination and treatment trials against murine leishmaniasis with semi-purified Leishmania antigens. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 412-5.
- Monteforte GM, Takeda K, Rodriguez-Sosa M, Akira S, David JR, and Satoskar AR. 2000. Genetically resistant mice lacking IL-18 gene develop Th1 response and control cutaneous Leishmania major infection. *J Immunol* 164: 5890-3.

- Moore KJ, Labrecque S, and Matlashewski G. 1993. Alteration of *Leishmania donovani* infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction. *J Immunol* 150: 4457-65.
- Moore KJ, and Matlashewski G. 1994. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol* 152: 2930-7.
- Morales G, Carrillo G, Requena JM, Guzman F, Gomez LC, Patarroyo ME, and Alonso C. 1997. Mapping of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* gp63 protein recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Parasitology* 114: 507-16.
- Moreira ME, Del Portillo HA, Milder RV, Balanco JM, and Barcinski MA. 1996. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J Cell Physiol* 167: 305-13.
- Moreno J, Nieto J, Chamizo C, Gonzalez F, Blanco F, Barker DC, and Alva J. 1999. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 71: 181-95.
- Morisato D, and Anderson KV. 1994. The spatzie gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Cell* 76: 677-88.
- Mosleh IM, Saliba EK, al-Khateeb MS, Bisharat Z, Oumeish OY, and Bitar W. 1995. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis in Jordan using indirect fluorescent antibody test and the enzyme-linked immunosorbent assay. *Acta Trop* 59: 163-72.
- Mossalayi MD, Arock M, Mazier D, Vincendeau P, and Vouldoukis I. 1999. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. *Parasitol Today* 15: 342-5.
- Mosser DM, and Edelson PJ. 1984. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *J Immunol* 132: 1501-5.
- Mosser DM, and Edelson PJ. 1985. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J Immunol* 135: 2785-9.
- Mosser DM, and Rosenthal LA. 1993. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin Cell Biol* 4: 315-22.
- Mosser DM, Vlassara H, Edelson PJ, and Cerami A. 1987. *Leishmania* promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation endproducts. *J Exp Med* 165: 140-5.
- Mottram JC, Robertson CD, Coombs GH, and Barry JD. 1992. A developmentally regulated cysteine proteinase gene of *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol* 6: 1925-32.
- Mottram JC, Souza AE, Hutchison JE, Carter R, Frame MJ, and Coombs GH. 1996. Evidence from disruption of the *lmcpg* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6008-13.
- Mougueau E, Altare F, Wakil AE, Zheng S, Coppola T, Wang ZE, Waldmann R, Locksley RM, and Gleichenhau N. 1995. Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science* 268: 563-6.
- Mukerji K, Pal A, Basu D, Naskar K, Mallick KK, and Ghosh DK. 1991. Direct enzyme-linked immunosorbent assay: a simple immunoassay using *Leishmania donovani* promastigote for diagnosis of kala-azar. *J Clin Lab Anal* 5: 299-301.
- Mukherjee SB, Das M, Sudhandiran G, and Shaha C. 2002. Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Biol Chem* 277: 24717-27.
- Mukhopadhyay R, Dey S, Xu N, Gage D, Lightbody J, Ouellette M, and Rosen BP. 1996. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10383-7.
- Mukhopadhyay S, Sen P, Bhattacharyya S, Majumdar S, and Roy S. 1999. Immunoprophylaxis and immunotherapy against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine* 17: 291-300.
- Mukkada AJ, Meade JC, Glaser TA, and Bonventre PF. 1985. Enhanced metabolism of *Leishmania donovani* amastigotes at acid pH: an adaptation for intracellular growth. *Science* 229: 1099-101.
- Murray HW, and Delph-Etienne S. 2000. Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 68: 288-93.
- Nandan D, Lo R, and Reiner NE. 1999. Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-FOS and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 67: 4055-63.
- Nandan D, and Reiner NE. 1995. Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1. *Infect Immun* 63: 4495-500.
- New RR, Chance ML, and Heath S. 1981. Antileishmanial activity of amphotericin and other antifungal agents entrapped in liposomes. *J Antimicrob Chemother* 8: 371-81.
- Nicotera P, Brune B, and Bagetta G. 1997. Nitric oxide: inducer or suppressor of apoptosis? *Trends Pharmacol Sci* 18: 189-90.

- Nieto CG, Garcia-Alonso M, Requena JM, Miron C, Soto M, Alonso C, and Navarrete I. 1999. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 67: 117-30.
- Nolan TJ, and Farrell JP. 1985. Inhibition of in vivo and in vitro infectivity of *Leishmania donovani* by tunicamycin. *Mol Biochem Parasitol* 16: 127-35.
- Noll TM, Desponds C, Belli SI, Glaser TA, and Fasel NJ. 1997. Histone H1 expression varies during the *Leishmania* major life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 84: 215-27.
- Nomura Y, Uehara T, and Nakazawa M. 1996. Neuronal apoptosis by glial NO: involvement of inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Hum Cell* 9: 205-14.
- Noronha FS, Cruz JS, Beirao PS, and Horta MF. 2000. Macrophage damage by *Leishmania amazonensis* cytolysin: evidence of pore formation on cell membrane. *Infect Immun* 68: 4578-84.
- Noronha FS, Ramalho-Pinto FJ, and Horta MF. 1994. Identification of a putative pore-forming hemolysin active at acid pH in *Leishmania amazonensis*. *Braz J Med Biol Res* 27: 477-82.
- Okong'o-Odera EA, Kurtzhals JA, Hey AS, and Kharazmi A. 1993. Measurement of serum antibodies against native *Leishmania* gp63 distinguishes between ongoing and previous *L. donovani* infection. *Apmis* 101: 642-6.
- Okong'o-Odera EA, Wamachi A, Kagai JM, Kurtzhals JA, Githure JI, Hey AS, Were JB, Koech DK, Mitema ES, and Kharazmi A. 1993. Field application of an ELISA using redefined *Leishmania* antigens for the detection of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 423-4.
- O'Leary V, and Solberg M. 1976. Effect of sodium nitrite inhibition on intracellular thiol groups and on the activity of certain glycolytic enzymes in *Clostridium perfringens*. *Appl Environ Microbiol* 31: 208-12.
- Olie RA, Durrieu F, Cornillon S, Loughran G, Gross J, Earnshaw WC, and Golstein P. 1998. Apparent caspase independence of programmed cell death in *Dictyostelium*. *Curr Biol* 8: 955-8.
- Oliveira DM, Silva-Teixeira DN, Carmo SA, and Goes AM. 1998. Role of nitric oxide on human schistosomiasis mansonii: upregulation of in vitro granuloma formation by N omega-nitro-L-arginine methyl ester. *Nitric Oxide* 2: 57-65.
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, da Costa SC, and Pirmez C. 1997. Intralesional therapy of American cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazil—an area of *Leishmania* (V.) braziliensis transmission. *Int J Dermatol* 36: 463-8.
- Olivier M, Baimbridge KG, and Reiner NE. 1992. Stimulus-response coupling in monocytes infected with *Leishmania*. Attenuation of calcium transients is related to defective agonist-induced accumulation of inositol phosphates. *J Immunol* 148: 1188-96.
- Olivier M, Brownsey RW, and Reiner NE. 1992. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7481-5.
- Olivier M, Eslami Z, and Tanner CE. 1996. IL-2-stimulated splenocytes reduce infections by *Leishmania donovani* in vivo. *J Parasitol* 82: 78-81.
- Olivier M, Romero-Gallo BJ, Matte C, Blanchette J, Posner BI, Tremblay MJ, and Faure R. 1998. Modulation of interferon-gamma-induced macrophage activation by phosphotyrosine phosphatases inhibition. Effect on murine *Leishmaniasis* progression. *J Biol Chem* 273: 13944-9.
- Olobo JO, Anjili CO, Gicheru MM, Mbatia PA, Kariuki TM, Githure JI, Koech DK, and McMaster WR. 1995. Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniasis using recombinant *Leishmania* 'major surface glycoprotein' (gp63). *Vet Parasitol* 60: 199-212.
- Ouellette M, and Borst P. 1991. Drug resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. *Res Microbiol* 142: 737-46.
- Pacheco RS, Martinez JE, Valderrama L, Momen H, and Saravia NG. 1995. Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol* 69: 197-209.
- Palmer RM, Ferrige AG, and Moncada S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-6.
- Pan AA. 1984. *Leishmania mexicana*: serial cultivation of intracellular stages in a cell-free medium. *Exp Parasitol* 58: 72-80.
- Pan Q, Liu YS, Budai-Hadrian O, Sela M, Carmel-Goren L, Zamir D, and Fluhr R. 2000. Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and arabidopsis. *Genetics* 155: 309-22.
- Panaro MA, Fasanella A, Lisi S, Mitolo V, Andriola A, and Brandonisio O. 1998. Evaluation of nitric oxide production by *Leishmania infantum*-infected dog macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 20: 147-58.
- Panaro MA, Lisi S, Mitolo V, Acquafredda A, Fasanella A, Carelli MG, and Brandonisio O. 1998. Evaluation of killing, superoxide anion and nitric oxide production by *Leishmania infantum*-infected dog monocytes. *Cytobios* 95: 151-60.
- Panaro MA, Panunzio M, Jirillo E, Marangi A, and Brandonisio O. 1995. Parasite escape mechanisms: the role of *Leishmania* lipophosphoglycan on the human phagocyte functions. A review. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 17: 595-605.
- Papadopoulou B, Roy G, Mourad W, Leblanc E, and Ouellette M. 1994. Changes in folate and pterin metabolism after disruption of the *Leishmania* H locus short chain dehydrogenase gene. *J Biol Chem* 269: 7310-5.

- Pardo J, Perez-Galan P, Gamen S, Marzo I, Monleon I, Kaspar AA, Susin SA, Kroemer G, Krensky AM, Naval J, and Anel A. 2001. A role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis. *J Immunol* 167: 1222-9.
- Park AY, Hondowicz BD, and Scott P. 2000. IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. *J Immunol* 165: 896-902.
- Pateraki E, Portocala R, Labrousse H, and Guesdon JL. 1983. Antiactin and antitubulin antibodies in canine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 42: 496-500.
- Pays E, Hanocq-Quertier J, Hanocq F, Van Assel S, Nolan D, and Rolin S. 1993. Abrupt RNA changes precede the first cell division during the differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms into procyclic forms in vitro. *Mol Biochem Parasitol* 61: 107-14.
- Pearson RD, and Steigbigel RT. 1980. Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. *J Immunol* 125: 2195-201.
- Pearson RD, and Steigbigel RT. 1981. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 127: 1438-43.
- Pearson RD, Sullivan JA, Roberts D, Romito R, and Mandell GL. 1983. Interaction of *Leishmania donovani* promastigotes with human phagocytes. *Infect Immun* 40: 411-6.
- Pearson RD, Wheeler DA, Harrison LH, and Kay HD. 1983. The immunobiology of leishmaniasis. *Rev Infect Dis* 5: 907-927.
- Peters C, Kawakami M, Kaul M, Ilg T, Overath P, and Aebischer T. 1997. Secreted proteophosphoglycan of *Leishmania mexicana* amastigotes activates complement by triggering the mannan binding lectin pathway. *Eur J Immunol* 27: 2666-72.
- Piani A, Ilg T, Elefanty AG, Curtis J, and Handman E. 1999. *Leishmania major* proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function. *Microbes Infect* 1: 589-99.
- Piarroux R, Azaiez R, Lossi AM, Reynier P, Muscatelli F, Gambarelli F, Fontes M, Dumon H, and Quilici M. 1993. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 49: 364-9.
- Picot SJ, Youngblut J, and Zeller R. 1997. Development and testing of a measure of perceived caregiver rewards in adults. *J Nurs Meas* 5: 33-52.
- Piedrafita D, Xu D, Hunter D, Harrison RA, and Liew FY. 1999. Protective immune responses induced by vaccination with an expression genomic library of *Leishmania major*. *J Immunol* 163: 1467-72.
- Pimenta PF, da Silva RP, Sacks DL, and da Silva PP. 1989. Cell surface nanoanatomy of *Leishmania major* as revealed by fracture-flip. A surface meshwork of 44 nm fusiform filaments identifies infective developmental stage promastigotes. *Eur J Cell Biol* 48: 180-90.
- Pimenta PF, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, and Sacks DL. 1997. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* 115: 359-69.
- Pimienta PF, and de Souza W. 1986. Structural observations on the attachment of promastigotes of *Leishmania mexicana amazonensis* to the surface of macrophages. *Microsc Electron Biol Celular* 10: 65-75.
- Pinelli E, Boog CJ, Rutten VP, van Dijk B, Bernadina WE, and Ruitenber EJ. 1994. A canine CD8+ cytotoxic T-cell line specific for *Leishmania infantum*-infected macrophages. *Tissue Antigens* 43: 189-92.
- Pinelli E, Gebhard D, Mommaas AM, van Hoeij M, Langermans JA, Ruitenber EJ, and Rutten VP. 2000. Infection of a canine macrophage cell line with *leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Vet Parasitol* 92: 181-9.
- Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, and Ruitenber J. 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 62: 229-35.
- Poon R, and Chu I. 2000. Effects of trivalent antimony on human erythrocyte glutathione-S-transferases. *J Biochem Mol Toxicol* 14: 169-76.
- Pratlong F, Portus M, Rispail P, Moreno G, Bastien P, and Rioux JA. 1989. [Simultaneous presence in dogs of 2 zymodemes of the *Leishmania infantum* complex]. *Ann Parasitol Hum Comp* 64: 312-4.
- Prina E, Antoine JC, Wiederanders B, and Kirschke H. 1990. Localization and activity of various lysosomal proteases in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages. *Infect Immun* 58: 1730-7.
- Prina E, Lang T, Glaichenhaus N, and Antoine JC. 1996. Presentation of the protective parasite antigen LACK by *Leishmania*-infected macrophages. *J Immunol* 156: 4318-27.
- Proudfoot L, Nikolaev AV, Feng GJ, Wei WQ, Ferguson MA, Brimacombe JS, and Liew FY. 1996. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10984-9.
- Proudfoot L, O'Donnell CA, and Liew FY. 1995. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol* 25: 745-50.
- Puentes SM, Sacks DL, da Silva RP, and Joiner KA. 1988. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* 167: 887-902.

- Quijada L, Requena JM, Soto M, Gomez LC, Guzman F, Patarroyo ME, and Alonso C. 1996. Mapping of the linear antigenic determinants of the *Leishmania infantum* hsp70 recognized by leishmaniasis sera. *Immunol Lett* 52: 73-9.
- Quilici M, Dunan S, Dumon H, Franck J, Gambarelli F, Toga I, Perrimond H, Michel G, and Mattei M. 1987. [Infantile Mediterranean kala-azar in the southeast of France. Current considerations]. *Ann Pediatr (Paris)* 34: 369-73.
- Rachamim N, and Jaffe CL. 1993. Pure protein from *Leishmania donovani* protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis. *J Immunol* 150: 2322-31.
- Rafati S, Baba AA, Bakhshayesh M, and Vafa M. 2000. Vaccination of BALB/c mice with *Leishmania major* amastigote-specific cysteine proteinase. *Clin Exp Immunol* 120: 134-8.
- Ramamoorthy R, Donelson JE, Paetz KE, Maybodi M, Roberts SC, and Wilson ME. 1992. Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of *Leishmania donovani* chagasi promastigotes to an infectious form. *J Biol Chem* 267: 1888-95.
- Ramos A, Maslov DA, Fernandes O, Campbell DA, and Simpson L. 1996. Detection and identification of human pathogenic *Leishmania* and *Trypanosoma* species by hybridization of PCR-amplified mini-exon repeats. *Exp Parasitol* 82: 242-50.
- Reiner NE, and Malemud CJ. 1985. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxxygenase pathways. *J Immunol* 134: 556-63.
- Reiner NE, Ng W, and McMaster WR. 1987. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J Immunol* 138: 1926-32.
- Reiner SL, and Locksley RM. 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 13: 151-77.
- Remaley AT, Glew RH, Kuhns DB, Basford RE, Waggoner AS, Ernst LA, and Pope M. 1985. *Leishmania donovani*: surface membrane acid phosphatase blocks neutrophil oxidative metabolite production. *Exp Parasitol* 60: 331-41.
- Requena JM, Alonso C, and Soto M. 2000. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol Today* 16: 246-50.
- Rey-Ladino JA, Joshi PB, Singh B, Gupta R, and Reiner NE. 1997. *Leishmania major*: molecular cloning, sequencing, and expression of the heat shock protein 60 gene reveals unique carboxy terminal peptide sequences. *Exp Parasitol* 85: 249-63.
- Rhalem A, Sahibi H, Lasri S, and Jaffe CL. 1999. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet Immunol Immunopathol* 71: 69-76.
- Ridgley EL, Xiong ZH, and Ruben L. 1999. Reactive oxygen species activate a Ca²⁺-dependent cell death pathway in the unicellular organism *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochem J* 340: 33-40.
- Riha WE, Jr., and Solberg M. 1971. Chemically defined medium for the growth of *Clostridium perfringens*. *Appl Microbiol* 22: 738-9.
- Rivier D, Shah R, Bovay P, and Mauel J. 1993. Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge. *Parasite Immunol* 15: 75-84.
- Rizvi FS, Ouassii MA, Marty B, Santoro F, and Capron A. 1988. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a fibronectin-like molecule. *Eur J Immunol* 18: 473-6.
- Roberts M, Alexander J, and Blackwell JM. 1989. Influence of Lsh, H-2, and an H-11-linked gene on visceralization and metastasis associated with *Leishmania mexicana* infection in mice. *Infect Immun* 57: 875-81.
- Roberts M, Mock BA, and Blackwell JM. 1993. Mapping of genes controlling *Leishmania major* infection in CXS recombinant inbred mice. *Eur J Immunogenet* 20: 349-62.
- Roberts SC, Wilson ME, and Donelson JE. 1995. Developmentally regulated expression of a novel 59-kDa product of the major surface protease (Msp or gp63) gene family of *Leishmania chagasi*. *J Biol Chem* 270: 8884-92.
- Roberts WL, and Rainey PM. 1993. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1842-6.
- Robertson CD. 1999. The *Leishmania mexicana* proteasome. *Mol Biochem Parasitol* 103: 49-60.
- Robertson CD, and Coombs GH. 1990. Characterisation of three groups of cysteine proteinases in the amastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 42: 269-76.
- Robertson CD, and Coombs GH. 1993. Cathepsin B-like cysteine proteases of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 62: 271-9.
- Robinson D, Shibuya K, Mui A, Zonin F, Murphy E, Sana T, Hartley SB, Menon S, Kastelein R, Bazan F, and O'Garra A. 1997. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity* 7: 571-81.
- Rockett KA, Awburn MM, Cowden WB, and Clark IA. 1991. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect Immun* 59: 3280-3.
- Rodrigues V, Jr., Santana da Silva J, and Campos-Neto A. 1998. Transforming growth factor beta and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 66: 1233-6.

- Rolland L, Belkaid M, Seye A, Schneider P, and Gentilini M. 1995.** Detection of serum antibodies against Leishmania 94 kDa antigen in visceral and cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Parasite* **2**: 13-21.
- Rolland L, and Mookambeswaran Vijayalakshmi SV. 1993.** [A fraction derived from non-protector extract of *Leishmania infantum* protects Balb/c mice against *Leishmania major* infection]. *C R Acad Sci III* **316**: 1342-9.
- Rosenthal PJ. 1999.** Proteases of protozoan parasites. *Adv Parasitol* **43**: 105-59.
- Rossi V, Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, and Bastien P. 1994.** Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. *Mol Biochem Parasitol* **65**: 271-82.
- Rothberg JM, Jacobs JR, Goodman CS, and Artavanis-Tsakonas S. 1990.** slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev* **4**: 2169-87.
- Russell DG, and Alexander J. 1988.** Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *J Immunol* **140**: 1274-9.
- Russell DG, and Wilhelm H. 1986.** The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J Immunol* **136**: 2613-20.
- Russell DG, and Wright SD. 1988.** Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania* promastigotes. *J Exp Med* **168**: 279-92.
- Russo DM, Burns JM, Jr., Carvalho EM, Armitage RJ, Grabstein KH, Button LL, McMaster WR, and Reed SG. 1991.** Human T cell responses to gp63, a surface antigen of *Leishmania*. *J Immunol* **147**: 3575-80.
- Russo DM, Chakrabarti P, and Higgins AY. 1999.** *Leishmania*: naive human T cells sensitized with promastigote antigen and IL-12 develop into potent Th1 and CD8(+) cytotoxic effectors. *Exp Parasitol* **93**: 161-70.
- Saar Y, Ransford A, Waldman E, Mazareb S, Amin-Spector S, Plumblee J, Turco SJ, and Zilberstein D. 1998.** Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* **95**: 9-20.
- Sacerdoti-Sierra N, and Jaffe CL. 1997.** Release of ecto-protein kinases by the protozoan parasite *Leishmania major*. *J Biol Chem* **272**: 30760-5.
- Sacks DL. 1989.** Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* **69**: 100-3.
- Sacks DL. 2001.** *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol* **3**: 189-96.
- Sacks DL, Hieny S, and Sher A. 1985.** Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J Immunol* **135**: 564-9.
- Sacks DL, and Perkins PV. 1984.** Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* **223**: 1417-9.
- Sacks DL, and Perkins PV. 1985.** Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *Am J Trop Med Hyg* **34**: 456-9.
- Sacks DL, Pimenta PF, McConville MJ, Schneider P, and Turco SJ. 1995.** Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* **181**: 685-97.
- Salvati L, Mattu M, Colasanti M, Scalone A, Venturini G, Gradoni L, and Ascenzi P. 2001.** NO donors inhibit *Leishmania infantum* cysteine proteinase activity. *Biochim Biophys Acta* **1545**: 357-66.
- Santana DM, Borja-Cabrera GP, Paraguai de Souza E, Sturm NR, Palatnik de Sousa CB, and Campbell DA. 2002.** Nucleoside hydrolase from *Leishmania* (L.) *donovani* is an antigen diagnostic for visceral leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol* **120**: 315-9.
- Sanyal T, Ghosh DK, and Sarkar D. 1994.** Immunoblotting identifies an antigen recognized by anti gp63 in the immune complexes of Indian kala-azar patient sera. *Mol Cell Biochem* **130**: 11-7.
- Sartori A, Oliveira MA, Scott P, and Trinchieri G. 1997.** Metacyclogenesis modulates the ability of *Leishmania* promastigotes to induce IL-12 production in human mononuclear cells. *J Immunol* **159**: 2849-57.
- Sato N, Mizumoto K, Maehara N, Kusumoto M, Nishio S, Urashima T, Ogawa T, and Tanaka M. 2000.** Enhancement of drug-induced apoptosis by antisense oligodeoxynucleotides targeted against Mdm2 and p21WAF1/CIP1. *Anticancer Res* **20**: 837-42.
- Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, Mignone W, Turilli C, Mondesire RR, Simpson D, Donoghue AR, Frank GR, and Gradoni L. 2002.** Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol* **104**: 275-85.
- Scharton TM, and Scott P. 1993.** Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J Exp Med* **178**: 567-77.
- Schlein Y, Jacobson RL, and Messer G. 1992.** *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 9944-8.
- Schlein Y, Jacobson RL, and Shlomai J. 1991.** Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **245**: 121-6.
- Schneider P, Bordier C, and Etges R. 1992.** Membrane proteins and enzymes of *Leishmania*. *Subcell Biochem* **18**: 39-72.

- Schnur LF, Sarfstein R, and Jaffe CL. 1990. Monoclonal antibodies against leishmanial membranes react with specific excreted factors (EF). *Ann Trop Med Parasitol* 84: 447-56.
- Schnur LF, and Zuckerman A. 1975. Proceedings: Leishmanial serotypes: a preliminary report on strains from Sudan, Ethiopia and Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 69: 434-5.
- Schnur LF, and Zuckerman A. 1977. Leishmanial excreted factor (EF) serotypes in Sudan, Kenya and Ethiopia. *Ann Trop Med Parasitol* 71: 273-94.
- Schnur LF, Zuckerman A, and Greenblatt CL. 1972. Leishmanial serotypes as distinguished by the gel diffusion of factors excreted in vitro and in vivo. *Isr J Med Sci* 8: 932-42.
- Schurch N, Hehl A, Vassella E, Braun R, and Roditi I. 1994. Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. *Mol Cell Biol* 14: 3668-75.
- Scott P, and Sher A. 1986. A spectrum in the susceptibility of leishmanial strains to intracellular killing by murine macrophages. *J Immunol* 136: 1461-6.
- Searle S, Campos AJ, Coulson RM, Spithill TW, and Smith DF. 1989. A family of heat shock protein 70-related genes are expressed in the promastigotes of *Leishmania major*. *Nucleic Acids Res* 17: 5081-95.
- Serebriakov VA, Karakhodzhaeva S, Ni GV, Belozeroval OD, and Safarov GI. 1968. [First experience in the organization and realization of mass leishmania vaccinations of a rural population]. *Med Parazit (Mosk)* 37: 651-4.
- Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouaisi A, and Lemesre JL. 1998. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 3097-102.
- Sereno D, and Lemesre JL. 1997. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 972-6.
- Sereno D, Michon P, Brajon N, and Lemesre JL. 1997. Phenotypic characterization of *Leishmania mexicana* pentamidine-resistant promastigotes. Modulation of the resistance during in-vitro developmental life cycle. *C R Acad Sci III* 320: 981-7.
- Shakarian AM, and Dwyer DM. 2000a. Pathogenic leishmania secrete antigenically related chitinases which are encoded by a highly conserved gene locus. *Exp Parasitol* 94: 238-42.
- Shakarian AM, and Dwyer DM. 2000b. Structurally conserved soluble acid phosphatases are synthesized and released by *Leishmania major* promastigotes. *Exp Parasitol* 95: 79-84.
- Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M, and Zilberstein D. 2001. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 276: 3971-6.
- Sharifi I, FeKri AR, Aflatonian MR, Khamesipour A, Nadim A, Mousavi MR, Momeni AZ, Dowlati Y, Godal T, Zicker F, Smith PG, and Modabber F. 1998. Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *Lancet* 351: 1540-3.
- Sharquie KE, Najim RA, and Farjou IB. 1997. A comparative controlled trial of intralesionally-administered zinc sulphate, hypertonic sodium chloride and pentavalent antimony compound against acute cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 22: 169-73.
- Shiddo SA, Akuffo HO, Mohamed AA, Hult G, Nilsson LA, Ouchterlony O, and Thorstensson R. 1995. Visceral leishmaniasis in Somalia: prevalence of leishmanin-positive and seropositive inhabitants in an endemic area. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89: 21-4.
- Sibley LD, Krahenbuhl JL, and Weidner E. 1985. Lymphokine activation of J774G8 cells and mouse peritoneal macrophages challenged with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 49: 760-4.
- Sideris V, Papadopoulou G, Dotsika E, and Karagouni E. 1999. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *Eur J Epidemiol* 15: 271-6.
- Silva Mendez LS, Allaker RP, Hardie JM, and Benjamin N. 1999. Antimicrobial effect of acidified nitrite on cariogenic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 14: 391-2.
- Simpson L, Neckelmann N, de la Cruz VF, Simpson AM, Feagin JE, Jasmer DP, and Stuart JE. 1987. Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. *J Biol Chem* 262: 6182-96.
- Singh AK, and Lee ST. 1999. Status of respiration and ATP content in arsenite resistant *Leishmania mexicana amazonensis*. *Microb Pathog* 26: 171-4.
- Singh AK, Papadopoulou B, and Ouellette M. 2001. Gene amplification in amphotericin B-resistant *Leishmania tarentolae*. *Exp Parasitol* 99: 141-7.
- Singh S, Gilman-Sachs A, Chang KP, and Reed SG. 1995. Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. *J Parasitol* 81: 1000-3.
- Sjolander A, Baldwin TM, Curtis JM, Bengtsson KL, and Handman E. 1998. Vaccination with recombinant Parasite Surface Antigen 2 from *Leishmania major* induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection. *Vaccine* 16: 2077-84.
- Skeiky YA, Benson DR, Elwasila M, Badaro R, Burns JM, Jr., and Reed SG. 1994. Antigens shared by *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*: immunological comparison of the acidic ribosomal P0 proteins. *Infect Immun* 62: 1643-51.

- Skeiky YA, Benson DR, Guderian JA, Whittle JA, Bacelar O, Carvalho EM, and Reed SG. 1995. Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. *Infect Immun* 63: 4105-14.
- Skeiky YA, Guderian JA, Benson DR, Bacelar O, Carvalho EM, Kubin M, Badaro R, Trinchieri G, and Reed SG. 1995. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *J Exp Med* 181: 1527-37.
- Skeiky YA, Kennedy M, Kaufman D, Borges MM, Guderian JA, Scholler JK, Ovendale PJ, Picha KS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Campos-Neto A, and Reed SG. 1998. LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. *J Immunol* 161: 6171-9.
- Slutzky GM, El-On J, and Greenblatt CL. 1979. Leishmanial excreted factor: protein-bound and free forms from promastigote cultures of *Leishmania tropica* and *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 26: 916-24.
- Slutzky GM, and Greenblatt CL. 1977. Isolation of a carbohydrate-rich immunologically active factor from cultures of *Leishmania tropica*. *FEBS Lett* 80: 401-4.
- Slutzky GM, and Greenblatt CL. 1979. Analysis by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of an immunologically active factor of *Leishmania tropica* from growth media, promastigotes, and infected macrophages. *Biochem Med* 21: 70-7.
- Smith DF, Gokool S, Keen JK, McKean PG, and Rangarajan D. 1994. Structure and function of infective stage proteins of *Leishmania*. *Biochem Soc Trans* 22: 286-91.
- Soong L, Duboise SM, Kima P, and McMahon-Pratt D. 1995. *Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 63: 3559-66.
- Sorensen AL, Hey AS, and Kharazmi A. 1994. *Leishmania* major surface protease Gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. *Apmis* 102: 265-71.
- Soteriadou KP, Remoundos MS, Katsikas MC, Tzinia AK, Tsikaris V, Sakarellos C, and Tzartos SJ. 1992. The Ser-Arg-Tyr-Asp region of the major surface glycoprotein of *Leishmania* mimics the Arg-Gly-Asp-Ser cell attachment region of fibronectin. *J Biol Chem* 267: 13980-5.
- Soto M, Requena JM, Garcia M, Gomez LC, Navarrete I, and Alonso C. 1993. Genomic organization and expression of two independent gene arrays coding for two antigenic acidic ribosomal proteins of *Leishmania*. *J Biol Chem* 268: 21835-43.
- Soto M, Requena JM, Gomez LC, Navarrete I, and Alonso C. 1992. Molecular characterization of a *Leishmania donovani* infantum antigen identified as histone H2A. *Eur J Biochem* 205: 211-6.
- Soto M, Requena JM, Morales G, and Alonso C. 1994. The *Leishmania infantum* histone H3 possesses an extremely divergent N-terminal domain. *Biochim Biophys Acta* 1219: 533-5.
- Soto M, Requena JM, Quijada L, and Alonso C. 1996. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. *Clin Diagn Lab Immunol* 3: 387-91.
- Soto M, Requena JM, Quijada L, Gomez LC, Guzman F, Patarroyo ME, and Alonso C. 1996. Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 106: 454-61.
- Soto M, Requena JM, Quijada L, Guzman F, Patarroyo ME, and Alonso C. 1995. Identification of the *Leishmania infantum* P0 ribosomal protein epitope in canine visceral leishmaniasis. *Immunol Lett* 48: 23-8.
- Soto M, Requena JM, Quijada L, Perez MJ, Nieto CG, Guzman F, Patarroyo ME, and Alonso C. 1999. Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 115: 342-9.
- Souza AE, Bates PA, Coombs GH, and Mottram JC. 1994. Null mutants for the *lmcpa* cysteine proteinase gene in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 63: 213-20.
- Souza AE, Waugh S, Coombs GH, and Mottram JC. 1992. Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. *FEBS Lett* 311: 124-7.
- Spath GF, Epstein L, Leader B, Singer SM, Avila HA, Turco SJ, and Beverley SM. 2000. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9258-63.
- Spitzer N, Jardim A, Lippert D, and Olafson RW. 1999. Long-term protection of mice against *Leishmania major* with a synthetic peptide vaccine. *Vaccine* 17: 1298-300.
- Stager S, Smith DF, and Kaye PM. 2000. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *J Immunol* 165: 7064-71.
- Steller H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-9.
- Stenger S, Donhauser N, Thuring H, Rollinghoff M, and Bogdan C. 1996. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med* 183: 1501-14.
- Stenger S, Thuring H, Rollinghoff M, and Bogdan C. 1994. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med* 180: 783-93.
- Stierhof YD, Bates PA, Jacobson RL, Rogers ME, Schlein Y, Handman E, and Ilg T. 1999. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *Eur J Cell Biol* 78: 675-89.
- Stierhof YD, Ilg T, Russell DG, Hohenberg H, and Overath P. 1994. Characterization of polymer release from the flagellar pocket of *Leishmania mexicana* promastigotes. *J Cell Biol* 125: 321-31.

- Streit JA, Recker TJ, Donelson JE, and Wilson ME. 2000. BCG expressing LCR1 of *Leishmania chagasi* induces protective immunity in susceptible mice. *Exp Parasitol* 94: 33-41.
- Stuehr DJ, Kwon NS, and Nathan CF. 1990. FAD and GSH participate in macrophage synthesis of nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 168: 558-65.
- Stuehr DJ, and Nathan CF. 1989. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169: 1543-55.
- Sundar S, Agrawal NK, Sinha PR, Horwith GS, and Murray HW. 1997. Short-course, low-dose amphotericin B lipid complex therapy for visceral leishmaniasis unresponsive to antimony. *Ann Intern Med* 127: 133-7.
- Sundar S, Rosenkaimer F, and Murray HW. 1994. Successful treatment of refractory visceral leishmaniasis in India using antimony plus interferon-gamma. *J Infect Dis* 170: 659-62.
- Symons FM, Murray PJ, Ji H, Simpson RJ, Osborn AH, Cappai R, and Handman E. 1994. Characterization of a polymorphic family of integral membrane proteins in promastigotes of different *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol* 67: 103-13.
- Sypek JP, Chung CL, Mayor SE, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, Wolf SF, and Schaub RG. 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med* 177: 1797-802.
- Talamas-Rohana P, Wright SD, Lennartz MR, and Russell DG. 1990. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150,95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. *J Immunol* 144: 4817-24.
- Taylor-Robinson AW, and Phillips RS. 1994. Expression of the IL-1 receptor discriminates Th2 from Th1 cloned CD4+ T cells specific for *Plasmodium chabaudi*. *Immunology* 81: 216-21.
- Tebourski F, el Gaied A, Louzir H, Ben Ismail R, Kammoun R, and Dellagi K. 1994. Identification of an immunodominant 32-kilodalton membrane protein of *Leishmania donovani* infantum promastigotes suitable for specific diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 32: 2474-80.
- Teixeira SM. 1998. Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz J Med Biol Res* 31: 1503-16.
- Thakur CP, Kanyok TP, Pandey AK, Sinha GP, Zaniewski AE, Houlihan HH, and Olliaro P. 2000. A prospective randomized, comparative, open-label trial of the safety and efficacy of paromomycin (aminosidine) plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone for the treatment of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 429-31.
- Tibayrenc M, Kjellberg F, Arnaud J, Oury B, Breniere SF, Darde ML, and Ayala FJ. 1991. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5129-33.
- Tirmenstein MA, Nicholls-Grzemeski FA, Schmittgen TD, Zakrajsek BA, and Fariss MW. 2000. Glutathione-dependent regulation of nitric oxide production in isolated rat hepatocyte suspensions. *Antioxid Redox Signal* 2: 767-77.
- Titus RG, Gueiros-Filho FJ, de Freitas LA, and Beverley SM. 1995. Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10267-71.
- Tolomeo M, Dusonchet L, Meli M, Grimaudo S, D'Alessandro N, Papoff G, Ruberti G, and Rausa L. 1998. The CD95/CD95 ligand system is not the major effector in anticancer drug-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 5: 735-42.
- Traub-Cseko YM, Duboise M, Boukai LK, and McMahon-Pratt D. 1993. Identification of two distinct cysteine proteinase genes of *Leishmania pifanoi* axenic amastigotes using the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 57: 101-15.
- Trudeau C, Yuan S, Galipeau J, Benlimame N, Alaoui-Jamali MA, and Batist G. 2001. A novel parasite-derived suicide gene for cancer gene therapy with specificity for lung cancer cells. *Hum Gene Ther* 12: 1673-80.
- Turco SJ. 1988. Proposal for a function of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochem Soc Trans* 16: 259-61.
- Turco SJ. 1999. Adversarial relationship between the *leishmania* lipophosphoglycan and protein kinase C of host macrophages. *Parasite Immunol* 21: 597-600.
- Tzeng E, Billiar TR, Williams DL, Li J, Lizonova A, Kovesdi I, and Kim YM. 1998. Adenovirus-mediated inducible nitric oxide synthase gene transfer inhibits hepatocyte apoptosis. *Surgery* 124: 278-83.
- Ulczak OM, and Blackwell JM. 1983. Immunoregulation of genetically controlled acquired responses to *Leishmania donovani* infection in mice: the effects of parasite dose, cyclophosphamide and sublethal irradiation. *Parasite Immunol* 5: 449-63.
- Uliana SR, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, and Floeter-Winter LM. 1994. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *J Eukaryot Microbiol* 41: 324-30.
- Ullman B. 1995. Multidrug resistance and P-glycoproteins in parasitic protozoa. *J Bioenerg Biomembr* 27: 77-84.
- Vanhamme L, and Pays E. 1995. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev* 59: 223-40.
- Velez ID, del Pilar Agudelo S, Arbelaez MP, Gilchrist K, Robledo SM, Puerta JA, Zicker F, Berman J, and Modabber F. 2000. Safety and immunogenicity of a killed *Leishmania* (L.) amazonensis vaccine against cutaneous leishmaniasis in Colombia: a randomized controlled trial. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 698-703.
- Vercammen F, Berkvens D, Brandt J, and Vansteenkiste W. 1998. A sensitive and specific 30-min Dot-ELISA for the detection of anti-leishmania antibodies in the dog. *Vet Parasitol* 79: 221-8.

- Vinayak VK, Mahajan D, Sobti RC, Singla N, and Sundar S. 1994. Anti-66 kDa antileishmanial antibodies as specific immunodiagnostic probe for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res* 99: 109-14.
- Vincendeau P, Daulouede S, Veyret B, Darde ML, Bouteille B, and Lemesre JL. 1992. Nitric oxide-mediated cytostatic activity on *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Exp Parasitol* 75: 353-60.
- von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, and Udey MC. 1998. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med* 188: 1547-52.
- Vouldoukis I, Drapier JC, Nussler AK, Tselentis Y, Da Silva OA, Gentilini M, Mossalayi DM, Monjour L, and Dugas B. 1996. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 253-6.
- Wali JP, Aggarwal P, Gupta U, Saluja S, and Singh S. 1992. Ketoconazole in the treatment of antimony- and pentamidine-resistant kala-azar. *J Infect Dis* 166: 215-6.
- Walker PS, Scharton-Kersten T, Rowton ED, Hengge U, Boulouc A, Udey MC, and Vogel JC. 1998. Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T cell type 1 immune response and protection in a murine model of leishmaniasis. *Hum Gene Ther* 9: 1899-907.
- Walters LL, Chaplin GL, Modi GB, and Tesh RB. 1989. Ultrastructural biology of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* (= *Leishmania braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. *Am J Trop Med Hyg* 40: 19-39.
- Walters LL, Modi GB, Chaplin GL, and Tesh RB. 1989. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 41: 295-317.
- Walters LL, Modi GB, Tesh RB, and Burrage T. 1987. Host-parasite relationship of *Leishmania mexicana mexicana* and *Lutzomyia abnottensis* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 36: 294-314.
- Warburg A, Saraiva E, Lanzaro GC, Titus RG, and Neva F. 1994. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345: 223-30.
- Warburg A, and Schlein Y. 1986. The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg* 35: 926-30.
- Webb JR, Campos-Neto A, Ovendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, and Reed SG. 1998. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect Immun* 66: 3279-89.
- Webb JR, Kaufmann D, Campos-Neto A, and Reed SG. 1996. Molecular cloning of a novel protein antigen of *Leishmania major* that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. *J Immunol* 157: 5034-41.
- Webb JR, and McMaster WR. 1994. *Leishmania major* HEXBP deletion mutants generated by double targeted gene replacement. *Mol Biochem Parasitol* 63: 231-42.
- Weigle K, and Saravia NG. 1996. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. *Clin Dermatol* 14: 433-50.
- Weinberg JB, Chapman HA, Jr., and Hibbs JB, Jr. 1978. Characterization of the effects of endotoxin on macrophage tumor cell killing. *J Immunol* 121: 72-80.
- Weiss G, Goossen B, Doppler W, Fuchs D, Pantopoulos K, Werner-Felmayer G, Wachter H, and Hentze MW. 1993. Translational regulation via iron-responsive elements by the nitric oxide/NO-synthase pathway. *Embo J* 12: 3651-7.
- Welburn SC, Lillico S, and Murphy NB. 1999. Programmed cell death in procyclic form *Trypanosoma brucei rhodesiense* --identification of differentially expressed genes during con A induced death. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 229-34.
- Welburn SC, and Murphy NB. 1998. Prohibitin and RACK homologues are up-regulated in trypanosomes induced to undergo apoptosis and in naturally occurring terminally differentiated forms. *Cell Death Differ* 5: 615-22.
- Wiese M. 1998. A mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue of *Leishmania mexicana* is essential for parasite survival in the infected host. *Embo J* 17: 2619-28.
- Wiese M, Ilg T, Lottspeich F, and Overath P. 1995. Ser/Thr-rich repetitive motifs as targets for phosphoglycan modifications in *Leishmania mexicana* secreted acid phosphatase. *Embo J* 14: 1067-74.
- Wiesigil M, and Clos J. 2001. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol Biol Cell* 12: 3307-16.
- Wilson ME, Andersen KA, and Britigan BE. 1994. Response of *Leishmania chagasi* promastigotes to oxidant stress. *Infect Immun* 62: 5133-41.
- Wilson ME, and Hardin KK. 1990. The major *Leishmania donovani* chagasi surface glycoprotein in tunicamycin-resistant promastigotes. *J Immunol* 144: 4825-34.
- Wilson ME, Hardin KK, and Donelson JE. 1989. Expression of the major surface glycoprotein of *Leishmania donovani* chagasi in virulent and attenuated promastigotes. *J Immunol* 143: 678-84.
- Wilson ME, and Pearson RD. 1986. Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. *J Immunol* 136: 4681-8.

- Wilson ME, and Pearson RD. 1988. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 56: 363-9.
- Wilson ME, Young BM, Andersen KP, Weinstock JV, Metwali A, Ali KM, and Donelson JE. 1995. A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice. *Infect Immun* 63: 2062-9.
- Wilson SM, McNerney R, Moreno MB, Frame I, and Miles MA. 1992. Adaptation of a radioactive *L. donovani* complex DNA probe to a chemiluminescent detection system gives enhanced sensitivity for diagnostic and epidemiological applications. *Parasitology* 104: 421-6.
- Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Jauffret Y, Dedet JP, and Bastien P. 1996. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* 24: 1688-94.
- Wink DA, Osawa Y, Darbyshire JF, Jones CR, Eshenaur SC, and Nims RW. 1993. Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch Biochem Biophys* 300: 115-23.
- Wolfram M, Fuchs M, Wiese M, Stierhof YD, and Overath P. 1996. Antigen presentation by *Leishmania mexicana*-infected macrophages: activation of helper T cells by a model parasite antigen secreted into the parasitophorous vacuole or expressed on the amastigote surface. *Eur J Immunol* 26: 3153-62.
- Wolfram M, Ilg T, Mottram JC, and Overath P. 1995. Antigen presentation by *Leishmania mexicana*-infected macrophages: activation of helper T cells specific for amastigote cysteine proteinases requires intracellular killing of the parasites. *Eur J Immunol* 25: 1094-100.
- Wolga JI, Stahl JP, Gaillat J, Ribeiro CD, and Micoud M. 1983. [Immune and autoimmune manifestations of autochthonous visceral leishmaniasis with liver, kidney and vascular involvement]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 76: 369-76.
- Wozencraft AO, and Blackwell JM. 1987. Increased infectivity of stationary-phase promastigotes of *Leishmania donovani*: correlation with enhanced C3 binding capacity and CR3-mediated attachment to host macrophages. *Immunology* 60: 559-63.
- Wrighton SA, and Stevens JC. 1992. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* 22: 1-21.
- Xie K, Wang Y, Huang S, Xu L, Bielenberg D, Salas T, McConkey DJ, Jiang W, and Fidler IJ. 1997. Nitric oxide-mediated apoptosis of K-1735 melanoma cells is associated with downregulation of Bcl-2. *Oncogene* 15: 771-9.
- Xu D, and Liew FY. 1994. Genetic vaccination against leishmaniasis. *Vaccine* 12: 1534-6.
- Xu D, McSorley SJ, Chatfield SN, Dougan G, and Liew FY. 1995. Protection against *Leishmania* major infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA-AroD-). *Immunology* 85: 1-7.
- Zangger H, Mottram JC, and Fasel N. 2002. Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death Differ* 9: 1126-39.
- Zeina B, Banfield C, and al-Assad S. 1997. Topical glyceryl trinitrate: a possible treatment for cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 22: 244-5.
- Zemzoumi K, Guilvard E, Sereno D, Preto A, Benlemlih M, Da Silva AC, Lemesre JL, and Ouaisi A. 1999. Cloning of a *Leishmania* major gene encoding for an antigen with extensive homology to ribosomal protein S3a. *Gene* 240: 57-65.
- Zhang JZ, Henning SM, and Swendseid ME. 1993. Poly(ADP-ribose) polymerase activity and DNA strand breaks are affected in tissues of niacin-deficient rats. *J Nutr* 123: 1349-55.
- Zhou M, and Brown EJ. 1993. Leukocyte response integrin and integrin-associated protein act as a signal transduction unit in generation of a phagocyte respiratory burst. *J Exp Med* 178: 1165-74.
- Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Granger H, Geppetti P, and Ledda F. 1993. Nitric oxide promotes DNA synthesis and cyclic GMP formation in endothelial cells from postcapillary venules. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 1198-203.
- Zilberstein D, and Dwyer DM. 1985. Protonmotive force-driven active transport of D-glucose and L-proline in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 1716-20.
- Zilberstein D, and Dwyer DM. 1988. Identification of a surface membrane proton-translocating ATPase in promastigotes of the parasitic protozoan *Leishmania donovani*. *Biochem J* 256: 13-21.
- Zilberstein D, and Shapira M. 1994. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 48: 449-70.

RESUME en français

Les leishmanioses sont des réticulo-endothélioses parasitaires dues à un protozoaire du genre *Leishmania*. Elles causent un grand nombre d'affections humaines, allant des lésions cutanées simples à guérison spontanée aux infections viscérales dont l'issue est souvent fatale. Les leishmanies sont des protozoaires parasites ayant un cycle de développement digénétique, avec une forme promastigote flagellée chez l'insecte vecteur, et une forme amastigote intracellulaire sans flagelle émergent, colonisant les phagocytes mononucléés des hôtes vertébrés. La résistance aux infections leishmanienues dépend de la destruction des parasites intracellulaires par les macrophages activés de l'hôte infecté, via la voie de biosynthèse du monoxyde d'azote (NO). Lorsque la pathologie est déclarée, le traitement basique de la leishmaniose consiste en l'administration de dérivés de l'antimoine (Glucantime®). Disposant au laboratoire d'un système alternatif à l'expérimentation animale consistant en la modélisation *in vitro*, en conditions axéniques et asexuées, du cycle de développement parasitaire complet des leishmanies, il nous a été possible d'étudier les effets directs des deux molécules leishmanicides majeures sur le stade médicalement important, le stade amastigote. Ainsi, nous montrons pour la première fois, que ces deux molécules leishmanicides majeures (i.e. NO et antimoine) exercent leur activité cytotoxique par l'induction d'une mort cellulaire ayant les caractéristiques phénotypiques de l'apoptose.

D'autre part, la culture *in vitro* nous a permis de sélectionner par pression médicamenteuse des formes amastigotes chimiorésistantes à la pentamidine mais aussi à un dérivé trivalent (SbIII) de l'antimoine, l'antimonio tartrate de potassium. Nous montrons dans un premier temps que les amastigotes résistants au SbIII restaient sensibles aux médicaments anti-leishmaniens de seconde intention (i.e. pentamidine et amphotéricine B). Dans un deuxième temps, nous démontrons que le caractère chimiorésistant peut être transmis et que sa stabilité est dépendante du degré de chimiorésistance induite. L'adaptation des parasites à leur environnement ainsi que la compétition entre souches peuvent également intervenir dans les modalités de cette transmission.

Enfin, partant du modèle de chimiorésistance *in vitro* et des résultats d'induction d'une mort apoptotique tant par l'antimoine que par le NO, nous avons mis en évidence l'existence d'une résistance croisée entre ces deux molécules. Forts de ces résultats et utilisant un donneur de NO synthétique adéquat mimant la production de NO par des macrophages activés (DETA/NONONOate), nous avons sélectionné *in vitro* des formes amastigotes de *Leishmania* mutantes capables de résister à l'effet leishmanicide du NO. L'analyse phénotypique des mutants, et notamment la surexpression de cibles moléculaires du NO, nous permettra de définir de nouvelles cibles thérapeutiques et nous ouvre des perspectives intéressantes d'études pharmacologiques sur de nouveaux principes actifs anti-leishmaniens.

TITRE en anglais

Study of cellular and molecular mechanisms involved in the protective immunity (nitric oxide) and chemotherapeutic (antimony) molecules' microbicidal activity in *Leishmania*.

RESUME en anglais

Leishmaniasis is a significant cause of morbidity and mortality in tropical and subtropical areas. *Leishmania* species are responsible for a wide range of human disease, from the self-healing cutaneous lesions to fatal visceral infections. These protozoan parasites have a digenetic life cycle, which includes a flagellate promastigote form in the sandfly vector, and a non-flagellate intracellular amastigote stage within the mononuclear phagocytes of vertebrate hosts. The antimicrobial effect of activated macrophages on parasites involves nitric oxide (NO), that induces intracellular parasite killing. Treatment of leishmaniasis basically consists in injection of antimony (Pentostam®). The recent development of axenically grown amastigotes of different *Leishmania* species in completely defined medium has opened new opportunities in the direct study of these two major leishmanicidal molecules' effects on the clinically relevant stage of the parasite, the amastigote stage. Thus, we demonstrated for the first time that both major leishmanicidal molecules exert their cytotoxicity by the induction of a DNA fragmentation characteristic of apoptosis.

Then, the *in vitro* culture of *Leishmania* amastigotes made possible an artificial induction of pentamidine and trivalent antimonials (SbIII) chemoresistance. We demonstrated in a first time that SbIII-resistant amastigotes were still sensitive to second line drugs (i.e. pentamidine et amphotericin B). In a second time, we shown that the chemoresistant property acquired was conserved during the *in vitro* parasite life cycle and depended on the level of resistance induced. Environmental conditions and competition between strains may also modulate the transmission of such chemoresistance.

Finally, starting from the results of apoptosis induction by both NO and antimony, and by the use of SbIII-resistant amastigotes, we highlighted a cross-resistance between the two major leishmanicidal molecules. Using a suitable nitric oxide donating compound (DETA/NONONOate), we selected mutant amastigotes of *Leishmania* that were able to resist NO action. Phenotypic characterisation of these mutants, with a special interest in the NO molecular targets overexpressed, would define new therapeutic targets and open new pharmacological approaches in the research of anti-*Leishmania* drugs.

DISCIPLINE : 65.

MOTS CLES : *Leishmania*, amastigotes, monoxyde d'azote (NO), antimoine, apoptose, chimiorésistance.

LABORATOIRE : UR 008 Pathogénie des Trypanosomatidés, I.R.D. Montpellier.
