

N° d'ordre

ACADEMIE DE MONTPELLIER
UNIVERSITE MONTPELLIER II
--SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC--

THESE

Présentée à l'université de Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

SPECIALITE: BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ECOLOGIE

Formation doctorale : Parasitologie

Ecole doctorale : CBS2

**Chimiosensibilité et chimiorésistance chez *Leishmania*: transmission
au cours du cycle de développement parasitaire *in vitro*.**

par

Denis SERENO

Soutenue le 3 Juin 1997 Devant le jury composé de :

M. RAIBAUT André	Professeur Montpellier II	Président
M. VINCENDEAU Philippe	Professeur Bordeaux II	Rapporteur
Mme. DENIAU Michèle	Professeur Paris XII	Rapporteur
M. OUAISSI Ali	Directeur de recherche INSERM	Examineur
M. LEMESRE Jean Loup	Chargé de recherche ORSTOM	Directeur de thèse
M. FREZIL Jean Louis	Directeur de recherche ORSTOM	Directeur de thèse

A Ashkan

Au terme de ce travail je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le docteur Jean Louis FREZIL. La confiance que vous avez bien voulu me témoigner, a été pour moi le meilleur encouragement. Veuillez trouver ici, Mr Frezil, ma très profonde gratitude.

A Monsieur le Dr Jean Loup LEMESRE, les heures passées à discuter du sujet et le temps que vous m'avez consacré m'ont permis de mener à bien ce projet. Je suis très heureux d'avoir fait tout ce parcours avec vous. J'ai effectué cette thèse dans de très bonnes conditions à vos côtés. Je vous dois une très grande partie de mes connaissances sur la leishmaniose et je tiens à vous exprimer mes très sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur RAIBAUT, qui m'a fait l'honneur d'accepter de faire partie du Jury. Veuillez trouver ici l'expression de mes respectueux remerciements.

A Monsieur le professeur VINCENDEAU, vous qui avez très aimablement et spontanément accepté de juger ce travail. Qu'il me soit permis de vous exprimer mes très sincères remerciements.

A Madame le Professeur DENIAU, vous avez tout de suite accepté de juger ce travail. Soyez-en chaleureusement remerciée.

A Monsieur Ali OUAISSI, Directeur de recherche, qui m'a fait ce grand honneur d'être examinateur de la thèse. Je vous en remercie infiniment.

Monsieur le Docteur Christian BELLEC, je vous remercie de m'avoir reçu au sein de l'UR.

Mes remerciements vont également:

A tous mes collègues qui sont ou étaient dans le laboratoire de Biologie Parasitaire: je pense notamment à Mireille Cavaleyra, Philippe Hozmuller, Sarah Maquaire, Nathalie Brajon, Florence Fournet, Agnes Lecardinal, Carine Periere, Marie Pierre Blanc, Estelle, Alex...

A Anne Laure Banùls (belle de nuit de l'ORSTOM) pour sa gentillesse et ses connaissances sur le typage des parasites.

A toute l'équipe du CEPM, au Dr Michel Tibayrenc et Bruno Oury, Frédérique, Issa, Sylvain, Christian...

A Francine et Sylvie les superbes secrétaires du département santé, pour leur aide et leur sourire.

Au personnel de la bibliothèque de l'ORSTOM pour leur disponibilité.

Au personnel de l'animalerie et notamment à Eric, pour sa patience malgré toutes les gardes ratées.

Je n'oublierai certainement pas tous les membres du personnel du département santé de l'ORSTOM, qui m'ont beaucoup aidé durant ces années. Je tiens à leur exprimer ma profonde reconnaissance.

J'ai une pensée particulière pour:

Pascal Grebaut vaincu au Space oh!! à ce jour, maître du monde au Risk et maire envié de tous ses concitoyens de Simcity.

Eric Précigout, le cyber-prof, pour les repas culturels et scientifiques très fréquents et hautement gastronomiques et à Christiane pour ses dons culinaires longtemps réprimés par son mari. Rendez vous au Fitz.

Nanar , dit «le roi de la Bio Mol» entouré de son harem, qui ne cesse de s'agrandir.

Pascal Michon, isolé en Amérique mais pour combien de temps?

Stéphane, Géraldine et leur nombreuse progéniture!

Claire gentille organisatrice de nos soirées du vendredi soir, ainsi qu'à Isabelle.

Tous mes amis (la famille du boulevard Malaussena) Vincent, Dr Kiki, Dr Philou et son armoire, la Mite.

Titi, un ami très cher avec qui j'ai tant de souvenirs sur les bancs du lycée jusqu'à ceux de la fac en passant par l'église, merci pour ton soutien et ton amitié.

L'incontournable, le formidable, le grandiose futur Dr Biscotte et ses doubles hybrides (j'attends toujours l'explication).

Mon couple d'amis, Isa et Bob, tantôt parisiens tantôt méridionaux, pas toujours en même temps d'ailleurs.

A Cécile et Laurent , je vous remercie de votre amitié .

A tous les amis de la fac avec qui nous avons tant fêté les examens.

Enfin et surtout je tiens à remercier mon épouse Niloufar, qui m'a soutenu et encouragé toutes ces années, avec bonne humeur et patience!!!! ma mère et toute ma famille: Nadine, Christophe et mon beau père Michel. Je vous remercie pour le soutien constant que vous m'avez témoigné.

RESUME

Les problèmes rencontrés lors des traitements de patients atteints de leishmaniose nous ont amené à rechercher les raisons permettant d'expliquer ces cas. Ceux-ci peuvent être dus soit à une faible chimiosensibilité du stade parasitaire présent chez l'hôte soit à des phénomènes de chimiorésistance. Durant ces dernières années le Laboratoire de Biologie Parasitaire (ORSTOM) a concentré ses efforts sur l'obtention d'un système alternatif à l'expérimentation animale consistant à la production continue, en conditions contrôlées, du stade intracellulaire des différentes espèces de leishmanies. Ces modèles biologiques ont permis d'évaluer la sensibilité de la forme présente chez l'hôte infecté aux composés microbicides produits par les macrophages activés, notamment à l'oxyde nitrique (NO). Ainsi, nous avons pu montrer que le NO possède des activités leishmanicide et leishmaniostatique directement dirigées contre les deux stades parasitaires de *Leishmania*. L'étude de différentes activités enzymatiques du cycle de Krebs nous a permis de mettre en évidence une inhibition sélective de la *cis*-aconitase qui serait un des mécanismes conduisant à la lyse des formes parasitaires par le NO. La détermination des profils de chimiosensibilité des formes amastigotes de différentes espèces de leishmanies comparativement aux formes promastigotes a révélé tout l'intérêt de l'utilisation d'un test de criblage d'activités leishmanicides directement sur le stade parasitaire médicalement important. Ce modèle expérimental offre de multiples avantages par rapport aux méthodes classiques de criblage: (i) il est possible de déterminer l'activité antileishmanienne directement sur une population active de formes amastigotes (ii) elle rend possible l'analyse des différences de chimiosensibilité/résistance entre espèces et souches de leishmanie (iii) couplée à des expériences d'interaction parasite-macrophage, elle permet de déterminer le rôle joué par le macrophage dans la toxicité d'un composé.

Les échecs thérapeutiques et les rechutes après chimiothérapie sont les problèmes majeurs rencontrés dans le traitement des parasitoses. Ces problèmes sont à relier avec l'émergence des phénomènes de chimiorésistance. La mise au point d'un modèle de chimiorésistance *in vitro* sur le stade amastigote nous a permis de caractériser les différents phénotypes de résistances à la pentamidine et de cerner pour la première fois les modalités de la transmission de ceux-ci au cours du cycle de développement parasitaire. Ainsi nous démontrons que la transmission du caractère de chimiorésistance est dépendant du degré de résistance induite. Ces résultats 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.

ABSTRACT

Treatment failure in leishmaniasis is becoming an increasingly important problem in many areas where leishmaniasis is endemic. The reasons of unresponsiveness could be due either to a decrease in chemosusceptibility of the mammalian stage of the parasite or to drug resistance phenomenon. The recent development of axenically-grown amastigotes of different leishmania species has opened new opportunities in the analysis of the chemosusceptibility of the relevant medical stage of the parasite. The antimicrobial effect of activated macrophages and in particular the effect of nitric oxide (NO) was evaluated. After NO treatment, the viability of parasites gradually decreased as a function of time, interestingly NO killing was more effective on promastigote forms than on amastigote forms. Moreover the NO action led to lethal metabolic inhibition by, at least in part, triggering iron loss from enzyme(s) with iron-sulfur prosthetic groups, in particular aconitase.

We have compared the activities of seven drugs, including those currently used to treat leishmaniasis, against axenically-grown amastigote and promastigote forms of three leishmania species. Collectively the results demonstrate the potential of using cultured amastigotes instead of promastigotes in a drug-screening procedure for early detection. This *in vitro* model presents numerous technical advantages over traditional early drug-screening procedure: (i) it is possible to analyze drug activity directly on an active and dividing population of amastigote forms (ii) sensitivities of new isolates of *leishmania* can also be ascertained rapidly (iii) with *in vitro* models using macrophages, the influence of macrophages on drug activity can be analyzed.

There is now strong indication that treatment failure may be partly due to parasite drug resistance. Using a continuous drug pressure protocol, we have induced pentamidine resistance on an active and dividing population of amastigote forms. Our results strongly indicate that the level of pentamidine tolerated by resistant amastigotes after life cycle was dependent on the induced-level of resistance. This fact could be significant in the *in vivo* transmission of drug resistant parasites by *Phlebotominae*. Particular attention should be given to the finding that the emergence of parasite resistance is a potential risk of inadequate dose therapy in man.

RESUME/ABSTRACT

SOMMAIRE

CHAPITRE 1: Introduction et Généralités	1
I. GENERALITE DE PARASITOLOGIE	2
A. Position systématique du genre <i>Leishmania</i>	2
B. Incidence de la leishmaniose	2
C. Répartition géographique	3
D. Cycle Biologique	3
II. INTERACTION HOTE-PARASITE	5
A. L'infection par <i>Leishmania</i>	6
1. La métacyclogénèse des promastigotes	6
2. Reconnaissance des formes promastigotes de leishmanie par le macrophage	8
2.1. Les récepteurs des macrophages	
2.2. Rôle des molécules de surface de <i>Leishmania</i>	
3. Développement des formes amastigotes à l'intérieur des cellules phagocytaires	10
3.1. La vésicule parasitophore	
3.2. Différenciation des formes promastigotes en formes amastigotes	
3.2.1. Perturbation des messagers secondaires du macrophage	
3.2.2. Adaptation des parasites aux conditions intracellulaires: le pH et la température	
4. Interaction amastigote-macrophage	13
B. Réponse immunitaire de l'hôte	13
1. le jeu des cytokines et la réponse à médiation cellulaire	13
2. Les mécanismes microbicides du macrophage ou immunité non spécifique	14

III. TRAITEMENT DES LEISHMANIOSES	16
A. Arsenal thérapeutique classique	16
1. Traitement par chimiothérapie systémique	16
1.1. Les dérivés stibiés	
1.1.1. Traitement et toxicité	
1.1.2. Pharmacocinétique	
1.1.3. Mode d'action	
1.2. La pentamidine	
1.2.1. Traitement et toxicité	
1.2.2. Pharmacocinétique	
1.2.3. Mode d'action	
1.3. L'amphotéricine B	
1.3.1. Traitement et toxicité	
1.3.2. Pharmacocinétique	
1.3.3. Mode d'action	
1.4. L'allopurinol	
1.4.1. Traitement et toxicité	
2. Traitement local des leishmanioses cutanées	23
2.1. Méthodes physiques	
2.2. Chimiothérapie en traitement local.	
B. La vectorisation de principes actifs	24
1. Vectorisation des dérivés de l'antimoine	24
2. Vectorisation de la pentamidine	24
3. Vectorisation de l'amphotericine B	25
C. Immunothérapie et chimiothérapie combinées	25
IV. RECHERCHES DE NOUVEAUX ANTILEISHMANIENS: LES VOIES DE RECHERCHES FONDAMENTALES	28
A. Recherches pharmacologiques	28

1. Recherche de principes actifs issus de phytothérapie: l'ethnopharmacologie	28
2. Les méthodes de criblages	29
2.1. Modèles <i>in vitro</i>	
2.2. Modèles <i>in vivo</i>	
3. L'ingénierie moléculaire	30

B. Recherches parasitologiques fondamentales 30

1. Le trypanothion et son métabolisme	30
2. La stratégie antisens	33

V. LA CHIMIORESISTANCE	34
-------------------------------	-----------

A. Mécanismes responsables d'une chimiorésistance 34

1. Mécanismes intracellulaires	34
1.1. Mécanismes de détoxification	
1.2. Mécanismes impliquant la cible biochimique de la drogue	
2. Mécanismes membranaires	36
2.1. Les P-glycoprotéines	
2.2. Altération de l'entrée de la drogue	

B. Mécanismes connus chez *Leishmania* 38

1. Les P-glycoprotéines	38
1.1. Le gène pgpA	
1.2. Le gène pgpE	
1.3. Les gènes <i>ldmdr1</i> et <i>lemdr1</i>	
2. Altération de l'entrée de la drogue	40
3. Altération de la cible biochimique de la drogue	40
3.1. Surexpression de l'enzyme cible	
3.2. Altération des propriétés enzymatiques	

VI. OBJECTIF DU TRAVAIL	42
--------------------------------	-----------

I. TRAVAUX PERSONNELS AYANT DONNE LIEU A PUBLICATIONS ET SOUMIS POUR PUBLICATIONS**44**

I. Sensibilité et mécanisme effecteur de l'oxyde nitrique chez les formes amastigotes de différentes espèces de leishmanies.

(Accepté pour publication, *Experimental Parasitology*) **45**

II. Mise en place d'une microméthode enzymatique permettant de déterminer la viabilité et la croissance des formes amastigotes de culture axénique de *Leishmania amazonensis*.

(Accepté pour publication, *Parasitology Research*). **58**

III. L'utilisation des formes amastigotes de culture axénique dans un modèle de criblage précoce d'activité leishmanicide.

(Accepté pour publication, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*). **63**

IV. Action de la pentamidine sur les caractéristiques ultrastructurales des formes promastigotes et amastigotes de *Leishmania mexicana*.

(Soumis pour publication, *Memorias Instituto de Oswaldo Cruz*) **70**

V. Caractérisation phénotypique des formes promastigotes chimiorésistantes à la pentamidine de *L. mexicana*: Sélection : transmission de la résistance au cours du cycle de développement parasitaire *in vitro*.

(Soumis pour publication, *Parasitology Research*) **75**

VI. Sélection de variants amastigotes chimiorésistants à la pentamidine: caractérisation et étude de la transmission au cours du cycle de développement parasitaire.

(Soumis pour publication, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*) **97**

II. AUTRES RESULTATS**120**

I. La perte de virulence des formes promastigotes de *Leishmania amazonensis* résistantes à la pentamidine est associée à un dysfonctionnement du cycle de développement parasitaire (En préparation). 121

II. La croissance et la viabilité des formes amastigotes de *L. amazonensis* ne peuvent être correctement évaluées par un test utilisant l'Alamar Bleu. 148

CHAPITRE 3: Discussion 152

CHAPITRE 4: Références bibliographiques 165

CHAPITRE 1: INTRODUCTION ET GENERALITES.

CHAPITRE 1: Introduction et Généralités

Les leishmanioses constituent un groupe complexe d'affections parasitaires de répartition mondiale. Elles sont connues depuis longtemps sur le continent européen, en Asie et au moyen orient. Si les premières descriptions cliniques des leishmanioses tégumentaires d'Amérique latine datent de l'invasion espagnole au XVI^e siècle, ces affections sont en fait beaucoup plus anciennes, puisqu'elles ont pu être mises en évidence dès l'époque précolombienne.

Ce sont des maladies parasitaires à transmission vectorielle dont l'agent pathogène est un protozoaire flagellé, *Leishmania*, de la famille des *Trypanosomatidae*. Le genre *Leishmania* comprend de nombreuses espèces qui se différencient entre autres par des caractères extrinsèques (tels la répartition géographique, les insectes vecteurs, les réservoirs et les manifestations cliniques) et des facteurs intrinsèques (techniques d'identification telles que les isoenzymes). En effet, ce protozoaire a la particularité de provoquer des tableaux cliniques qui diffèrent par leur localisation, 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.

Le traitement de la leishmaniose pose de sérieux problèmes du fait de l'augmentation des cas de non-réponse aux traitements classiques que constituent les dérivés pentavalents de l'antimoine et la pentamidine.

La mise au point de culture axénique des formes amastigotes de différentes espèces de leishmanies a ouvert des perspectives intéressantes dans (i) l'étude de la chimiosensibilité et de la chimiorésistance (ii) la compréhension de l'action des mécanismes microbicides du macrophage. Ces études n'avaient jusqu'alors été effectuées que sur la forme promastigote, représentative du stade parasite présent chez l'insecte vecteur.

D'autre part la caractérisation et la réalisation *in vitro* du cycle complet de développement parasite ouvrent de nouvelles perspectives de recherches non seulement appliquées dans les études portant sur la transmission des phénomènes de chimiorésistance chez *Leishmania* mais aussi plus fondamentales dans l'étude des facteurs de virulence et de leurs éventuelles implications dans la régulation du cycle de développement parasite chez *Leishmania*.

I. GENERALITES DE PARASITOLOGIE.

A. Position systématique du genre *Leishmania*.

La classification du genre *Leishmania* d'après Levine 1980 (in Lainson & Shaw, 1987) est la suivante:

Règne: *Protista*

Sous-règne: *Protozoa*

Phylum: *Sarcomastigophora*

Classe: *Zoomastigophorea*

Ordre: *Kinetoplastida*

Sous ordre: *Trypanosomatina*

Famille: *Trypanosomatidae*

Genre: *Leishmania*

Le genre *Leishmania* est divisé en deux sous-genres en fonction du mode de développement du parasite chez le vecteur. Le sous-genre *Leishmania* a un développement suprapylorique (les flagellés se situent à la jonction de l'intestin moyen, mésentéron et de l'intestin postérieur). Les espèces appartenant au sous genre *Viannia* se développent au niveau péripylorique (les flagellés se situent indifféremment soit dans l'intestin moyen, soit dans l'intestin postérieur).

B. Incidence de la leishmaniose.

D'après les estimations de l'O.M.S (1990), 350 millions de personnes sont exposées au risque de contracter la maladie et le nombre de sujets infectés est d'environ 12 millions. Ceci montre qu'en zone d'endémie, les leishmanioses constituent un véritable problème de santé publique. C'est pourquoi, les leishmanioses ont été classées au cinquième rang mondial des maladies parasitaires. D'autre part les leishmanioses ont été classées comme une des maladies opportunistes du SIDA. En fait toutes les causes d'immunodépression cellulaire comme les infections à VIH, 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). En Espagne, en Italie et en France le nombre de co-infection leishmanies-SIDA est en augmentation (Berenger *et al.*, 1989; Montalban *et al.*, 1989, 1990; Medrano *et al.*, 1992; Tata *et al.*, 1993; Pratlong *et al.*, 1993; Hernandez *et al.*, 1993; Marty *et al.*, 1994a, 1994b; Alvar, 1994). En France, dans les Alpes maritimes, 2% des sujets séropositifs pour le VIH présentent une leishmaniose, ils représentent 40% des cas de leishmaniose recensés (Marty *et al.*, 1994a; 1994b). Même si peu de cas sont reportés en Amérique du sud et en Inde, il cependant semble inévitable que de telles coinfections se développent (De Gorgolas et Miles, 1994).

C. Répartition géographique.

Dans son ensemble, le genre *Leishmania* est répandu dans le monde entier. Deux groupes de foyers endémiques se distinguent classiquement selon leur localisation géographique:

- les leishmanioses de l'ancien monde: le bassin méditerranéen (dont tout le sud de la France), le proche, le moyen, l'extrême orient et l'Afrique (à l'exception de l'Afrique du sud) (Figure 1).
- les leishmanioses du nouveau monde: le sud de l'Amérique du nord (Mexique) méso Amérique et Amérique du sud (Figure 1).

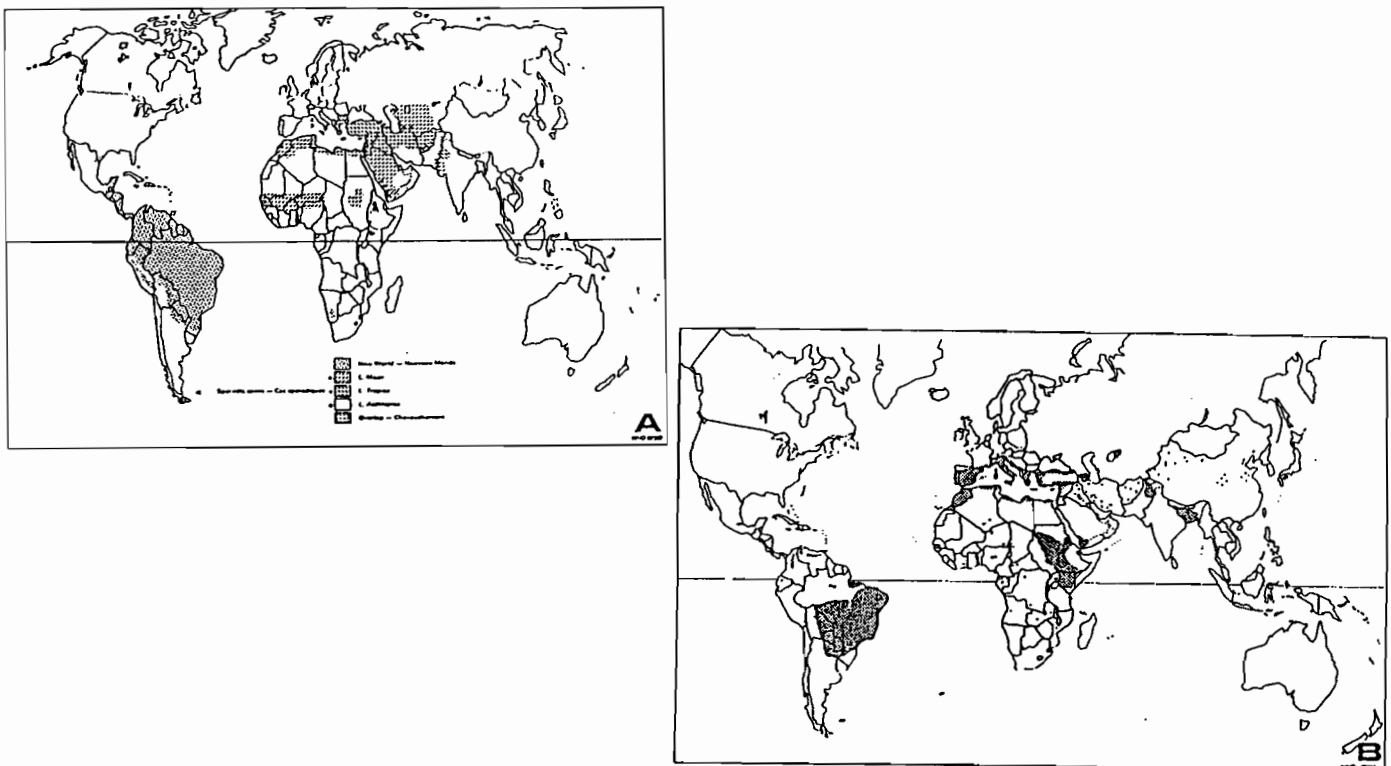


Figure 1: Distribution géographique des leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses (A), et viscérales (B). D'après Desjeux (1992).

D. Cycle biologique.

Le cycle évolutif des leishmanies se partage entre un hôte vertébré et un hôte invertébré (Figure 2).

L'hôte vertébré est contaminé par la forme promastigote, métacyclique, transmise lors de la piqûre du phlébotome femelle infecté. Dès l'inoculation, les promastigotes sont phagocytés par les macrophages à l'intérieur desquels ils se transforment en amastigotes. Les amastigotes se multiplient par division binaire à l'intérieur des phagolysosomes. Après multiplication, la diffusion s'effectue lors de l'éclatement des cellules lourdement parasitées ou de la division des macrophages (Lainson et Shaw, 1987). Les formes amastigotes ainsi libérées vont réinfecter d'autres macrophages. Les animaux sauvages ou domestiques ainsi que l'homme

constituent les réservoirs des différentes "espèces" de leishmanies. Le réservoir est considéré comme un hôte dans lequel la population parasitaire peut se maintenir.

L'hôte invertébré, le phlébotome, ingère les amastigotes, lors du repas sanguin. Ceux-ci passent dans l'intestin moyen où ils se divisent. Ils se transforment ensuite en promastigotes et colonisent l'intestin moyen où ils se multiplient. Ils entament ensuite un processus de migration antérieure. Cette migration s'accompagne de modifications morphologiques. Les formes paramastigotes sont rencontrées au niveau de l'oesophage et du pharynx, les formes métacycliques infestantes se trouvant au niveau du cibarium.

Le phlébotome fut suspecté, par les frères Sargent (1912) dès le début du siècle, comme responsable de la transmission de la leishmaniose. Les espèces vectrices se limitent à deux genres:

- Phlebotomus* responsable de la transmission des leishmanies de l'ancien monde;
- Lutzomyia* vecteur de celles du nouveau monde.

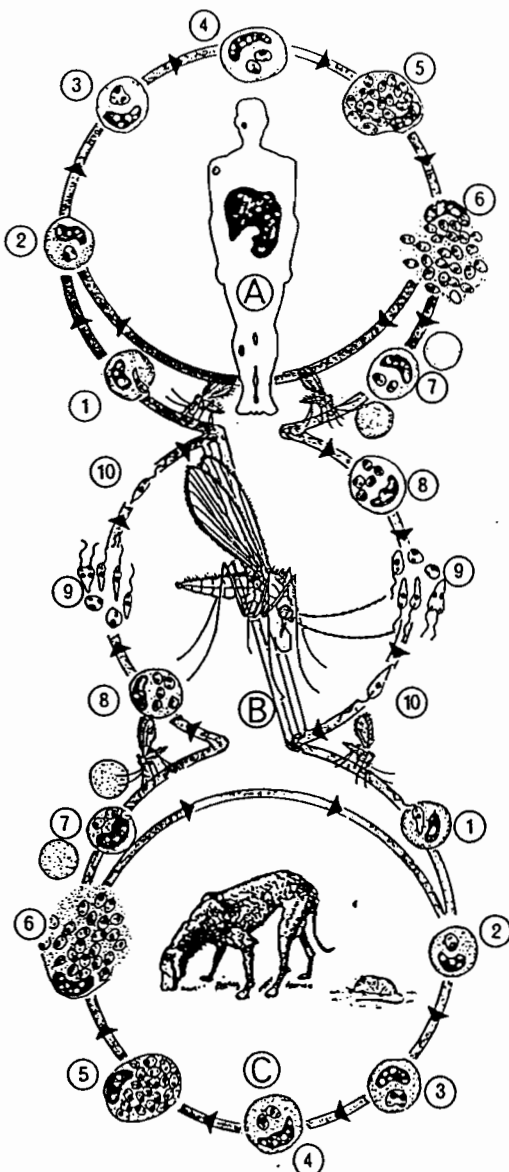


Figure 2: Cycle évolutif de *Leishmania*.. Les leishmanies évoluent dans trois compartiments différents (A, B, C). La contamination se fait à partir du vecteur, le phlébotome (B). Chez l'homme (A) le parasite, sous forme promastigote transmise par le vecteur après piqure, pénètre dans le macrophage (1). Il se transforme en amastigote (2) se divise (3) et se multiplie (4, 5, 6). Après multiplication intense du parasite, le macrophage éclate, libérant ainsi les amastigotes qui vont parasiter les macrophages sains (6, 2). Un schéma identique est observé dans le compartiment C. Le vecteur (B) s'infeste en piquant l'Homme (A) ou le réservoir (C). Il ingère le parasite sous forme amastigote (8). Dans l'intestin du Phlébotome, le parasite se transforme et se multiplie sous la forme promastigote (9) avant d'être transmis par ce vecteur, soit chez l'Homme (A, 1), soit chez le réservoir.

II. INTERACTION HOTE-PARASITE

Le développement du parasite et celui de la maladie dépendent de l'espèce mise en cause ainsi que de l'état 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).

Tableau 1: Manifestations cliniques résultantes de l'infection par les leishmanies et distribution de la maladie dans le monde (Alexander et Russel, 1992).

espèces	Manifestations cliniques	Guérison spontanée	distribution de la maladie
<i>L. donovani</i>	LV	Non	Ancien monde
<i>L. infantum</i>	LV/LC	Non	Ancien monde
<i>L. chagasi</i>	LV	Non	Nouveau monde
<i>L. tropica</i>	LC/LR	Récidivante	Ancien monde
<i>L. major</i>	LC	Lente/Non	Ancien monde
<i>L. aethiopica</i>	LC/LCD	Lente/non	Ancien monde
<i>L. mexicana</i>	LC	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/LC	Non/oui	Nouveau monde
<i>L. guyanensis</i>	LC	Oui	Nouveau monde
<i>L. panamensis</i>	LC/LCM	Non/oui	Nouveau monde
<i>L. peruviana</i>	LC	Généralement	Nouveau monde

LC, leishmanioses cutanées; LCD, leishmanioses cutanées diffuses; LR, leishmanioses récidivantes; LCM, leishmanioses-cutané-muqueuses; LV, leishmanioses viscérales.

Dans le cas des leishmanioses viscérales, les organes les plus affectés sont le foie et la rate qui sont des organes riches en cellules phagocytaires. Pendant la phase chronique de l'infection, la maladie est associée à une hépatosplénomégalie. Non traitée, la leishmaniose viscérale est mortelle. Les infections cutanées sont associées à une infiltration dense des lymphocytes et des cellules du système des phagocytes mononucléés présentes au niveau du derme. Dans certains types d'infection, un granulome de macrophages très parasités est présent.

A. L'infection par *Leishmania*.

La survie des leishmanies dépend de l'adaptation de ces micro-organismes à la fois à un milieu extracellulaire et à un habitat intracellulaire. Lorsque les formes promastigotes infectantes de leishmanies sont injectées dans la circulation générale, ces formes devront s'attacher au macrophage, se différencier en formes amastigotes, survivre et se multiplier à l'intérieur du phagolysosome. Enfin elles réinfecteront de nouveaux macrophages. Chez l'insecte vecteur, l'acquisition de l'infectivité des promastigotes s'accompagne de modifications morphologiques, structurales et biochimiques: c'est la métacyclogénèse.

Lorsque les parasites entrent en contact avec les phagocytes, une réponse immunitaire est activée. Cette réaction discrète se développe en plusieurs étapes. Quelques minutes après l'agression, les neutrophiles et les macrophages se dirigent vers les tissus infectés, en réponse aux facteurs humoraux libérés localement. Pendant cette phase inflammatoire, les activités antimicrobiennes des cellules phagocytaires (libération des radicaux libres de l'oxygène et de l'azote et des enzymes hydrolytiques) éliminent la majorité des agents pathogènes. Si les envahisseurs sont détruits par ces événements, la balance homéostatique est restaurée sans le développement de l'immunité spécifique.

De part leur position intramacrophagique obligatoire, les leishmanies représentent un exemple d'adaptation intracellulaire tout à fait étonnant puisque les leishmanies ont choisi comme habitat une cellule cible des mécanismes effecteurs de l'immunité.

1. La métacyclogénèse des promastigotes.

La forme promastigote est un parasite extracellulaire qui prolifère et se différencie dans l'intestin des diptères. Dans ces derniers, la phase la plus précoce de multiplication de toutes les espèces de leishmanies a lieu à l'intérieur du bol alimentaire sanguin qui est situé dans l'intestin médian et est entouré d'une membrane dite péritrophique. Après la digestion du repas sanguin, la prolifération se poursuit dans l'intestin médian, ou dans l'intestin médian et postérieur, selon l'espèce de leishmanies. Durant cette phase, les leishmanies sont libres dans la lumière du tube digestif, ou bien sont attachées *via* leur flagelle aux microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin médian ou à la cuticule qui borde les cellules épithéliales de l'intestin postérieur. Les leishmanies migrent ensuite vers les parties antérieures et buccales du tractus digestif au niveau desquelles elles sont libres ou liées à la cuticule. C'est au cours de la migration, ou plus vraisemblablement juste avant la migration, que les leishmanies vont subir une différenciation nommée métacyclogenèse qui conduit à la formation de promastigotes métacycliques infectieux pour les hôtes mammifères. Les promastigotes métacycliques infectieux se distinguent des autres formes par quelques caractéristiques morphologiques et physiologiques. Ce sont des formes flagellées, très mobiles, caractérisées par un corps cellulaire de petite taille. Ils n'adhèrent pas aux tissus du vecteur. Ils possèdent un long flagelle et la poche flagellaire est relativement profonde. Les formes promastigotes métacycliques ne se divisent pas *in vitro*, mais peuvent se

transformer, au bout de 24 à 48 h, en promastigotes capables de se multiplier (Mallinson et Coombs, 1989).

Grâce aux études effectuées 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. Par exemple, les glycoconjugués de surface des formes de la phase logarithmique sont différents de ceux de la phase stationnaire (métacycliques) et se rapprochent de ceux présent au niveau de la membrane des formes amastigotes (Sacks *et al.*, 1985). La métacyclogénèse s'accompagne de l'acquisition de nouveaux hydrates de carbones par le lipophosphoglycane (LPG). Le glycocalyx des formes métacycliques est plus épais (17 nm d'épaisseur) que celui des formes de la phase exponentielle de croissance (7 nm) (Pimenta *et al.*, 1989). Cette caractéristique conférerait la résistance à l'action du complément qui est observée chez les formes métacycliques. D'autre part le LPG est impliqué dans l'attachement des leishmanies aux macrophages.

Une glycoprotéine, à activité métalloprotéasique, a aussi été montrée comme étant associée à la métacyclogénèse: c'est la Gp63. L'activité métalloprotéasique de la Gp63 a, tout d'abord, été décrite chez *L. major* (Etges *et al.*, 1986) puis mise en évidence chez d'autres espèces (Bouvier *et al.*, 1987). Il avait été montré que la métacyclogénèse s'accompagnait de la synthèse de nouveaux composants antigéniques. Ainsi seules les formes promastigotes infectieuses de *L. chagasi* expriment en surface un antigène de 63 kDa (Santoro *et al.*, 1987). Une expression croissante d'un épitope déjà présent à la surface des formes promastigotes de la phase exponentielle de culture a aussi été mise en évidence. Ainsi chez *L. braziliensis*, l'infectivité des formes promastigotes s'accompagne de l'expression croissante d'un épitope porté par l'immunogène majeur de surface de 65 kDa (Kweider *et al.*, 1987). On sait maintenant, que les gènes codants, pour la Gp63, sont présents en de multiples copies dans le génome (Button et McMaster, 1988). Chez *L. chagasi*, l'expression différentielle du produit de certains de ces gènes a pu être corrélée avec la métacyclogénèse. L'expression d'une protéase de 59 kDa, faisant partie de la famille de la Gp63 a été montrée (Roberts *et al.*, 1995). Enfin la métacyclogénèse s'accompagne d'une expression différentielle des produits des gènes codants pour la β -tubuline (Coulson *et al.*, 1996).

Du point de vue de la régulation de l'expression de gènes, comme pour les gènes "tissus spécifiques" des métazoaires, il a été démontré, que certains gènes de leishmanies s'exprimaient plus dans un stade parasitaire, que dans un autre.

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 de *L. major* (Searle *et al.*, 1989).

Enfin d'autres gènes semblent être exprimés, de façon différentielle, lors de la métacytogénèse. En 1990, Coulson et Smith ont isolé quatre clones ADNc dont les gènes correspondants (A, B, C et D) 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). Enfin, un gène codant pour une protéine a été caractérisé (Brodin *et al.*, 1992). Les transcrits ont été appelés MAT-1 (métacyclics promastigotes associated transcripts). Cette protéine possède un domaine de fixation à l'ADN comparable à celui des facteurs de transcription. Les fonctions exactes, de ces gènes spécifiques des promastigotes métacycliques, restent encore à déterminer.

2. Reconnaissance des formes promastigotes de leishmanies, par le macrophage.

L'internalisation des promastigotes par les macrophages se fait via une phagocytose médiée par différents récepteurs spécifiques.

2.1. Les récepteurs des macrophages.

Les récepteurs impliqués dans l'internalisation des parasites sont:

- les récepteurs de facteurs du complément de type 3 C3b et C3bi, qui sont le CR1 et le CR3 (Mosser et Edelson, 1987a; Mauël, 1996),
- le récepteur mannose-fucose (Wilson et Pearson, 1986), les récepteurs pour AGE (Advanced glycosylation end products) (Mosser *et al.*, 1987b),
- le récepteur de la fibronectine (FnR), le(s) récepteur(s) Fcγ. Les molécules faisant partie de la famille des intégrines, reconnaissent une structure correspondant à une séquence d'acides aminés Arg-Gly-Asp ou RGD. Les macrophages synthétisent et excrètent la fibronectine qui peut opsoniser les promastigotes, favorisant ainsi leur attachement aux phagocytes (Ouaissi, 1988). Cependant le récepteur à FnR jouerait un rôle moindre dans l'adhérence des leishmanies car il induit une "explosion oxydative" pouvant être fatale pour les parasites.

L'endocytose, via le récepteur de type CR1, induit de faibles "explosions respiratoires", les parasites ont donc plus de chance de survivre (Da Silva *et al.*, 1989; Ouaissi, 1988), les formes non infectieuses utilisent plutôt le CR3 pour pénétrer dans les macrophages (Da Silva *et al.*, 1989).

2.2. Rôle des molécules de surface de *Leishmania*.

La GP63. Chez *Leishmania*, cette glycoprotéine est reconnue par les macrophages, ceci même en l'absence de complément ou d'anticorps (Russel, 1989). En fait la Gp63 possède une communauté de structure et de fonction avec la fibronectine (Ouaissi., 1988; Rizvi *et al.*, 1988). Ces observations ont été confirmées par l'équipe de Soteriadou (1992) montrant que la séquence Ser-Arg-Tyr-Asp de la Gp63 mimait immunologiquement et fonctionnellement la séquence RGD de la fibronectine. Les CR1/CR2 et FnR appartiennent tous deux à la grande famille des intégrines et reconnaissent des peptides portant une séquence commune: la séquence RGD. Celle-ci intervient aussi dans l'adhérence des promastigotes *via* les facteurs du complément. Les formes promastigotes métacycliques sont insensibles au complément, mais ces facteurs aident les leishmanies à pénétrer dans les macrophages (Mosser et Edelson., 1984; Mosser *et al.*, 1985a). Les premières études montraient que l'opsonisation des promastigotes par le complément augmentait l'interaction avec les macrophages (Mosser et Edelson, 1984). Cette augmentation de l'attachement des parasites aux macrophages était en fait due à la fixation du complément par les parasites. L'interaction parasite-macrophage s'effectue par l'intermédiaire du récepteur Mac-1, qui est le récepteur du C3bi présent sur les macrophages murins (Mosser et Edelson, 1985; Wozencraft et Blackwell, 1987). Le même type d'interaction avec le CR1 a été établi (Brittingham et Mosser, 1996). La Gp63 étant un accepteur du C3 (Mauël, 1996), en présence de sérum, l'attachement des parasites aux macrophages se ferait *via* le CR3 (Russel et Talamas-Rohana, 1989). De plus cette protéase aurait aussi un rôle dans la formation de C3bi (Brittingham et Mosser, 1996).

Le LPG intervient aussi dans l'attachement des leishmanies aux macrophages:

- en l'absence du complément celui-ci se lierait aux récepteurs mannose-fucose (Wilson et Pearson., 1986) et aux récepteurs pour AGE (Mosser et Rosenthal, 1993). Il a aussi été suggéré que celui-ci se lierait au P150,95 (Mosser et Rosenthal, 1993),
- en présence de sérum, il se ferait par l'intermédiaire de la chaîne α du CR3 (Handman et Godwin, 1985; Talamas-Rohana *et al.*, 1990).

Le CR3 et la P150,95 sont deux membres de la famille des intégrines de la classe CD18. D'autre part, le LPG se lie à la "Mannan Binding Protein" (MBP), ce qui peut activer le complément à partir de la voie classique, entraînant le recrutement de C3 (Mauël, 1996). Le LPG jouerait un rôle protecteur important pendant les premières phases du parasitisme, phases durant lesquelles les promastigotes se transforment en amastigotes, plus adaptées à la vie intracellulaire (Russel et Talamas-Rohana, 1989; Alexander et Russel, 1992; Turco et Descoteaux, 1992).

Dans les conditions physiologiques, l'adhésion et la phagocytose des promastigotes se font en présence de facteurs sériques et seraient donc effectuées par l'intermédiaire des récepteurs aux C3b et C3bi. Le degré de participation des différents couples (ligand-récepteur) à l'internalisation des promastigotes est difficile à estimer mais, il semble cependant, que les CR1

et CR3 jouent un rôle majeur dans l'établissement d'une infection durable, ce qui est vraisemblablement en rapport avec la non-participation ou avec la faible participation de ces récepteurs, à l'activation des macrophages.

3. Développement des formes amastigotes à l'intérieur des cellules phagocytaires.

3.1. La vésicule parasitophore

Après leur internalisation par les macrophages, les promastigotes s'établissent dans des vacuoles dites parasitophores (VP) bordées par une membrane où ils se transforment en amastigotes. Les VP sont de tailles variables selon l'espèce de leishmanie considérée. Ainsi, les macrophages infectés par *L. major* ou *L. donovani* contiennent de nombreuses vacuoles de petites tailles, chacune d'elles abritant un seul ou quelques parasites. Par contre, les macrophages infectés par les leishmanies appartenant au complexe *mexicana* contiennent peu de vacuoles mais celles-ci sont de grandes tailles et renferment de très nombreux parasites. Les VP accumulent des substances provenant du milieu extérieur et possèdent les caractéristiques de compartiments d'endocytose tardifs, ce qui implique qu'elles sont en liaison avec des compartiments plus précoces de la voie d'endocytose (endosome, vésicules issues des endosomes, vésicules issues de la membrane plasmique). Les VP fusionnent également avec les lysosomes de la cellule hôte, et de manière si efficace dans le cas des VP abritant des amastigotes de *L. amazonensis*, que l'on assiste à une déplétion, quasi-totale, des lysosomes. Cet événement n'est pas suivi de la destruction des parasites (Rabinovitch, 1985). Les vacuoles parasitophores maintiennent un pH luminal acide par un processus actif faisant intervenir la pompe à protons lysosomale adénosine triphosphate (ATP) dépendante des cellules hôtes. Dans les 24 à 48 heures suivant l'infection avec des amastigotes de *L. amazonensis*, les VP de macrophages murins ont un pH qui varie entre 4,7 et 5,3, valeurs très voisines de celles des lysosomes de macrophages murins dont le pH varie entre 4,7 et 5,5. Des résultats très similaires ont été obtenus pour les VP de macrophages infectés avec *L. donovani* et *L. mexicana* (Alexander et Russel, 1992; Antoine *et al.*, 1990). D'autre part, les VP de macrophages murins infectés par des amastigotes de *L. amazonensis*, *L. mexicana* ou *L. donovani* contiennent de nombreuses enzymes lysosomiales. L'activité de ces enzymes n'est vraisemblablement pas inhibée dans les macrophages infectés. Une augmentation de l'activité de la plupart des enzymes lysosomiales étudiées est même observée après infection. Les leishmanies ne résistent donc pas à leur environnement en réduisant l'activité et/ou la quantité des hydrolases acides de la cellule hôte (Alexander et Russel, 1992; Antoine *et al.*, 1987; Prina *et al.*, 1990).

3.2. Différenciation des formes promastigotes en formes amastigotes.

Des études *in vitro* ont montré que la transformation des promastigotes en amastigotes se fait entre 12 et 24 heures après leur phagocytose par les macrophages (Molyneux et Killick Kendrick, 1987). Le métabolisme des parasites évolue alors, du type aérobie, vers le type anaérobie. Les facteurs impliqués dans la différenciation des formes promastigotes, en formes amastigotes, sont peu connus. Cependant la diminution de pH comme l'action de la température seraient importants dans l'initiation de la différenciation.

3.2.1. Perturbation des messagers secondaires du macrophage.

L'infection des macrophages par *L. donovani* entraîne une inhibition de nombreuses fonctions macrophagiques (Olivier, 1996) dont: la phagocytose, la production de l'IL-1, l'expression du gène *c-fos* en réponse au lipopolysaccharide (LPS) et des phorbol esters, l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC II) en réponse à l'interféron- γ (INF- γ), la génération de radicaux oxygénés suite à la stimulation avec des phorbols ester. Une fois infectés, les macrophages sont en fait moins aptes à produire des dérivés actifs de l'oxygène, lors d'une stimulation avec un agent activateur adéquat (Docampo et Moreno, 1996).

Les parasites semblent donc capables de perturber les fonctions macrophagiques. Pour développer une immunité à médiation cellulaire, les macrophages infectés doivent être capables d'activer les cellules T, de manière spécifique. En retour les cellules T activent les macrophages par l'intermédiaire de la sécrétion de lymphokines. En fait, les signaux intracellulaires utilisant le Ca^{2+} , ou la protéine kinase C (PKC) comme seconds messagers, sont défectueux ou altérés chez les macrophages infectés par *L. donovani*. Les raisons de ces altérations ne sont que partiellement connues. Les parasites agiraient à différents niveaux. Il a été montré que le LPG bloquait l'activation des mécanismes microbicides des macrophages par l'inhibition de la protéine kinase C (McNeely et Turco, 1987, 1989; Turco et Descoteaux, 1992). Cette inhibition serait due à l'action du LPG au niveau de la phosphorylation des substrats de la PKC (Descoteaux et Turco, 1993). D'autre part, une étude effectuée par Eilam (voir Olivier, 1996) a montré que la concentration calcique intracellulaire était plus élevée chez les monocytes infectés par *Leishmania*. Le calcium intervient lui aussi au niveau de la signalisation intracellulaire du macrophage. La perturbation de l'homéostasie calcique de la cellule hôte aurait plusieurs causes. Par exemple, la phosphatase acide parasitaire entraînerait une déphosphorylation de l'Inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) *in vitro* (Olivier, 1996). Celui-ci est un médiateur intracellulaire permettant le relargage des réserves calciques sensibles à l' IP_3 et intervient à ce titre dans la signalisation intracellulaire du macrophage.

3.2.2 Adaptation des parasites aux conditions intracellulaires: le pH et la température.

Comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe précédent, il existe une différence de 2 unités de pH dans les milieux extracellulaires des formes promastigotes et amastigotes; or le pH intracellulaire du parasite ne varie pas. Les parasites sont donc capables de réguler leur pH. Quand des formes promastigotes sont cultivées à des pH rencontrés au niveau du lysosome des macrophages (pH 4,7), de nombreuses protéines pH-spécifiques ont été identifiées (Zilberstein *et al.*, 1991).

De même les changements de température lors de la différenciation des formes promastigotes en formes amastigotes, entraînent des expressions préférentielles de certaines protéines, les "heat shock proteins" ou *hsp* (Hunter *et al.*, 1984; Lawrence et Robert-Gero, 1985, Leon *et al.*, 1995). Celles-ci ont été identifiées chez beaucoup d'organismes et chez *Leishmania* de nombreuses *hsp* ont été décrites. Cependant l'expression de ces protéines peut être induite par des stress autres que la température. L'expression de certaines *hsp* chez *Leishmania* se fait de façon différentielle chez les formes promastigotes métacycliques de *L. major* (Searle *et al.*, 1989). Les *hsp70* et *hsp83* sont en fait exprimées de façon constitutive avant les changements morphologiques chez les formes amastigotes. Tout se passe comme si la production de *hsp* pré-adaptait les parasites aux changements d'environnement qu'ils rencontreront chez leur hôte vertébré (Marescù et Carratù, 1992, Leon *et al.*, 1995, Andersen *et al.*, 1996). Il serait cependant intéressant de savoir si l'expression de ces protéines est un processus propre au mécanisme de différenciation. En effet ce phénomène pourrait aussi être un épiphénomène impliqué dans l'adaptation des parasites à un nouvel environnement (Marescù et Carratù, 1992).

Une fois différenciées et adaptées à leurs nouvelles conditions, les formes amastigotes devront survivre et se multiplier dans le phagolysosome. Pour cela, les parasites possèdent de fortes activités glutathion-peroxydase, catalase et superoxydes dismutases, capables de dégrader les produits toxiques du macrophage (Panaro *et al.*, 1995). A ce niveau la Gp63, qui possède une activité protéasique, joue encore un rôle en inactivant les enzymes protéolytiques de l'hôte (Chauduri *et al.*, 1989). D'autre part, les amastigotes de *Leishmania* sont très bien adaptés à la survie dans l'environnement acide du phagolysosome. Leur activité métabolique est plus importante à pH acide qu'à pH neutre (Mukkada *et al.*, 1985; Glaser *et al.*, 1988). Ces formes intracellulaires tirent partie de la force protomotrice existante pour faire entrer le glucose et les acides aminés (Zilberstein et Dwyer, 1985, 1988; Glaser *et al.*, 1988, Burchmore et Hart, 1995; Mauël, 1996).

4. Interaction amastigote-macrophage.

Peu de choses sont connues sur l'interaction des formes amastigotes avec les macrophages. Les récepteurs présents à la surface des cellules de mammifères et au niveau des parasites ne sont pas définitivement identifiés. L'adhésion des amastigotes de *L. amazonensis*

aux macrophages n'est pas inhibée par le blocage des récepteurs macrophagiques, tels que le CRI ou le récepteur mannose-fucose (Mosser et Rosenthal, 1993). L'adjonction de sérum n'augmente pas l'accrochage des amastigotes (Mosser et Rosenthal, 1993). Ces informations indiquent que l'adhésion des amastigotes aux macrophages implique des récepteurs macrophagiques différents de ceux utilisés par les formes promastigotes.

B. Réponse immunitaire de l'hôte.

Les macrophages, en exposant à leur surface de petits fragments antigéniques vont être reconnus par une sous-population de lymphocytes, les lymphocytes T helper. Cette reconnaissance est effectuée par fixation au complexe antigène/molécule de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) présent à la surface des macrophages. Cette reconnaissance du macrophage par les lymphocytes T va conduire à la libération, par le lymphocyte, d'une série de facteurs solubles: les cytokines.

1. Le jeu des cytokines et la réponse à médiation cellulaire.

Ces études ont été effectuées principalement sur *L. major*. Les lymphocytes T CD4⁺ sont divisés en deux sous-groupes, en fonction des cytokines qu'ils produisent. Les cellules Th1 produisant de L'INF- γ et de L'IL-2 et qui sont impliquées dans l'immunité à médiation cellulaire. Les cellules Th2 produisant de l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et étant plus impliquées dans l'immunité humorale. Dans les infections expérimentales à *Leishmania*, une réponse à dominante Th1 a été associée avec la guérison alors qu'une réponse de type Th2 entraîne plutôt une exacerbation de la maladie (Locksley et Scott, 1991; Varkla *et al.*, 1992). L'étude du rôle des cytokines, dans la régulation de la réponse T, montre que l'INF- γ , l'IL-4, l'IL10 ou l'IL-12 ont un rôle dans la sélection des lymphocytes T (Ho *et al.*, 1994; Scott., 1991; Varkla *et al.*, 1992; Morris *et al.*, 1993; Sypek *et al.*, 1993). Par exemple, le traitement de souris résistantes à l'infection par *Leishmania*, avec un anticorps monoclonal anti-IFN- γ empêche le développement de la réponse Th1 et permet donc le développement d'une réponse Th2, qui est associée avec une progression de la maladie (Varkla *et al.*, 1992). Par contre, lorsque l'on traite des souris sensibles à l'infection par *Leishmania*, avec un anticorps monoclonal anti-IL-4, on entraîne une inhibition de la réponse Th2, favorisant ainsi une réponse Th1 permettant de soigner l'infection (Morris *et al.*, 1993; Chatelain *et al.*, 1992). D'autres interleukines ont aussi un rôle dans le recrutement des lymphocytes Th1, c'est le cas de l'IL-12 (Hsieh *et al.*, 1993). L'infection due aux leishmanies provoque une immunodépression avec une réduction de la production d'IL-2. Cette réduction affecte la prolifération des cellules T ainsi que l'élaboration de cytokines telles que l'INF- γ , le GM-CSF et l'IL-3. Ces cytokines sont d'importantes activatrices de l'activité microbicide des macrophages (Heinzel *et al.*, 1991; Morris *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994; Reiner, 1994; Reiner *et al.*, 1994a, 1994b). Lors de l'activation de l'activité microbicide des macrophages, le

2. Les mécanismes microbicides du macrophage ou immunité non spécifique.

L'oxyde nitrique ou NO est généré dans de nombreux types cellulaires. Sa production se fait à partir du groupement guanidium de la L-arginine. La réaction entraîne une libération de L-citrulline et elle est catalysée par une enzyme, la NO synthétase. Plusieurs isoformes de cette enzyme ont été isolées. La NO synthétase constitutive (cNOS) est présente chez tous les types cellulaires, dont les macrophages. Son activité est régulée par le niveau de calcium intracellulaire (revues par Clark et Rockett, 1996). Une autre isoforme, l'iNOS (pour inducible NO Synthase) nécessite un stimulus externe pour la générer. Dans ce cas les cytokines, telles que le TNF (Tumor Necrosis Factor), l'IL-1 (L'Interleukine-1), l'INF- γ , jouent ce rôle. Sous l'action de ces cytokines l'enzyme, nouvellement synthétisée, est pleinement active. D'autres cytokines interviennent pour réduire la synthèse de celle-ci, ce sont: l'IL-4, l'IL-5, l'IL-8 et l'IL-10 (Clark et Rockett, 1996). La production de NO stérilise les macrophages infectés par *Leishmania* (Vouldoukis *et al.*, 1995).

Mécanisme effecteur du NO.

Plusieurs enzymes sont connues comme étant inhibées par le NO, ces enzymes possèdent un noyau fer-soufre. Ce sont les hydrolases, l'aconitase, les cytochromes oxydases la ribonucleotide réductase, les aldolases et le cytochrome P-450.

Les hydrogénases, sont une des premières cibles moléculaires à avoir été mis en évidence. L'interaction du NO avec ces enzymes était supposée. En effet elles contiennent un noyau ferrique et le NO est connu pour former des complexes avec le fer (Sidgwick, 1950).

L'aconitase possède une double fonction au niveau cellulaire. Tout d'abord, elle intervient au niveau du cycle de Krebs en convertissant le citrate en isocitrate. Elle intervient aussi dans la régulation du fer au niveau de la cellule. Son rôle comme IRP (Iron Regulatory Protein) se situe soit, (i) en contrôlant la translation de L'ARNm, (ii) soit en bloquant la dégradation de différentes protéines impliquées dans l'homéostasie du fer (voir Clark *et al.*, 1996). De façon intéressante, il a été montré que les cellules traitées par le NO perdent à la fois leur activité aconitase et leur fer (Hibbs *et al.*, 1988).

Les cytochromes oxydases On sait que les complexes I et II des cytochromes (responsables du transport des électrons au niveau mitochondrial) sont inhibés lorsque des macrophages activés sont incubés avec des cellules tumorales. Cette inhibition a été reliée avec la production d'oxyde nitrique par les macrophages (voir Clark *et al.*, 1996).

Ribonucleotide reductases Cette enzyme joue un rôle dans la synthèse d'ADN. Elle catalyse la réduction de nucléosides diphosphates de façon limitante pour la synthèse de cette molécule. Le site actif de l'enzyme contient de nombreux groupes sulfhydryl, un radical tyrosine et un noyau fer qui sont tous les trois potentiellement des cibles pour l'oxyde nitrique. Le NO agirait donc par l'intermédiaire du radical tyrosil et en réagissant avec les groupements sulfhydryl de l'enzyme (Clark *et al.*, 1996). L'inhibition de cette enzyme serait responsable de l'effet cytostatique du NO chez *Trypanosoma brucei gambiense* et *T. brucei brucei* (Vincendeau *et al.*, 1992).

Cytochrome P450 Le cytochrome P-450 est un terme collectif désignant des protéines à noyau heme. Du fait de la présence de ce noyau, ces enzymes fixent l'oxyde nitrique (Clark *et al.*, 1996).

Réaction avec les groupements sulfhydryl l'oxyde nitrique peut réagir avec les groupements SH pour former des composés appelés nitrosothiol. Ceux-ci peuvent réagir avec d'autres groupements SH pour former des ponts disulfures qui entraînent le relargage de l'oxyde nitrique (Mirna et Hoffman, 1969). L'effet toxique de ces composés nitrosothiol a été montré sur la forme sanguine asexuée de *Plasmodium* (Rockett *et al.*, 1991).

III TRAITEMENT DES LEISHMANIOSES.

Le traitement idéal vise à éliminer les parasites et à promouvoir la guérison du patient. Dans le cas des leishmanioses, la guérison complète est très difficile à obtenir par la seule chimiothérapie car les parasites se trouvent à l'intérieur des macrophages.

L'arsenal thérapeutique classique est constitué des dérivés de l'antimoine (Pentostam® et Glucantime®), de la pentamidine et de l'amphotéricine B. La toxicité de ces médicaments est bien connue et la vectorisation, notamment de l'amphotéricine B, a permis de réduire cette toxicité.

A. Arsenal thérapeutique classique.

La plupart des antiparasitaires actuels dérivent de pratiques et d'avancées acquises au cours du 19^{ème} siècle. La chimiothérapie rationnelle est fondée sur les travaux de Paul Ehrlich en 1870 et 1880, suite à la mise en évidence d'une entrée différentielle de colorants entre les tissus et les bactéries ou les protozoaires. Ehrlich a aussi énoncé les grandes bases de la chimiothérapie selon le principe de toxicité sélective dont le but est d'obtenir une diminution de la charge parasitaire sans conséquences graves pour l'hôte. Le bleu de méthylène, par exemple, est connu pour colorer préférentiellement les stades érythrocytaires de *Plasmodium*.

1. Traitement par chimiothérapie systémique.

L'injection en intramusculaire ou intraveineuse est généralement utilisée pour soigner tous les types de leishmanioses. Les leishmanioses cutanées guérissent souvent spontanément, par ailleurs il est possible d'effectuer des injections intralésionelles.

1.1. Les dérivés stibiés.

Les dérivés de l'antimoine sont utilisés depuis fort longtemps. 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 par Vianna en 1912. Cependant du fait de leur toxicité, les composés antimoniés trivalents organiques ou inorganiques ont été progressivement remplacés par les dérivés pentavalents dans les années 1920.

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 10 mg/ml de Sb^{5+} .

1.1.1. Traitement et toxicité.

En règle générale les dérivés de l'antimoine sont recommandés pour toutes les formes de leishmanioses à l'exception de la leishmaniose cutanée-diffuse.

Initialement les doses recommandées étaient de 10 à 15 mg/kg/j sur une période de 5 à 6 jours. Ce traitement initialement efficace s'est révélé peu efficace, au Kenya dans les années 60, donnant des taux de réussite de 79% seulement (Dellamonica *et al.*, 1990; Olliaro et Bryceson, 1993).

En 1990, l'OMS recommandait donc un traitement d'attaque constitué d'une injection quotidienne de 20 mg de Sb^{5+} mg/kg/j pendant 20 jours, sans dépasser une dose maximale cumulée de 850 mg (OMS, 1990; Moss et Wilson, 1992). En effet, l'efficacité du traitement semble être due à sa durée et à la dose utilisée. Le meilleur taux de réussite est obtenu pour le traitement le plus long associé à la dose la plus forte (Herwaldt et Berman, 1992).

Les leishmanioses cutanéomuqueuses sont plus difficiles à traiter avec les dérivés de l'antimoine. Ce manque d'efficacité peut être dû à différents facteurs et notamment aux caractéristiques pharmacocinétiques des dérivés de l'antimoine (Olliaro & Bryceson, 1993). Dans les cas de leishmaniose cutanéomuqueuse, la pentamidine ou l'amphotéricine B sont le plus souvent utilisés.

Lors des co-infection leishmanie-SIDA, le traitement est difficile et les rechutes sont fréquentes. Plusieurs études ont montré que lors de l'utilisation du traitement recommandé par l'OMS, des taux de rechute de 48 à 54% étaient observés (Zumla et Croft, 1992). La plus grande susceptibilité des patients atteints du VIH, aux leishmanioses, serait due à des dysfonctionnements des lymphocytes T et des macrophages durant l'infection au VIH (Lockwood et Weber, 1989). Dans ce cas, l'amphotéricine B ou la pentamidine sont souvent le recours pour traiter ces patients.

Les effets secondaires dus aux dérivés pentavalents sont importants: une asthénie, des vomissements et une atteinte cardiaque sont souvent rencontrés (Bryceson, 1987).

1.1.2. Pharmacocinétique.

Les paramètres pharmacocinétiques sont identiques pour le Pentostam® et le Glucantime® (Chulay *et al.*, 1988). Ils sont rapidement éliminés par les reins, puisque 60 à 80% sont excrétés en 6 heures (Olliaro et Bryceson, 1993). Le sodium stibogluconate est concentré préférentiellement dans la rate (Bryceson, 1987). Le temps de clairance est d'environ 2 heures, à partir d'un compartiment central correspondant au sang et au sérum. Dans le compartiment

périphérique, une partie du dérivé pentavalent est réduite en dérivé trivalent (Olliaro et Bryceson, 1993).

1.1.3. Mode d'action.

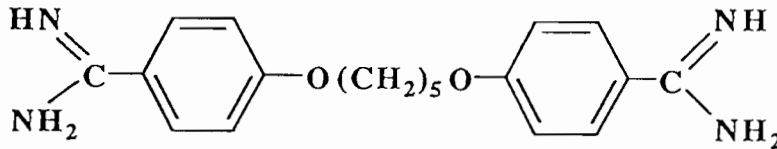
Plusieurs hypothèses permettant d'expliquer l'action du Pentostam ont été proposées. Il a été montré que les dérivés pentavalents de l'antimoine sont réduits en dérivés trivalents, très actifs contre les leishmanies (Goodwin *et al.*, 1943; Goodwin, 1995). Les dérivés stibiés trivalents agissent en inhibant la phospho-fructo-kinase et la déshydrogénase pyruvique, bloquant ainsi, le métabolisme énergétique (Euzeby, 1986). Ce mécanisme de réduction pourrait se produire dans les macrophages, ce qui expliquerait la toxicité sélective des dérivés de l'antimoine. Les bases biochimiques concernant l'activité des dérivés antimoniés ne sont pas connues, mais l'action leishmanicide pourrait être due à l'inhibition de la synthèse d'ATP (Berman *et al.*, 1985; Berman, 1988) 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.

En fait le sodium stibogluconate (Pentostam®) est un composé complexe. Il est produit par la réaction de deux acides, les acides stibonique et gluconique. Roberts et Rainey (1993) ont effectué des expériences de fractionnement de ce composé sur colonne échangeuse d'anions. Douze fractions ont ainsi été récupérées et chaque fraction a été testée sur des souches de *L. panamensis* afin d'en déterminer la CI₅₀ (concentration de drogue inhibant 50% de la croissance). La fraction la plus active est celle contenant du *m*-chlorocrésol, qui est en fait le conservateur du Pentostam®. Ce composé est très actif sur les formes amastigotes intramacrophagiques. Pour ces auteurs, l'activité du sodium stibogluconate serait donc essentiellement due à ce composé.

1.2. La pentamidine.

La pentamidine fait partie de la série des diamidines aromatiques. Les membres de cette série sont tous composés d'une chaîne centrale aliphatique à l'extrémité de laquelle se greffent les groupements amides polaires, par l'intermédiaire de deux ponts éther (figure 4). Les analogues de la pentamidine se différencient soit par la longueur soit par la ramification de leur chaîne alcane (Sands *et al.*, 1985). La longueur de la chaîne centrale étant un critère important dans l'activité leishmanicide de la molécule (Bell *et al.*, 1990). Elle a d'abord été utilisée dans les années 1930-1940 contre les trypanosomes africains (Lourie & Yorke, 1939), puis appliquée aux leishmanies (Kirk et Sati, 1940; Wingfield, 1941; Napier *et al.*, 1943). Deux sels de pentamidine sont employés avec des résultats semblables. Ce sont le mésylate de pentamidine ou Lomidine® et l'iséthionate de pentamidine ou Pentacarinat®. La pentamidine est considérée comme un médicament de seconde intention, utilisée dans les cas de non réponse au sodium stibogluconate ou au Glucantime®. Elle est préférée aux dérivés stibiés pour traiter la forme "espundia" de la

leishmaniose cutanéomuqueuse et de la leishmaniose cutanée due à *L. aethiopica* (*L. aethiopica* est en effet réfractaire aux antimonies) et lorsque les lésions nasales ou buccales ont un caractère chronique excessif. Enfin elle est utilisée pour traiter les cas de co-infection leishmaniose-SIDA lorsque le traitement au sodium stibogluconate se révèle inefficace.



Iséthionate de pentamidine
($\text{OH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3^-$)

Figure 4: Structure de la pentamidine.

1.2.1. Traitement et toxicité.

La pentamidine doit être administrée à raison de 4 mg/kg de poids corporel, trois fois par semaine, pendant une durée allant de 5 à 25 semaines. De part sa toxicité, le traitement doit être effectué sous surveillance médicale, ce qui en augmente d'autant plus le coût. A ce dosage, les effets secondaires sont importants. Ils sont classés en trois catégories: les effets immédiats, les effets cumulatifs et ceux dus à un surdosage. Les effets cumulatifs peuvent contraindre à limiter la dose ou la fréquence d'administration. Les effets secondaires sont: les sensations de brûlure, le mal de tête, l'anxiété, les nausées, les vomissements, l'hypotension, la tachycardie, les syncôpes, un affaiblissement général et des douleurs abdominales qui peuvent indiquer des lésions pancréatiques. Une hypoglycémie due à des lésions hépatiques, apparaît chez 6% des patients. Celle-ci peut être irréversible ou même fatale (Bryceson, 1987).

De part sa forte toxicité et son coût d'utilisation, certains auteurs se sont intéressés à une optimisation de la posologie de la pentamidine. Dans le but de réduire la toxicité du traitement, des études ont été effectuées en changeant la dose et la fréquence d'administration de la pentamidine. Cette étude effectuée en Colombie, sur des cas de leishmanioses cutanées, a montré qu'une dose de 2 mg/kg de pentamidine administrée un jour sur deux en sept injections donnait un taux de réussite de 95%. Cette même dose, un jour sur quatre, diminue le taux de réussite à 84%. Le meilleur score (96%) est obtenu lors de l'administration de 3 mg/Kg de pentamidine un jour sur 4, en quatre injections. Outre les effets secondaires modérés, la diminution du nombre de journées d'hospitalisations réduit considérablement le coût du traitement (Soto *et al.*, 1994).

1.2.2. Pharmacocinétique.

La concentration plasmatique après l'injection d'une dose de 4 mg/Kg est de l'ordre de 0,3-1,4 mg/ml, la concentration maximale étant obtenue 1 heure après l'injection (Waalkes *et al.*, 1970; Bronner *et al.*, 1991). La pentamidine s'accumule préférentiellement dans le foie et les reins. Son excrétion est lente, 50% de la dose injectée est excrétée en 5 jours, en grande partie dans les urines et partiellement dans les fèces. Des traces de pentamidine peuvent être détectées dans les reins et les urines jusqu'au 217^{ième} jours après l'injection (Bryceson, 1987).

1.2.3. Mode d'action.

Le mode d'action exact de la pentamidine n'est pas entièrement connu. Les effets de la pentamidine sont nombreux et ont été étudiés sur différents organismes. Plusieurs cibles sont donc décrites dans la littérature.

La pentamidine possède une activité antibactérienne (*Staphylococcus aureus*) en inhibant la synthèse protéique (Sands *et al.*, 1985). Chez *Crithidia fasciculata*, la pentamidine inhibe la croissance, par inhibition de la synthèse d'ADN, d'ARN, de protéines, et des phospholipides sans observer de répercussions sur la mobilité du parasite (Sands *et al.*, 1985). En fait la pentamidine semble avoir de multiples cibles. Elle inhibe notamment:

- la dihydrofolate réductase *in vitro* (Waalkes, 1976),
- les trypsine-like enzymes comme la tryptase des mastocytes (Caughey *et al.*, 1993) ou la guanidinobenzoatase présente chez les cellules tumorales (Anees et Steven, 1994),
- les protéases à thiol de différents trypanosomes africains (Lonsdale-Eccles et Mpimbaza, 1986)
- la dégradation des phospholipides (Glaumann *et al.*, 1994).

Cependant son action antiparasitaire serait due à d'autres mécanismes. En effet elle inhibe la synthèse des polyamines par inhibition, de la S-adenosyl-L-méthionine décarboxylase (Karvonen *et al.*, 1985; Bitonti *et al.*, 1986) et de la diamine-oxydase de la voie métabolique des polyamines (Balana-Fouce *et al.*, 1986; Cubria *et al.*, 1993). La pentamidine agirait aussi sur la spermidine/spermine acetyl-transferase et la polyamine oxydase (Libby et porter, 1992). Ces enzymes du catabolisme des polyamines catalysent de façon séquentielle la formation de la spermidine, à partir de la spermine et celle de la putrescine, à partir de la spermidine. La pentamidine agit sur l'entrée de la putrescine (Balana-Fouce *et al.*, 1991; Jones *et al.*, 1992). Ce mécanisme d'inhibition de l'entrée des polyamines ne serait pas responsable de la forte activité antiparasitaire de la pentamidine (Reguera *et al.*, 1994). Un phénomène de compétition vis à vis des polyamines pour la fixation sur l'ADN serait peut être à l'origine de son action. En effet la pentamidine se fixe préférentiellement sur les régions riches en bases adenine et thymidine au niveau du petit enroulement de l'ADN à l'aide de liaisons hydrogènes sans s'intercaler (Cory *et al.*, 1992; Jenkins *et al.*, 1993; Greenidge *et al.*, 1993; Nunn *et al.*, 1993). Cependant elle n'aurait aucune activité mutagène (Stauffert *et al.*, 1990).

Elle agit aussi sur le kinétoplaste des leishmanies. Des images en microscopie électronique montrent une modification de la structure des mitochondries, et de l'ADN kinétoplastique chez des leishmanies traitées à la pentamidine (Hentzer et Kobayashi, 1977; Croft et Brazil, 1982; Langreth *et al.*, 1983). Cette action, sur le kinétoplaste, serait due au fait que l'ADN kinétoplastique est plus riche que l'ADN nucléaire, en bases adenine et thymidine. Elle provoque une linéarisation des minicercles de l'ADN kinétoplastique de *Trypanosoma equiperdum*. Il est intéressant de noter que les drogues utilisées en thérapie anticancéreuse présentent le même type d'action (Shapiro *et al.*, 1989; Shapiro et Englund, 1990). Cette action serait due à une inhibition spécifique des topo-isomérases II (Chakraborty et Majumder, 1987), enzymes jouant un rôle dans la décaténation et la recaténation de l'ADN kinétoplastique. Cette action sur les topo-isomérases II a aussi été montrée chez *Pneumocystis carinii* (Dykstra et Tidwell, 1991).

Enfin une hypothèse intéressante est celle proposée par Clement et Jung (1994). La pentamidine peut être hydroxylée *in vitro* par des microsomes de lapin ou humain (Berger *et al.*, 1990a, 1990b). La pentamidine N-hydroxylée serait dégradée *in vivo* en résidus amide ou en urée accompagnée d'une libération simultanée d'oxyde nitrique (NO). Cette transformation non physiologique d'amide est comparable à celle de l'arginine en citrulline via une N-hydroxyarginine, entraînant une libération de NO qui est actif à des concentrations physiologiques de l'ordre de la nanomole (Ignarro, 1989). Cette transformation pourrait augmenter l'efficacité des drogues contenant des groupements amidine ou guanidine (Clement et Jung, 1994).

1.3. L'amphotéricine B.

L'amphotéricine B ou Fungizone® appartient au groupe des antibiotiques microlides polyéniques, caractérisés par un cycle microlide résultant de la formation d'un ester ou d'une lactone (figure 5). Cette molécule a d'abord été utilisée en tant qu'agent 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. Certains auteurs la préfèrent à la pentamidine comme médicament de seconde intention.

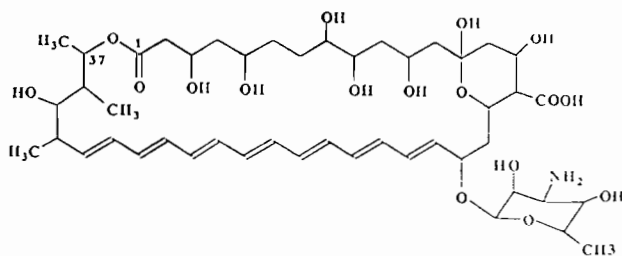


Figure 5: Structure de l'amphotéricine B.

1.3.1. Traitement et toxicité.

L'amphotéricine B est administrée quotidiennement ou trois fois par semaine, par perfusion en solution dans du dextrose à 5%, en commençant par une dose d'attaque de 5-10 mg qui est augmentée de 5-10 mg à chaque fois. Le traitement doit se poursuivre jusqu'à l'administration d'une dose totale de 1-3 g (OMS 1990). Cependant des posologies différentes 0,6 à 1 mg/kg en une perfusion de 6h semblent donner aussi de bons résultats (Dellamonica *et al.*, 1990). Les effets secondaires, dus à l'administration de l'amphotéricine B, sont importants (fièvre, thrombophlébite, insuffisance rénale), ce qui limite son utilisation en clinique. De nombreuses études ont été effectuées sur la vectorisation de l'amphotéricine B, ceci notamment dans le but de diminuer sa toxicité.

1.3.2. Pharmacocinétique.

L'amphotéricine B n'est pas absorbée par les muscles et doit être administrée par voie intraveineuse. Environ 90% de la dose injectée se fixe sur les protéines plasmatiques. Sa durée de demie-vie est de 24 heures, l'amphotéricine B étant éliminée lentement par les reins (Bryceson, 1987).

1.3.3. Mode d'action.

Le mode d'action de l'amphotéricine B a été mis en évidence chez les champignons et chez les leishmanies. Elle agit principalement au niveau des membranes, en s'incorporant dans la couche phospholipidique. La toxicité sélective de cette molécule est en partie due aux différences entre les stérols membranaires des leishmanies et ceux des mammifères. En effet, l'amphotéricine B présente une affinité 10 fois plus élevée pour l'ergostérol que pour le cholestérol; or les membranes des champignons sont surtout constituées des stérols de la famille de l'ergostérol. Chez les leishmanies les stérols les plus abondants sont les épistérols et le 5-dehydroépistérol qui sont les précurseurs de l'ergostérol (Goad *et al.*, 1984, Brajtburg *et al.*, 1990). Le mécanisme d'action serait le même chez les leishmanies et les champignons. L'insertion de l'amphotéricine B dans les membranes perturbe leur structure, par la formation de pores. Ainsi 10 molécules d'amphotéricine B s'associent à un nombre égal de molécules d'ergostérols pour former une micelle. La paroi externe de ce cylindre est formée par les régions non polaires, la paroi interne par les groupements polaires hydroxylés. La compétition entre l'amphotéricine B et les phospholipides pour les stérols est déplacée au profit de l'amphotéricine B. Il en résulte donc une diminution de l'effet fluidifiant des stérols et donc de la stabilité de la membrane dont la perméabilité va être fortement perturbée (Kobayashi et Medoff, 1977; Saha *et al.*, 1986).

1.4. L'allopurinol.

L'allopurinol est un médicament fréquemment utilisé par voie orale, pour le traitement de la goutte. Sa voie d'administration en fait son principal intérêt.

1.4.1. Traitement et toxicité.

L'allopurinol et l'allopurinol ribonucléoside sont actifs contre les leishmanies (Neal, 1987). Lors d'une étude clinique, Kager (1981) a utilisé une dose de 20 MKD divisée en trois doses, pendant 5 à 15 semaines, pour soigner 10 patients kényans atteints d'une leishmaniose viscérale. Une autre étude menée sur 5 patients présentant une rechute après traitement au sodium stibogluconate, a montré que l'allopurinol était actif en combinaison avec ce même sodium stibogluconate (Chunge, 1985).

2. Traitement local des leishmanioses cutanées.

Ce type de traitement est employé pour traiter les lésions cutanées, notamment celles due à *Leishmania major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* et *L. mexicana*. Ce traitement permet d'éviter les traitements systémiques qui sont longs et coûteux.

2.1. Méthodes physiques.

Les différentes méthodes physiques utilisées pour traiter les leishmanioses cutanées sont connues depuis fort longtemps. Ces différentes méthodes sont:

Le curetage: celui ci est souvent utilisé en Inde et au Pakistan. Le bouton d'Orient est soigné en six semaines avec 79% de réussite, les lésions répondant le mieux étant généralement celles qui ne sont pas enflammées (voir Bryceson, 1987);

Les irradiations: cette méthode a donné de bon résultats en Israël. Le traitement dure 7 à 8 semaines, à raison d'une à trois séances par semaine;

Le chauffage local: il est utilisé pour soigner les leishmanioses cutanées de l'ancien et du nouveau monde. Son utilisation tient au fait que les espèces cutanées ne survivent pas à des températures supérieures à 37°C. Il est cependant techniquement compliqué de fournir une température donnée, pendant un temps donné et en une région donnée;

Le froid: les dermatologues l'utilisent pour soigner le bouton d'orient (*L. tropica*). Mais aucune étude sérieuse n'a été effectuée.

2.2. Chimiothérapie en traitement local.

Les molécules les plus couramment utilisées sont:

- Le sulfate de berbérine en solution au 1/80 000, la mépacrine à 5%, l'hydrochloride d'émétine, la paronomycine en solution à 10-15% dans le methylbenzéthonium chloride (voir Bryceson, 1987). Une étude menée sur 52 patients atteints de leishmaniose cutanée en Amérique du sud, a montré qu'un taux de guérison de 90% était obtenu lors de l'utilisation de la paronomycine, en combinaison avec du chlorure de methylbenzethonium (Krause et Kroeger, 1994);

- Les dérivés de l'antimoine sont utilisés pour traiter les cas de leishmaniose cutanée simple. Les lésions sont traitées par administration de 1 à 3 ml de Pentostam® (10mg/ml) au niveau de celles-ci. Si les lésions cutanées sont ulcérées ou enflammées, l'administration par voie générale d'antimoniés pentavalents à raison de 10-20 MKD est recommandée (OMS, 1990);

Les composés les plus intéressants semblent être la paronomycine, la berbérine et l'allopurinol (El-on *et al.*, 1988).

B. La vectorisation de principes actifs.

La localisation particulière des amastigotes de leishmanies dans la vacuole parasitophore confère un grand intérêt aux vecteurs colloïdaux. Un concept basé sur l'incorporation d'un principe actif dans des vecteurs colloïdaux, qui seront phagocytés par les macrophages du système phagocytaire mononucléé et libéreront leur contenu dans les phagolysosomes a été élaboré. Ces vecteurs de médicaments sont capables de modifier la biodistribution de ceux-ci, entraînant une réduction de leur toxicité permettant ainsi d'administrer des doses plus élevées en limitant l'apparition d'effets indésirables. Les vecteurs colloïdaux ont fait l'objet d'un nombre considérable de travaux et aujourd'hui certaines formulations sont en phase d'évaluation clinique (Croft *et al.*, 1991, Davidson *et al.*, 1991, Cuvreur, 1993).

1. Vectorisation des dérivés de l'antimoine.

Les dérivés de l'antimoine ont un temps de demi-vie très court. Chez le rat, 50% de ces composés sont excrétés dans les deux heures qui suivent l'injection (Rao *et al.*, 1983). L'intérêt majeur de la vectorisation des dérivés de l'antimoine réside en une meilleure distribution et une élimination plus lente du principe actif. En effet, la demi-vie du principe actif dans le foie et la rate est significativement prolongée après l'administration d'une forme liposomiale (Rao *et al.*, 1983). L'incorporation de cette molécule dans des liposomes a permis de multiplier par 200, chez la souris et par 700 chez le hamster, l'efficacité des dérivés de l'antimoine dans le cas d'une infection à *L. donovani* (Black *et al.*, 1977, Alving *et al.*, 1978).

2. Vectorisation de la pentamidine.

Des essais de vectorisation de la pentamidine ont été effectués. Sur les vecteurs contenant le médicament, des ligands spécifiquement reconnus par les macrophages ont été incorporés. Ainsi des érythrocytes de mouton, greffés avec l'immunoglobuline G, permettent d'éliminer 79% des amastigotes de *L.tropica in vitro* à une concentration de 2,2 µg/ml de pentamidine alors que 27 µg/ml de pentamidine non vectorisées sont normalement nécessaires pour obtenir le même effet (Berman *et al.*, 1984).

3. Vectorisation de l'amphotéricine B.

L'utilisation des liposomes d'amphotéricine B, dans la thérapie de la leishmaniose, a été initialement proposée par New *et al.* (1981). En utilisant un modèle d'infection viscérale chez la souris, ils ont démontré que l'efficacité de ces liposomes dépendait de la présence du cholestérol ainsi que de la nature des phospholipides. La présence des stérols, au niveau du vecteur, augmente significativement l'effet leishmanicide de ces systèmes. Une dose totale de 30 mg AMB/Kg (fungizone^R), administrée par voie intraveineuse en trois injections, élimine 99% de la charge parasitaire hépatique. De même, une réduction importante de la charge parasitaire hépatique et splénique de *L. donovani* chez le hamster et chez le singe, après administration de liposomes d'amphotéricine B, a été montrée (Berman *et al.*, 1986). Plus de 99% des parasites sont éliminés du foie et de la rate de hamsters après administration à des doses variant de 1,5 à 11 mg/Kg d'amphotéricine B vectorisées par des liposomes (Berman *et al.*, 1986).

Une autre formulation liposomiale unilamellaire d'amphotéricine B (Ambisome[®]) présente une plus grande efficacité (Ahmad *et al.*, 1991; Croft *et al.*, 1991). Des études cliniques montrent que cette formulation est efficace contre les infections résistantes aux dérivés de l'antimoine (Croft *et al.*, 1991; Davidson *et al.*, 1991; Giacchino *et al.*, 1993). Comme pour les dérivés stibiés, le fait de vectoriser cette drogue a une influence sur ses caractéristiques pharmacocinétiques. Le pic de concentration plasmatique maximale et le temps d'élimination de l'amphotéricine B sont augmentés avec une distribution plus importante dans le foie et la rate, quand ce médicament est associé aux liposomes par comparaison à la forme libre (Adler-Moore et Proffit, 1993).

L'utilisation de liposomes d'amphotéricine B permet donc non seulement de réduire fortement ses effets collatéraux mais aussi d'administrer rapidement des doses plus importantes de médicaments.

C. Immunothérapie et chimiothérapie combinées.

Les échecs, les rechutes et la toxicité des traitements classiques ont poussé les scientifiques à rechercher des thérapies alternatives basées sur une meilleure compréhension de l'immunologie de la leishmaniose. Les immunomodulateurs sont capables de moduler, chez un

individu, la réponse immunitaire humorale ou cellulaire, lui permettant de trouver ou de retrouver un équilibre homéostatique.

La résistance à l'infection est induite par l'effet cumulé de l'activité de plusieurs cytokines, l'INF- γ jouant un rôle très important dans la signalisation cellulaire (Rainer *et al.*, 1988). Ces cytokines sont capables d'activer directement les phagocytes mononucléés et de stimuler les effets microbicides intra et extracellulaires. Ainsi une douzaine de cytokines présentent un intérêt dans la lutte contre les agents pathogènes opportunistes (Murray, 1993; Ho *et al.*, 1994). La plupart des cytokines dérivées de cellules humaines sont actuellement en phase d'étude clinique, principalement pour le traitement de maladies néoplasiques ou hématologiques (IL-1, IL-3, Macrophage-CSF, Tumor necrosis factor, INF- γ) (Murray, 1993).

De par la localisation intramacrophagique des leishmanies, le potentiel immunomodulateur des cytokines a fait l'objet de plusieurs travaux visant à démontrer leur intérêt thérapeutique, administrées soit seules, soit en association avec une chimiothérapie. Des études *in vitro* montrent l'efficacité de l'INF- γ , du "colony stimulating factors" (Granulocyte macrophage-CSF) et du TNF à induire la tuerie intracellulaire des leishmanies. Ces études *in vitro* confirmées par une évaluation de leur activité *in vivo*. En effet, certaines cytokines comme l'INF- γ , l'IL-2, l'IL-12, le TNF et le GM-CSF, sont capables d'induire l'activité leishmanicide des phagocytes (Murray, 1993).

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

Le GM-CSF est capable d'activer les macrophages contre les souches de leishmanies qui provoquent des lésions cutanées (Murray *et al.*, 1993). Des études réalisées chez des patients atteints de leishmanioses viscérales montrent que le traitement par le GM-CSF, en combinaison avec l'antimoine, réduit la sévère neutropénie observée au cours de la maladie et réduit les infections intercurrentes (virales et bactériennes) observées chez certains patients (Ho *et al.*, 1994).

L'administration simultanée d'IL-12 et de Pentostam® entraîne la guérison des souris infectées par *L. major*. De façon intéressante cette guérison s'accompagne d'un "switch" de la réponse cellulaire Th2 vers une réponse de type Th1 (Narbors *et al.*, 1995).

Vectorisation d'immunomodulateurs. Dès 1984, l'équipe de Reed montrait que le surnageant de cultures spléniques préalablement stimulées par de la concavaline-A éliminait 90% des amastigotes intramacrophagiques *in vitro*. Cependant celui-ci était inactif *in vivo* chez la souris C57Bl/10 (B10)³. Après avoir encapsulé ce surnageant dans des liposomes, une injection produisait une réduction de 80% de la charge parasitaire *in vivo*. Par la suite, divers auteurs ont obtenu des résultats encourageants en associant des immunomodulateurs vectorisés, la tuftsine (un térapeptide) ou du muramyl-dipeptide (peptide provenant de la membrane de *Mybacterium tuberculosis*) à des dérivés de l'antimoine (Adinolfi *et al.*, 1985; Guru *et al.*, 1989). En effet, chez les souris sensibles à l'infection, l'élimination de la charge parasitaire hépatique a été maximale uniquement lorsque les deux agents étaient administrés simultanément. Enfin, des

essais de vectorisation de l'interféron- γ par des liposomes ont aussi été effectués (Hockertz *et al.*, 1991).

IV RECHERCHE DE NOUVEAUX ANTILEISHMANIENS: LES VOIES DE RECHERCHES FONDAMENTALES.

A. Recherches pharmacologiques.

Schématiquement, ce type de recherche correspond à quatre modalités principales: l'extraction de principes actifs à partir de produits de phytothérapie, leur analyse et éventuellement leur synthèse, les criblages systématiques ou ciblés, l'ingénierie moléculaire permettant des modifications structurales visant à améliorer l'efficacité, l'innocuité ou les caractéristiques pharmacodynamiques d'une molécule déjà connue.

1. Recherche de principes actifs issus de produits de phytothérapie: l'ethnopharmacologie.

L'objectif de l'ethnopharmacologie est de mieux connaître les remèdes médicaux traditionnels dans le but de s'en servir pour améliorer la santé. La fréquence des indications de remèdes vernaculaires par les populations locales a frappé les scientifiques occidentaux, médecins, pharmacologues et ethnologues. Cependant il est très difficile de trouver de nouvelles substances naturelles intéressantes dans un milieu naturel, contenant plusieurs dizaines de milliers d'espèces de végétaux. Chacune d'entre elles peut produire plusieurs dizaines voire centaines de molécules différentes. Comment décider du choix des espèces à étudier sachant que de telles recherches sont très coûteuses. L'ethnopharmacologie, qui est l'alliance de plusieurs disciplines, permet de déterminer les espèces importantes et donc de sélectionner les espèces à tester.

La principale difficulté est de cerner la sémantique des termes utilisés par les informateurs, car les données ne sont pas classées selon des critères scientifiques tant au niveau botanique qu'au niveau pharmacologique. Il est donc nécessaire d'établir un dictionnaire du savoir vernaculaire et de repérer l'espace de variation des usages des drogues.

Afin d'exploiter les données de terrain, les questions préliminaires, que doit résoudre l'ethnopharmacologie, sont les suivantes :

- comment choisir, parmi toutes les informations provenant du travail de terrain, celles qui mériteront de donner lieu à des tests pharmacologiques,
- le choix étant arrêté sur certains usages vernaculaires associant à chaque espèce ou "complexe de plantes", une ou plusieurs utilisations thérapeutiques, comment élaborer un protocole de recherche pharmacologique à partir de ces informations?

Les méthodes toxicopharmacologiques ou de suivie biologique permettront d'identifier les molécules actives. Brièvement, un extrait est réalisé selon le mode de préparation traditionnel. L'évaluation de l'activité pharmacologique de cet extrait selon les indications thérapeutiques traditionnellement revendiquées est réalisée. Après fractionnement des extraits, les propriétés pharmacologiques de ces fractions sont évaluées.

2. Les méthodes de criblage.

La recherche de nouvelles molécules peut être envisagée par l'intermédiaire de criblage à grande échelle. Cependant ceci nécessite le développement de tests d'activité susceptibles d'être automatisés. L'activité de molécules antileishmaniennes testées dans différents modèles est résumé dans le Tableau 2.

Tableau 2: Activité comparée de quelques molécules leishmanicides dans différents modèles.

	<i>in vitro</i> ^a				<i>in vivo</i> ^a	
	Pro	Ama-Pro ^d	Fibro Cell lines ^b	Mouse or Hum Macro ^c	Macro Cell line ^d	Souris ou Hamster
Sodium stibogluconate	-		-	++	++	++
<i>L. donovani</i>	-	++	-	++		+
<i>L. mexicana</i>						
Pentamidine						
<i>L. donovani</i>	++	++	-	+		+
<i>L. mexicana</i>	++	++	+	++		-
Allopurinol						
<i>L. donovani</i>	++	++		+	++	+
<i>L. mexicana</i>	++	++		+		+
Formycin B						
<i>L. donovani</i>	++			++	+	++
<i>L. mexicana</i>	++			++		++
Sinefungine						
<i>L. donovani</i>	++			++		++
<i>L. mexicana</i>	+			++		++
Chlorpromazine						
<i>L. donovani</i>	++			+		+
<i>L. mexicana</i>	++			++		+

a: activité: (-) peu ou pas d'activité, (+) peu ou faible activité, (++) forte activité.

b: Sodium stibogluconate et pentamidine testés sur des fibroblastes de chien.

c: Macrophage péritonéaux de souris ou monocytes humains.

d: Sodium stibogluconate testé sur des lignées macrophagiques U937, Allopurinol et formycine B sur P338D et J7748G.

d: Activité sur la transformation des formes amastigotes isolées de macrophages en formes promastigotes.

2.1. Modèles *in vitro*.

Formes promastigotes

Les formes promastigotes, facilement cultivables, sont souvent utilisées pour effectuer des tests de criblage médicamenteux de première intention. Cependant la chimiosensibilité des formes promastigotes semble être très différente de celle des formes amastigotes intramacrophagiques (Tableau 2). La relative insensibilité des formes promastigotes au Pentostam® et au Glucantime® est bien connue, alors que les formes amastigotes intramacrophagiques sont très sensibles aux dérivés pentavalents de l'antimoine.

Formes amastigotes

L'étude des composés interférants avec la transformation des formes amastigotes en formes promastigotes peut donner des indications sur la nature des voies métaboliques impliquées dans la transformation. Cependant elle ne peut donner d'indications sur celles impliquées dans la croissance des formes amastigotes. Par exemple, la pentamidine comme le Pentostam® interfère avec la transformation des formes amastigotes en formes promastigotes (Hart *et al.*, 1981).

Il existe de nombreux modèles permettant de déterminer l'activité de molécules leishmanicides sur la forme amastigote dans son contexte intracellulaire. Différents types de cellules ont été utilisés. Le protocole expérimental utilisé est le même pour tous les types cellulaires utilisés. Les macrophages infectés par des formes promastigotes ou amastigotes sont incubées dans le milieu contenant la molécule à tester pendant 4 à 7 jours. La température d'incubation varie avec l'espèce de leishmanie utilisée, 37°C pour *L. donovani* et 33-35°C pour *L. major* et *L. mexicana*. Les lignées THP-1 ou U937 (Martinez *et al.*, 1988; Gebre-Hiwot *et al.*, 1992) les macrophages péritonéaux de souris (Neal et Croft, 1984) et les monocytes humains (Berman et Wyler, 1980) sont les plus utilisés. La mesure de l'activité de la molécule est réalisée de différentes façons soit:

- en déterminant le pourcentage de cellules infectées par rapport à un témoin non traité,
- en déterminant le nombre d'amastigotes pour 100 cellules hôtes par rapport à un témoin non traité.
- après avoir lysé les macrophages, les parasites sont récupérés et transformés en formes promastigotes. L'incorporation de ³H thymidine est alors déterminée sur les formes promastigotes (Berman et Gallalee, 1985).

2.2. Modèles *in vivo*.

La plupart des infections effectuées *in vivo* sont réalisées avec des leishmanioses viscérales du complexe *L. donovani*. Le hamster est habituellement le modèle utilisé en laboratoire pour produire des infections. L'inoculation se fait généralement au niveau du foie ou du

péritoine, cependant la voie intracardiaque donne généralement une période de latence plus réduite. Des souris consanguines, très sensibles à l'infection, peuvent aussi être utilisées (Neal, 1987). D'autres modèles, comme le chien, sont aussi utilisés pour des études de chimiothérapie expérimentale.

3. L'ingénierie moléculaire.

En modifiant la structure d'un noyau ou d'une chaîne latérale, on peut considérablement améliorer les propriétés d'une molécule connue. Ayant bénéficié d'avancées techniques spectaculaires (modélisation assistée par ordinateur), cette approche devient d'autant plus rationnelle que progressent nos connaissances concernant les relations structure-activité. Malgré tout, les modes d'actions respectifs du Pentostam®, du Glucantime® et de la pentamidine qui sont pourtant les médicaments les plus utilisés pour traiter la leishmaniose sont loin d'être élucidés. La compréhension de leurs mécanismes d'action permettrait pourtant de pouvoir utiliser l'ingénierie moléculaire, afin d'améliorer leurs propriétés leishmanicides.

B. Recherches parasitologiques fondamentales.

Cette démarche est progressive, longue, peu spectaculaire, mais elle a l'avantage d'être rationnelle et peu aléatoire puisqu'elle revient à accumuler les connaissances fondamentales sur le parasite puis à en déduire les meilleurs points d'impact, pour de nouveaux principes actifs. En fait, toute différence biochimique entre le parasite et son hôte est une cible à potentialité thérapeutique. Cependant trouver des inhibiteurs spécifiques, qui ne soient ni toxiques ni létaux pour l'hôte, est très difficile. Les différences biochimiques existantes entre le parasite et les cellules hôtes sont potentiellement exploitables. Cependant nous ne citerons que deux exemples, la trypanothione réductase et les oligonucléotides "antisens".

1. Le trypanothion et son métabolisme: la trypanothione réductase.

Le glutathion est présent chez les eukaryotes comme les prokaryotes, à des concentrations de 1 à 10 mM. Les fonctions du glutathion sont nombreuses, il intervient notamment dans (i) la protection des cellules contre les radicaux libres et le maintien sous forme réduite des radicaux thiol, (ii) le métabolisme des peroxydes, (iii) le transport d'acides aminés (glutamate), (iv) la conjugaison de composés exogènes, notamment au niveau du métabolisme des drogues, (v) les fonctions de coenzymes.

Chez les trypanosomatidae, ce glutathion possède des caractéristiques particulières et a été appelé trypanothion (Tableau 3). La découverte de cette molécule et de l'enzyme (la trypanothione réductase) le maintenant sous forme réduite ($T(SH)_2$) a permis de mieux comprendre la régulation des groupements thiol chez les trypanosomes (Henderson et Fairlamb,

1987). La trypanothione réductase est une enzyme qui présente de nombreuses homologues avec la glutathione réductase humaine mais elle possède une remarquable spécificité pour leur substrat respectif.

Tableau 3: Principales propriétés de la trypanothione réductase. D'après Henderson et Fairlamb, 1987.

Propriétés	Trypanothione reductase	Glutathione reductase
Flavine	FAD	FAD
Pyridine nucléotide	NADPH	NADPH
Masse moléculaire kDa	53,8	50,0
Nombre de monomères	2	2
E _{ox} l max	464nm	464nm
T(S ₂)	Substrat	N'est pas substrat
N'-Glutathionylspermidine disulphide	Substrat	N'est pas substrat
GSSG	N'est pas substrat	Substrat

A partir de ces constatations de nombreuses études ont été effectuées sur la trypanothione réductase et un "design" rationnel d'inhibiteurs a été effectué (Murgolo *et al.*, 1990; Fairlamb, 1990; Garforth *et al.*, 1994). Les neuroleptiques tricycliques sont des inhibiteurs de la TR (Benson *et al.*, 1992). Le Benzoyl-Leu-Arg-Arg-β-Naphthylamide (Figure 4) inhibe spécifiquement la trypanothione réductase de *T. cruzi* mais pas la glutathione réductase. Cependant cette molécule est fortement chargée ce qui est un handicap pour une éventuelle utilisation en chimiothérapie (Garforth *et al.*, 1994).

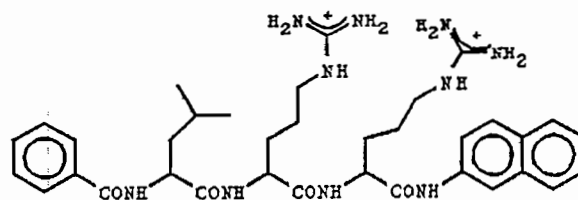


Figure 6. Structure du Benzoyl-Leu-Arg-Arg-β-Naphthylamide selon Garforth (1994).

2. La stratégie antisens.

Dans la stratégie antisens, les oligonucléotides, synthétiques ou produits *in situ* par des constructions d'ADN, sont utilisés pour reconnaître spécifiquement un ARN messager. Le but est d'inhiber la synthèse de la protéine correspondante, soit en induisant le clivage de l'ARNm

par la RNase, soit en bloquant physiquement l'ARNm ou en modifiant son métabolisme. Certains parasites, comme les trypanosomes ou les leishmanies, constituent des cibles intéressantes pour la stratégie antisens. En effet, les ARNm de ces parasites possèdent la propriété d'avoir une séquence commune à leur extrémité 5'. Cette séquence provient d'une réaction d'épissage en "trans" utilisant comme donneur un ARN de 90 nucléotides environ, obtenu par transcription d'un gène spécifique du parasite. La séquence commune ainsi obtenue est de 39 nucléotides chez *Leishmania* et de 37 nucléotides chez *Trypanosoma*. Un oligonucléotide complémentaire de cette région commune est donc susceptible d'inhiber la traduction de l'ensemble des messages du parasite. Cette approche a été utilisée avec succès sur *Trypanosoma brucei* en culture, en utilisant un conjugué nonanucléotide-intercalant (Verspieren *et al.*, 1987) et sur *Leishmania amazonensis* dans des macrophages en utilisant des oligophosphorothioates. Une concentration de l'ordre de 10 mM d'oligophosphorothioates 16mer complémentaires, pendant 24 heures entraîne une stérilisation de 30% des macrophages infectés (Pascolo *et al.*, 1993; Ramazaille *et al.*, 1994). Les oligophosphorothioates sont des analogues des nucléotides résistants aux DNases mais sensible à la RNase H entraînant une digestion de l'ARN ciblée (Hélène et Saison-Belmoaras, 1994).

La stratégie antisens fournit les bases d'une nouvelle approche thérapeutique, fondée sur l'inhibition sélective de l'expression des gènes, plutôt que sur celle des produits de cette expression, c'est à dire les protéines. Cependant les effets secondaires potentiels, dus à la fixation des oligonucléotides antisens sur d'autres cibles que les acides nucléiques restent à évaluer.

V. LA CHIMIORESISTANCE.

De façon anecdotique, le premier rapport de ce qui semble être une résistance a été rapportée par Elliotson en 1844. Il notait: "quand nous avons utilisé pour la première fois le sulfate de quinine, j'étais capable de soigner les malades (fièvre intermittente) avec un ou deux grains, deux à trois fois par jour mais maintenant ceci n'arrive plus très souvent". De nos jours, les phénomènes de chimiorésistance sont un problème souvent rencontré au niveau des traitements. A l'heure actuelle, les problèmes de chimiorésistance compliquent considérablement la thérapie de nombreuses parasitoses. Le cas du paludisme chimiorésistant est bien connu. Chez des patients atteints de leishmanioses viscérales ou cutanées de nombreux cas de non-réponse au sodium stibogluconate sont bien connus et ont été décrits (Wali *et al.*, 1992; Sundar *et al.*, 1994). En Inde, on estime que sur les 100 000 patients ayant un kala-azar dans la province de Bihar, 10 000 ne répondent pas au sodium stibogluconate (Thakur *et al.*, 1991). Contrairement au paludisme, le lien entre résistance des parasites à cette drogue et non réponse au traitement chez les patients n'est pas encore bien établi. Une meilleure compréhension des mécanismes intervenant dans cette chimiorésistance permettrait, comme dans le cas de *Plasmodium*, de mettre au point des outils permettant de diagnostiquer cette chimiorésistance.

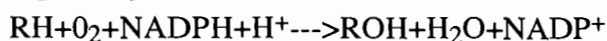
A. Mécanismes responsables d'une chimiorésistance.

1. Mécanismes intracellulaires.

1.1. Mécanismes de détoxification.

Quand un agent xénobiotique pénètre dans une cellule, il entraîne généralement des changements métaboliques. La cellule peut réagir en métabolisant ce produit pour le rendre, soit moins toxique soit pour l'excréter plus facilement en le rendant plus hydrophile. Différentes enzymes sont impliquées dans les mécanismes de détoxification cellulaire. Certains mécanismes de détoxification ont été mis en évidence chez différents parasites, d'autres non. Nous donnerons pour exemple l'action du cytochrome P-450.

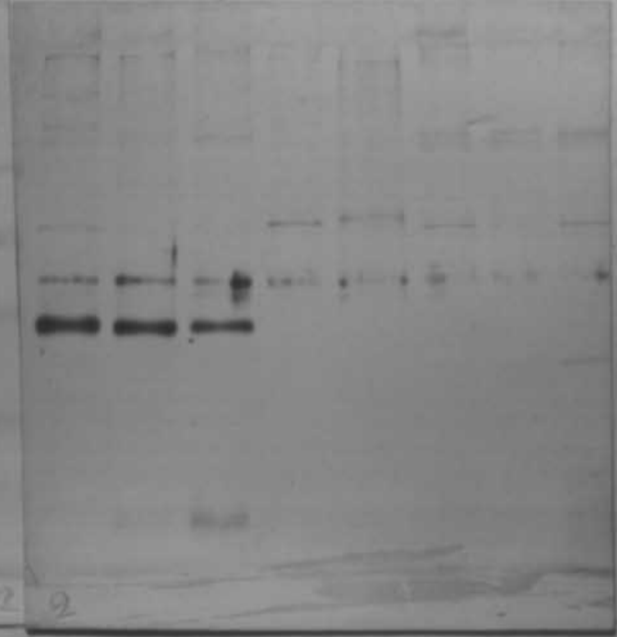
Les cytochromes P-450. La famille des cytochromes P-450 se distingue de celle des cytochromes transporteurs d'électrons par leur activité enzymatique. Ils fonctionnent, soit comme des monooxygénases, soit comme des déhydroxylases. La bande spectrale caractéristique à 450nm, donnée par tous les cytochromes P-450 réduits lorsqu'ils sont mis en présence de monoxyde de carbone, sert à les caractériser (Pelmont, 1989). La plupart des études effectuées sur les P-450 ont été effectuées sur les microsomes de foie de mammifère. La réaction générale catalysée par le cytochrome P-450 est la suivante:



RH étant le substrat de la réaction.



PR }
 PS }
 AS }
 Ld: P
 Ld: A
 PS Lm
 AS Lm
 ARL



-98

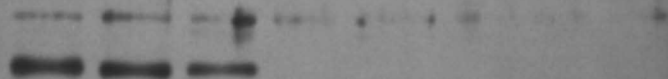
-64

-50 47 Kd.

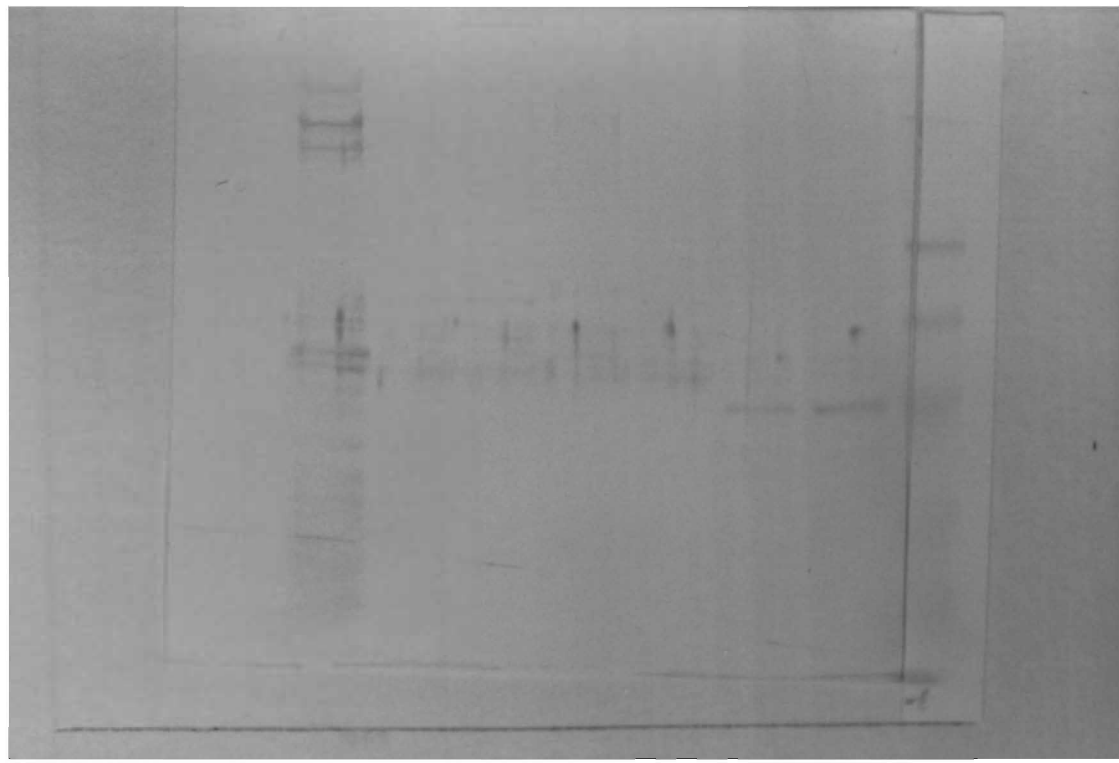
-86

-30

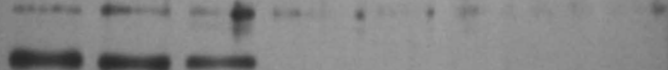
A₁ A₂ P₂ P₁



2 2



Al₂As₃Pr



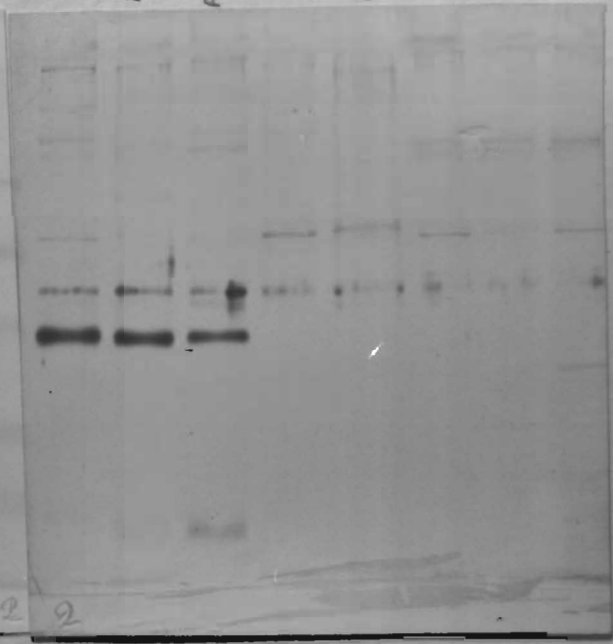
2 2



PA PS AS Ld Ld₁ PS AS A

2 2

2



ROH le produit de la réaction.

Un mécanisme de détoxification impliquant un cytochrome P-450 a été mis en évidence chez les épimastigotes de *Trypanosoma cruzi* qui sont naturellement peu sensibles au métronidazole. En fait, le métronidazole est activement métabolisé par ces organismes par l'intermédiaire d'un cytochrome P-450 (Morello, 1988). Une activité plus importante du cytochrome P-450 serait responsable de la chloroquino-résistance de *Plasmodium falciparum* (Ndifor *et al.*, 1990). Ces différences d'activité seraient dues à une expression plus importante cytochrome P-450 (Surolia *et al.*, 1993).

Chez *Leishmania*, aucun mécanisme de détoxification, impliquant le cytochrome P-450 n'a été mis en évidence, bien que l'on sache que la pentamidine soit hydroxylée par les cytochromes P-450 issue de microsomes de foie de mammifères (Berger *et al.*, 1990a, 1990b).

1.2. Mécanismes impliquant la cible biochimique de la drogue

Mutations ponctuelles. La Dihydrofolate réductase (DHFR)(EC 1.5.1.3) et la Thymidylate synthétase (TS)(EC 2.1.1.45) agissent de façon séquentielle dans la synthèse *de novo* des pyrimidines. Chez certains parasites protozoaires (par exemple *Plasmodium* et *Leishmania*), la TS et la DHFR se présentent sous la forme d'un complexe enzymatique bifonctionnel, de masse moléculaire allant de 85 à 240 kDa, alors que chez les eukaryotes les deux activités sont portées par des protéines séparées.

Les antifolates inhibant la DHFR de *Plasmodium*, tels que la pyriméthamine ou le proguanil, sont couramment utilisés pour traiter cette parasitose. Mais de nombreux cas de résistance et de nombreux isolats résistants à ces drogues ont été mis en évidence. Un des mécanismes fait intervenir des mutations ponctuelles au niveau du gène codant pour la DHFR. La protéine présente des altérations au niveau de sa structure et montre une affinité diminuée pour la drogue (Chen *et al.*, 1987). En fait plusieurs cas de figures peuvent se produire. Des études cliniques ont montré qu'il était possible de traiter certains parasites réfractaires à la pyriméthamine avec du proguanil et vice versa. En fait, les parasites possédant une paire de mutation Ala 16-->Val16 et Ser 108-->Thr 108 sont résistants au proguanil mais ne présentent pas de résistance croisée à la pyriméthamine. Une simple mutation au niveau de Asn 108 confère la résistance à la pyriméthamine avec seulement une faible susceptibilité au proguanil. Enfin il existe de très fortes résistances croisées entre ces deux drogues lorsque les mutations Ser108-->Asn108 et Ile164-->Leu164 sont observées (Peterson *et al.*, 1988; Hyde, 1989; Zolg *et al.*, 1989; Peterson *et al.*, 1990). Plus récemment, des mutations se situant au niveau du résidu serine en position 110 muté en asparagine et une mutation au niveau du résidu serine-->phenylalanine en position 177 ont été mises en évidence au niveau de souches de *Plasmodium berghei* résistantes au proguanil. (Van Djik *et al.*, 1994). L'étude de ces mutations a permis de mettre au point une méthode de détection rapide basée sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour diagnostiquer une chimiorésistance à la pyriméthamine ou au cycloguanil (Zolg *et al.*, 1990; Gyang *et al.*, 1992).

Surexpression de l'enzyme cible. Chez des *Plasmodium* chimiorésistants aux antifolates, une augmentation du taux de DHFR avec ou sans changement de ses propriétés enzymatiques a été montrée (voir Zolg *et al.*, 1989; Inselburg et Banyal, 1987).

2. Mécanismes membranaires.

2.1. Les P-glycoprotéines.

Les cellules multirésistantes de mammifères présentent habituellement une amplification du gène de multidrogue résistance "*mdr*" avec une surexpression de la protéine correspondante, la P-glycoprotéine (Endicott et Ling, 1989). Cette P-glycoprotéine (pgp) est une grande protéine trans-membranaire qui fonctionne comme une pompe ATP-dépendante (Gottesman et Pastan, 1993). Le CFTR (Cystic Fibrosis transmembrane regulator) et les protéines associées à la multidrogue-résistance (MRP) font aussi partie de l'ABC (ATP Binding Cassette) comme la P-glycoprotéine. Ces P-glycoprotéines ont été mises en évidence chez plusieurs parasites (Table 4).

Tableau 4: Propriétés des P-glycoprotéines de différents parasites, d'après Ullman, 1995.

Organismes	<i>pgp</i> gène	Masse moléculaire (kDa)	Nombre d'acides aminés	% d'homologie avec le <i>mdr1</i> humain
<i>P. falciparum</i>	<i>pfmdr1</i>	162	1419	33
	<i>pfmdr2</i>	119	1025	26
<i>Leishmania</i>	<i>ltgpA</i>	172	1548	22
	<i>ldmdr1</i>	147	1341	37
<i>E. histolytica</i>	<i>Eh Pgp1</i>	145	1302	41
	<i>EhPgp2</i>	145	1310	41
	<i>Ehabc1</i>	92	808	ND
<i>T. vaginalis</i>	<i>Tvpgp1</i>	65	589	32-35

Structure de la P-glycoprotéine, relation structure-activité. La séquence d'acides aminés de la P-glycoprotéine, déduite de la séquence nucléotidique des différents gènes "*mdr*", a permis d'établir un modèle structural de la protéine; celle-ci est formée de deux parties symétriques provenant vraisemblablement de la duplication d'un gène ancestral. Le profil hydropathique montre que chacune de ces deux portions contient un domaine hydrophobe composé de six segments transmembranaires et un domaine hydrophile incluant les motifs Walkers A et B qui révèlent la présence d'un site de fixation de l'ATP.

L'implication des gènes *mdr* dans la résistance cellulaire aux médicaments a été formellement démontrée par transfection. Ainsi l'expression des gènes murins *mmdr1* et *mmdr3*, de même que celle du gène humain *hmdr1* dans des cellules sensibles aux médicaments est responsable de l'acquisition d'une résistance multiple. Des expériences similaires ont toutefois démontré que les gènes murins *mmdr2* et humains *hmdr2* ne sont pas impliqués dans le phénotype de résistances croisées aux médicaments. Différentes mutations ponctuelles dans divers segments transmembranaires changent la spécificité de la P-glycoprotéine pour différents médicaments en modifiant l'affinité de ceux-ci pour le transporteur (Pedersen, 1995).

La région hydrophile quant à elle, est associée à l'utilisation de l'énergie issue de l'ATP. Cette énergie étant nécessaire au fonctionnement de la pompe. La région hydrophobe de la pgp serait impliquée dans la reconnaissance des médicaments.

L'analyse des nombreuses mutations, des différentes isoformes de la pgp, a permis de révéler des acides aminés à proximité ou dans la région trans membranaire (TM) dont la substitution modifie l'affinité et l'excrétion de certains médicaments.

Les P-glycoprotéines chez les parasites autres que *Leishmania*. La participation d'une P-glycoprotéine dans les cas de résistance à la chloroquine chez *Plasmodium*, a été proposée. Deux gènes analogues au "*mdr*" ont été mis en évidence, le *pfmdr1* et le *pfmdr2*. Le gène *pfmdr1* code pour une protéine de 162 acides aminés, homologue aux P-glycoprotéines et nommée pgh1. Cette protéine est localisée au niveau de la vacuole digestive du parasite. Elle interviendrait dans les phénomènes de résistance à la chloroquine, à la mefloquine et à l'halofantrine (Foote *et al.*, 1989; Wilson *et al.*, 1989; Moreau, 1989; Cowman, 1991, Wellems *et al.*, 1991; Martin, 1993; Cowman *et al.*, 1994; Mockenhaupt, 1995).

Le gène *pfmdr2* code pour une protéine de 110 kDa qui est exprimée de façon stade-dépendant, préférentiellement au stade trophozoite et non au stade ring (Zalis *et al.*, 1993). Cependant le rôle de cette protéine n'est pas connu et n'a pas été corrélé avec un mécanisme de résistance.

Dans le cas de la résistance à la chloroquine, l'implication du gène "*mdr*" est de plus en plus controversée (Mockenhaupt, 1995). En effet les croisements génétiques entre des parasites résistants et sensibles ont montré qu'il n'y avait pas de liaison entre les parasites chloroquinorésistants et le gène "*mdr*" (Wellems *et al.*, 1990). De plus, une étude portant sur des clones hautement résistants à la chloroquine de *Plasmodium falciparum* suggère que la très forte expression de pgh1 est incompatible avec la résistance à la chloroquine (Barnes *et al.*, 1992).

2.2. Altération de l'entrée de la drogue.

Une altération dans la perméabilité aux antifolates a aussi été montrée sur des souches de *Plasmodium* résistantes aux antifolates (Banyal et Inselburg, 1986).

B. Mécanismes connus chez *Leishmania*.

Il existe plusieurs mécanismes impliqués dans la chimiorésistance chez *Leishmania*. Les mécanismes de chimiorésistance ont surtout été étudiés *in vitro* sur des souches de leishmanies sous forme promastigote. Les souches résistantes sont sélectionnées par pression médicamenteuse en augmentant progressivement la quantité de drogue. Ces études ont souvent montré une amplification d'un gène codant pour l'enzyme cible de la drogue (Beverley *et al.*, 1988; Beverley, 1991; Ouellette et Papadopolou, 1993; Segovia, 1994). Cependant ce mécanisme d'amplification d'une portion du génome n'est pas propre aux mécanismes de chimiorésistance et peut être rencontré chez des souches de leishmanies n'ayant pas été sélectionnées pour une résistance, c'est le cas des amplicons nommés LD1 (Tripp *et al.*, 1991; Tripp *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 1994; Peter *et al.*, 1994), de la région D chez *L. tropica* (Hightower *et al.*, 1988) ou de la région T chez *L. tarentolae* (Petrillo-Peixoto et Beverley, 1989).

1. Les P-glycoprotéines.

Chez leishmania, les P-glycoprotéines les mieux caractérisées sont *ltpgpA* et *lmpgpA*. Celles-ci ont été isolées chez *L. tarentolae* et *L. major* respectivement. Le gène amplifié a été localisé sur un élément extrachromosomal circulaire. Cet élément est désigné sous le terme de région H et est observé lors de sélections de parasites résistants à des drogues structurellement très différentes, incluant le méthotrexate, l'arsénite, la primaquine et la terbinafine (Ellenberger et Beverley, 1989; Katakura et Chang, 1989; Callahan et Beverley, 1991; Ouellette *et al.*, 1990, 1991; Ouellette et Borst, 1991). De plus il existe au moins quatre autres gènes de cette classe qui ont été identifiés chez *L. tarentolae*: ce sont les *ltpgpB*, *C*, *D* et *E*. Cependant tous n'ont pu être associés avec un phénomène de chimiorésistance (Légaré *et al.*, 1994).

1.1. Le gène *pgpA*.

L'analyse de la séquence du gène *ltpgpA* et le profil hydropathique montrent des caractéristiques communes avec les P-glycoprotéines. Cependant la protéine *ltpgpA* montre une plus grande similarité avec les MRP (Cole *et al.*, 1992, 1994; Hipfner *et al.*, 1994; Almquist *et al.*, 1995) qu'avec la protéine issue du *hmdr1* humain. Les phénotypes des leishmanies contenant une amplification du cercle H sont très différents de ceux observés chez les cellules multirésistantes de mammifères. Ces parasites multirésistants sont généralement sensibles aux agents hydrophobes, substrats de la P-glycoprotéine de mammifères (Ellenberger et Beverley, 1989; Ouellette *et al.*, 1990, 1991a). Le phénotype très complexe de ces parasites peut être attribué à la présence d'un gène supplémentaire sur cette région H, le gène *ltdh* chez *L. tarentolae* (Papadopolou *et al.*, 1992) et *ptr1* chez *L. major* (Callahan et Beverley, 1992; Bello *et al.*, 1994). *Ltdh* et *ptr1* codent pour une protéine ayant une activité ptéridine-réductase responsable de la

résistance au MTX (Bello *et al.*, 1994). La contribution relative du gène *pgpA*, au phénotype complexe de multirésistance observé chez les leishmanies multirésistantes, a été étudiée à l'aide d'expériences de transfection. Il a été montré que le gène *pgpA* conférait un faible niveau de résistance à l'arsénite et aux antimonies, mais pas à d'autres métalloïdes, ni à la vimblastine ou à la puromycine, chez *L. tarentolae* et *L. major* (Callahan et Beverley, 1991; Papadopoulou *et al.*, 1994). Cette résistance n'est pas "réversée" par le vérapamil, comme cela est le cas chez les cellules multirésistantes de mammifères ou chez les chloroquino-résistants de *Plasmodium*. Aucune différence dans "l'uptake" d'arsénite n'a été observée après transfection du gène *ltpgpA* chez *L. tarentolae* (Papadopoulou *et al.*, 1994), alors que si l'on transfecte le gène *lmpgpA* chez *L. major*, ces mutants accumulent beaucoup moins d'arsénite que les sauvages (Callahan *et al.*, 1994). La diminution de "l'uptake" d'arsénite, chez les mutants ayant été transfectés par le gène *lmpgpA*, est attribuée à une diminution de l'influx, plus qu'à une augmentation de l'efflux (Callahan *et al.*, 1994). Ainsi la *pgpA* paraît agir comme la *pgh1* de *Plasmodium*, en diminuant l'influx plus qu'en augmentant l'efflux.

La chimiorésistance aux dérivés pentavalents de l'antimoine (Pentostam® et Glucantime®). La caractérisation de souches de leishmanies résistantes au Pentostam® a montré qu'elles accumulaient beaucoup moins de Pentostam® que les souches sauvages (Grögl *et al.*, 1989, 1991). Ces souches résistantes présentent des protéines réagissant au C-219, qui est un anticorps monoclonal reconnaissant les *pgp* de mammifères (Grögl *et al.*, 1991). D'autre part, la transfection du gène *ltpgpA* chez une souche sauvage de *L. tarentolae* entraîne une résistance au Pentostam® (Papadopoulou *et al.*, 1992) ce qui n'est pas le cas lors de la transfection du gène *lmpgpA* chez *L. major* (Callahan et Beverley, 1991). D'autre part il a été montré une amplification du gène *ltpgpA* chez *L. guyanensis* résistant au glucantime (Ferreira-Pinto *et al.*, 1996). Comme nous l'avons déjà mentionné la protéine *ltpgpA* montre une plus grande similarité avec les MRP qu'avec les P-glycoprotéines de mammifères, récemment il a été montré que ces MRP étaient capables de conférer une résistance aux arseniés (Müller *et al.*, 1994). Ce transport actif nécessitant la conjugaison à du glutathion, les MRP protéines se comportent comme des transporteurs de glutathion S-conjugués (Zaman *et al.*, 1995). La présence de transporteur a été montré sur *L. tarentolae* (Dey *et al.*, 1996), de plus des parasites chimiorésistants à l'arsénite présentent une concentration plus importante de trypanothion (Mukhopadhyay *et al.*, 1996). Ces mêmes auteurs proposent un mécanisme de résistance à l'arsénite. Ce mécanisme pourrait être transposé au Pentostam® et expliquerait le mécanisme d'action de cette molécule. Le Pentostam® serait réduit par le GSH en composé trivalent toxique pour les parasites. Le mécanisme de résistance faisant intervenir la conjugaison du dérivé trivalent au trypanothion puis l'expulsion par un transporteur.

1.2. Le gène *pgpE*.

Il a été montré récemment une amplification du gène *ltgpgE*, après sélection de souches de *L.tarentolae* chimiorésistantes au MTX. Ces souches montrent une augmentation d'une activité ATPasique de type P, associée à une surexpression du gène *ltgpgE* (Sanchez *et al.*, 1994; Gamarro *et al.*, 1994). Cependant cette surexpression est corrélée avec un réarrangement du gène *ltgpgE*. Le phénotype de ces mutants est assez intéressant puisque ceux-ci présentent des faibles résistances croisées à l'arsénite, la vinblastine, la puromycine et la doxorubicine (Gamarro *et al.*, 1994).

1.3. Les gènes *ldmdr1* et *lemdr1*.

Une seconde classe de gène de P-glycoprotéines a été identifiée et caractérisée chez *Leishmania*. Ces gènes confèrent des phénotypes similaires à ceux des cellules multirésistantes de mammifères. Les gènes *ldmdr1* et *lemdr1* ont été isolés sur des souches de *L. donovani* et *L. enrietti* résistantes à la vinblastine (Henderson *et al.*, 1992; Chow *et al.*, 1993). Ces souches résistantes à la vinblastine montrent des résistances croisées à la puromycine, cependant à la différence des cellules de mammifères multirésistantes, leur résistance n'est pas réversée par le vérapamil. Le rôle physiologique des gènes *ldmdr1* et *lemdr1* chez *Leishmania* n'est pas connu, de plus les promastigotes n'expriment que très peu de transcrits correspondants (Henderson *et al.*, 1992; Chow *et al.*, 1993).

2. Altération de l'entrée de la drogue.

Les leishmanies résistantes au MTX montrent une altération du transport du folate et du MTX, ces deux substances passant par le même transporteur (Ellenberger *et al.*, 1987). Lors d'une sélection, en une seule étape, un clone de *L. donovani* résistant au MTX a été isolé. Celui-ci présente une déficience totale en transporteur du MTX et du folate (Kaur *et al.*, 1988). Des souches de *L. donovani* résistantes à la sinéfungine ont montré une concentration intracellulaire de cette drogue réduite par rapport aux souches sauvages. Cependant la sinéfungine est une drogue ayant une activité pléiotropique, d'autres mécanismes semblent intervenir dans la chimiorésistance à cette molécule (Phelouzat *et al.*, 1993).

3. Altération de la cible biochimique de la drogue.

3.1. Surexpression de l'enzyme cible de la drogue.

Ce mécanisme de résistance par amplification d'une partie du génome paraît être un des principaux pour *Leishmania*, par contre il n'a jamais été montré chez les *Trypanosoma brucei* chimiorésistants à différents produits cytotoxiques (Ouellette et Papadopoulou, 1993). Dans le

cas des leishmanies chimiorésistantes au Methotrèxate (MTX) on observe une amplification de deux régions extrachromosomales, la région R (région circulaire de 30Kb) portant le gène de la DHFR-TS (Beverley *et al.*, 1986) et la région H (Coderre *et al.*, 1983; Beverley *et al.*, 1984; Washtien *et al.*, 1985).

Dans le cas des lignées résistantes à la tunicamycine (inhibiteur de la N-Acetylglucosaminyltransférase) une amplification d'une région extrachromosomale a été observée sur 5 souches de leishmanies résistantes à cette drogue (Kink et Chang, 1987; Liu et Chang, 1993). Cette région se présente sous la forme d'une molécule circulaire de 63Kb nommée G DNA et portant le gène de la N-acétylglucosaminyltransférase (Detke *et al.*, 1988).

Chez les leishmanies résistantes au DFMO (DL- α -difluorométhylornithine) qui est un inhibiteur de l'ODC (Ornithine décarboxylase), une amplification particulière a été mise en évidence. Cette amplification se présente sous forme linéaire et contient le gène codant pour l'ODC, ce gène a été cloné (Katakura *et al.*, 1991; Hanson *et al.*, 1992a, 1992b). Une amplification linéaire a aussi été observée lors de la sélection de mutants chimiorésistants à un inhibiteur de l'inositol monophosphate déshydrogénase (Wilson *et al.*, 1991, 1992).

Les mécanismes de chimiorésistance ont beaucoup été étudiés notamment au niveau des cellules cancéreuses de mammifères et dans le cas des parasitoses chez *Plasmodium*. Les cas d'amplification au niveau du gène sont particulièrement bien étudiés chez *Leishmania*.

3.2. Altération des propriétés enzymatiques.

Chez *Leishmania* lors de la sélection de souches chimiorésistantes au MTX, un mutant montrant une amplification de la région R et portant une mutation ponctuelle, a été isolé. En fait, ce mutant présentait une activité DHFR-TS altérée, une simple mutation au niveau de la base 158, entraînait une substitution de la méthionine en position 53 par une arginine (Arrebola *et al.*, 1994). Cette nouvelle enzyme possède une activité DHFR réduite et une moins grande affinité pour son inhibiteur le MTX (Arrebola *et al.*, 1994).

VI. Objectif du travail.

Les leishmanioses, maladies parasitaires endémiques dans les régions tropicales subtropicales et dans la zone méditerranéenne, constituent un problème majeur de santé publique au regard du nombre de sujets infectés ou exposés aux différentes espèces de leishmanies dans le monde. Elles sont considérées comme endémiques dans 88 pays dont 72 sont en voie de développement. Outre le fait que ces maladies touchent à la fois l'homme et de nombreux animaux, elles sévissent de plus en plus chez les sujets immunodéprimés, du fait du SIDA ou des traitements immunodépresseurs. Dans ces conditions, l'affaiblissement de l'immunité protectrice aura pour conséquence de rompre l'équilibre en faveur du parasite.

Le traitement médicamenteux de la leishmaniose, classiquement utilisé pour lutter contre ces maladies, pose encore aujourd'hui de sérieux problèmes. De par la toxicité des quelques molécules actuellement utilisées en chimiothérapie, il devient urgent de disposer de nouveaux médicaments très actifs contre ces parasites. Leur position intramacrophagique obligatoire, représentant un exemple d'adaptation intracellulaire tout à fait étonnant, rend d'autant plus difficile: (i) la mise au point de nouveaux traitements, (ii) la mise en contact du médicament avec le pathogène, (iii) la mise en place de modèles expérimentaux nécessaires au criblage médicamenteux. Cette situation intracellulaire met l'accent sur la nécessité de rechercher des composés hautement actifs vis à vis du stade parasitaire présent chez l'hôte infecté, le stade amastigote.

Durant ces dernières années, le Laboratoire de Biologie Parasitaire a concentré ses efforts sur l'obtention d'un système alternatif à l'expérimentation animale consistant à la production continue, en conditions contrôlées, du stade intracellulaire des différentes espèces de leishmanies. Ces modèles biologiques ont permis d'évaluer la sensibilité de la forme présente chez l'hôte infecté (i) aux composés microbicides produits par les macrophages activés, notamment à l'oxyde nitrique, (ii) aux différents composés utilisés pour traiter la leishmaniose.

La détermination des profils de chimiosensibilité des formes amastigotes de différentes espèces de leishmanies comparativement aux formes promastigotes, a révélé tout l'intérêt de l'utilisation d'un test de criblage d'activités leishmanicides directement sur le stade parasitaire médicalement important. Ce modèle aisément transférable vers les pays du sud concernés et offrant de multiples avantages par rapport aux méthodes classiques de criblage médicamenteux, représente donc un excellent outil dans le domaine de la parasitologie et de la pharmacologie.

Les échecs thérapeutiques et les rechutes après chimiothérapie représentent un autre problème majeur rencontré dans le traitement de ces parasitoses. Ceux-ci sont à relier avec l'émergence des phénomènes de chimiorésistance. De façon contradictoire, les études de chimiorésistance *in vitro* portent sur des molécules qui ne sont pas utilisées en thérapie antileishmanienne ni sur le stade parasitaire réellement en contact avec la drogue. Aucune information n'est disponible quant: (i) au bon déroulement du cycle de développement parasitaire d'une lignée chimiorésistante (indispensable à la survie et à la propagation du parasite) (ii) à

l'éventuelle transmission du caractère chimiorésistant au cours de ce cycle. La réalisation *in vitro*, en condition axénique, du cycle de développement parasitaire des leishmanies nous a permis de: (i) sélectionner rapidement des mutants chimiorésistants des deux stades parasites et d'en comparer les caractéristiques phénotypiques, (ii) cerner, pour la première fois, les modalités de la transmission du caractère chimiorésistant au cours du cycle de développement parasitaire. Il est intéressant de constater qu'au cours de celui-ci la stabilité du phénotype résistant est dépendante du degré de chimiorésistance induite. Ces résultats mettent l'accent sur le problème des thérapies mal conduites, pouvant induire un fort degré de chimiorésistance et donc avoir des répercussions dramatiques sur la propagation de telles souches dans la nature.

L'infectivité des formes promastigotes de leishmanies et l'établissement durable du parasitisme sont dépendants du bon déroulement des différentes étapes du cycle évolutif: attachement aux macrophages, internalisation, différenciation, survie et multiplication des amastigotes intracellulaires. La caractérisation de lignées chimiorésistantes à la pentamidine de *L. amazonensis* a conduit à la mise en évidence de mutants avirulents *in vitro* vis à vis de macrophages péritonéaux de souris et *in vivo* dans un modèle expérimental murin. L'étude des différentes étapes du cycle de développement de ces mutants indique que le mécanisme de résistance serait impliqué dans le processus de prolifération des amastigotes. Tout se passe comme si un dysfonctionnement au niveau du stade promastigote induisait soit un arrêt de la prolifération du stade ultérieur soit court-circuitait l'étape de multiplication du stade amastigote. La caractérisation de ces mutants ouvre incontestablement de nouvelles perspectives en chimiothérapie et en vaccinologie. En effet ces modèles biologiques permettront d'aborder de façon rationnelle les mécanismes de résistance à l'échelle moléculaire, l'objectif final étant d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Par ailleurs, la mise en évidence de gènes codant pour des molécules jouant un rôle dans les processus de division et de différenciation parasites peut être une approche originale vers l'obtention de souches atténuées, et par conséquent d'une nouvelle génération de vaccins anti-parasitaires.

CHAPITRE 2: TRAVAUX PERSONNELS.

CHAPITRE 2: Travaux personnels.**I. Travaux personnels ayant donné lieu à publications et soumis à publications**

Sensibilité et mécanisme effecteur de l'oxyde nitrique chez les formes amastigotes de différentes espèces de leishmanies. (Accepté pour publication, *Experimental Parasitology*)

L'oxyde nitrique ou NO est considéré actuellement comme l'une des principales molécules microbicides synthétisées par les macrophages activés. Des études récentes dans le domaine de la parasitologie ont clairement établi que la production *in vivo* du NO était directement associée au contrôle de la maladie chez des souris infectées par *L. major*, démontrant définitivement le rôle protecteur du NO. Par contre, chez les leishmanies, les cibles moléculaires de ce dérivé nitré étaient peu connues. L'activité leishmanicide du NO a uniquement été démontrée *in vitro* sur les formes promastigotes de *L. major*, stade parasitaire rencontré chez l'insecte vecteur. En effet, il n'était pas aisé de mettre en évidence les mécanismes par lesquels le NO exerçait son effet cytotoxique sur des parasites en situation intracellulaire. Le développement récent dans notre laboratoire de cultures axéniques des formes amastigotes de différentes espèces de leishmanies a rendu possible la détermination de l'effet et du mécanisme d'action du NO chez les formes amastigotes, seul stade parasitaire rencontré dans les macrophages de l'hôte infecté.

Principaux résultats

1) En pulsant en condition anaérobie pendant 15 minutes du NO gazeux (1%), véhiculé par de l'azote (99%), directement sur les formes amastigotes de culture de *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* et *L. chagasi*, nous avons pu mettre en évidence des activités leishmanicide et leishmaniostatique directement dirigées contre ces formes parasitaires. Nous avons aussi démontré qu'une courte exposition au NO rendait les formes amastigotes incapables de se différencier *in vitro* en formes promastigotes touchant aussi le processus de différenciation indispensable à la survie du parasite et donc à la propagation de la maladie.

2) L'addition immédiate de 100 mM d'une source de fer (FeSO_4) ou de substrats du cycle de Krebs (3 mM d'acide α -Kétoglutarique et 3 mM de *cis*-aconitate), aux parasites traités par le NO restaurait de façon significative la croissance des formes promastigotes et amastigotes des différentes espèces étudiées. L'étude comparative de différentes activités enzymatiques et notamment celles du cycle de Krebs sur les formes parasitaires traitées par le NO nous a permis de mettre en évidence une inhibition sélective de la *cis*-aconitase. Ces résultats suggèrent donc fortement que l'inhibition de la *cis*-aconitase due à l'interaction du NO avec le groupement

prosthétique Fe-S (Fer-soufre) de cette enzyme serait un des mécanismes conduisant à la lyse des formes promastigotes et amastigotes des leishmanies.

3) Curieusement les formes amastigotes des différentes espèces de leishmanies sont moins sensibles au NO que les formes promastigotes correspondantes, de la même façon qu'ils le sont à l'antimycine (inhibiteur des complexes I et II de la chaîne de transport des électrons). Ceci est à mettre en relation avec un développement moins important des mitochondries chez les formes amastigotes par rapport aux formes promastigotes.

4) L'ensemble de ces résultats montre que l'élimination des amastigotes à l'intérieur des macrophages activés est due en partie à l'inhibition des fonctions mitochondriales, ce mécanisme serait aussi responsable de la cytotoxicité du NO vis à vis des cellules tumorales.

Leishmania spp.: Nitric Oxide-Mediated Metabolic Inhibition of Promastigote and Axenically Grown Amastigote Forms

Jean-Loup Lemesre,^{*1} Denis Sereno,* Sylvie Daulouède,† Bernard Veyret,‡ Nathalie Brajon,* and Philippe Vincendeau†

^{*}Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies à Vecteurs, Unité de Biologie Parasitaire, ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cédex 1, France; [†]Laboratoire de Parasitologie, Université de Bordeaux II, Bat 3A, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cédex, France; and [‡]Laboratoire de Physique des Interactions Ondes-Matières, UMR 5501, CNRS, BP 108, ENSCPB, 33402 Talence Cédex, France

LEMESRE, J.-L., SERENO, D., DAULOUÈDE, S., VEYRET, B., BRAJON, N., AND VINCEDEAU, P. 1997. *Leishmania* spp.: Nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically grown amastigote forms. *Experimental Parasitology* 86, 000-000. The antimicrobial effect of activated macrophages on parasites involves nitric oxide (NO). NO induces intracellular parasite killing in murine leishmaniasis. Nevertheless, the mechanisms of action of NO as a final effector molecule on intracellular forms of *Leishmania* are unknown. The recent development of axenically grown amastigote forms of different *Leishmania* species allowed direct investigation of NO activity on active and dividing populations of the mammalian stage of various *Leishmania* species, which normally are only found intracellularly. Authentic NO gas, which reproduced the antimicrobial effect elaborated by activated macrophages, was flushed on promastigote and axenically cultured amastigote forms of *L. mexicana*, *L. amazonensis*, and *L. chagasi* suspended in degassed phosphate-buffered saline (PBS). After NO treatment, the viability of parasites gradually decreased as a function of time postflushing when compared to controls. Interestingly NO killing was more effective on promastigote forms than on amastigote forms. After 12-hr postflushing incubation in PBS, cultures of NO-treated parasites, contrary to controls (N₂-treated), failed to proliferate whatever the species and the developmental stage considered. Addition of both FeSO₄ and L-cysteine to PBS immediately after NO treatment reversed the capacity of authentic NO gas to inhibit the multiplication of both parasite stages of *Leishmania*. Supplementation of PBS with α -ketoglutarate and cis-aconitate (citric acid cycle substrates) also reversed the leishmanicidal activity of NO, whereas addition of citrate was less effective. The course of the developmental life cycle *in vitro* was also inhibited by NO gas treatment. Enzymatic analysis showed that aconitase activity was dramatically reduced by NO gas, whereas glucose phosphate isomerase, aspartate transferase, and phosphoglucosmutase activities were unchanged. In accordance, promastigote and amastigote forms of *Leishmania* were shown to be killed by antimycin A, an inhibitor of mitochondrial respiration. All these data demonstrated that NO action led to lethal metabolic inhibition in both developmental parasite stages by, at least in part, triggering iron loss from enzyme(s) with iron-sulfur prosthetic groups, in particular aconitase. © 1997 Academic Press

INDEX DESCRIPTORS: promastigotes; axenically grown amastigotes; nitric oxide; metabolic inhibition; enzymes.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is a significant cause of morbidity and mortality in tropical and subtropical areas. *Leishmania* species are responsible for a wide range of human diseases, 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 nonflagellate intracellular amastigote stage within the mononuclear phagocytes of vertebrate hosts.

A great deal of interest has been focused on the nitric oxide-mediated cytostatic or cytostasis activities of activated macrophages on intra-

¹ To whom reprint requests should be addressed at Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies à Vecteurs, Unité de Biologie Parasitaire, ORSTOM, 911 Av. Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier Cédex 1, France.

cellular (*Toxoplasma gondii*, *Leishmania major*, *Plasmodia*) (Adam *et al.* 1990; Green *et al.* 1990; Liew *et al.* 1990; Nussler *et al.* 1991) and extracellular parasites (*Shistosoma mansoni*, *Trypanosoma brucei brucei*, *T.b. gambiense*) (James and Glaven 1989; Vincendeau *et al.* 1992). It has been shown that the principal host-protective mechanism is the generation of Th1 T cell subset that secretes IFN- γ upon antigen activation in murine leishmaniasis. IFN- γ activated macrophages induce the intracellular destruction of amastigote forms through the inducible NO synthase (iNOS). Several cytokines, such as TNF- α and TGF- β , are involved in the regulation of NO-mediated killing of intracellular parasites. TNF- α acted in synergy with IFN- γ for NO synthesis, whereas the parasite upregulated the production of TGF- β , which blocked IFN- γ -induced production of NO (Green *et al.* 1994).

The importance of NO *in vivo* was demonstrated by the finding that resistant CBA mice infected by *L. major* developed exacerbated disease after local administration of an inhibitor of iNOS (Liew *et al.* 1990). A recent study established that the *in vivo* production of NO is directly associated with control of *L. major* infection in a murine model, demonstrating definitively the *in vivo* role of NO in the host resistance of *Leishmania* infection (Evans *et al.* 1993). Elevated levels of urinary NO₃⁻ correlated with resistance to infection, while susceptible mice failed to produce NO₃⁻ during the infection, and *in vivo* administration of L-N^G monomethyl arginine led to the development of the disease and blocked elevated urinary NO₃⁻ excretion in resistant mice (Evans *et al.* 1993).

The molecular targets of NO in *Leishmania* species are unknown. The effect of NO has only been evaluated on the promastigote forms, mainly found in the sandfly vector. A strong reduction in viability of promastigote forms of *L. major* treated by NO gas or nitroprusside *in vitro* was shown compared to controls (Liew *et al.* 1990). However, it was not easy to pinpoint the actual events induced by NO that result in the death of the parasite, because the amastigote form is an obligated intracellular

stage within macrophages, and must be studied inside its host cell. The recent development of axenically grown amastigote forms of different *Leishmania* species (for review see Bates 1993; Lemesre Patent PCT/FR 94/00577) opened new opportunities for the determination of NO activity directly on active and dividing populations of the mammalian stage of various *Leishmania* species, which normally are only found within the phagolysosomes of mononuclear phagocytes of vertebrate hosts. Recently, we have developed a general culture system for the long-term axenic cultivation of amastigote forms of various *Leishmania* species. Axenically grown amastigote forms were derived from metacyclic promastigote forms. Their long-term propagation required high temperature, acidic pH, and adequate culture medium. Further experiments demonstrated that axenically cultured amastigote forms were closely similar to their intracellular counterparts with respect to morphological (ultrastructure), biochemical (proteinase patterns), and biological (infectivity *in vitro* and *in vivo*) properties. Biochemical and antigenical differences with their respective cultured promastigote forms were also revealed (Lemesre Patent PCT/FR 94/00577; Sereno and Lemesre, *in press*).

In the present study, we report the effects of authentic NO gas, which mimics macrophage-mediated cytotoxicity, on the *in vitro* viability and proliferation of axenically cultured amastigote and promastigote forms of *L. mexicana*, *L. amazonensis*, and *L. chagasi*. We also demonstrate that NO gas inhibits the conversion of amastigote into promastigote forms *in vitro*. The leishmanicidal effect of NO was reversed by addition of excess iron and L-cysteine or of α -ketoglutarate and *cis*-aconitate. Last, we show that NO induces a selective metabolic inhibition of aconitase which possess an iron-sulfur prosthetic group in both developmental parasite stages.

MATERIALS AND METHODS

Parasites and in vitro cultures. We have successfully established axenic cultures of amastigote forms of various *Leishmania* species (Lemesre Patent PCT/FR 94/00577). A

general procedure was used in the current study to generate large quantities of each of the parasite stages. Axenically grown amastigote forms of *Leishmania mexicana* (MNYC/BZ/62/M-379), *L. amazonensis* (MHOM/BR/76/LTB-012), and *L. chagasi* (MHOM/BR/79/LI-01) were maintained at $32 \pm 1^\circ\text{C}$ by weekly subpassages in cell-free medium called MAA/20 (medium for axenically grown amastigote forms). From a starting inoculum of 5×10^5 amastigote forms/ml, cell densities in the range of 2×10^7 to 7×10^7 per milliliter were 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, France), 0.01 mM bathocuproine disulfonic acid, 3 mM L-cysteine, 15 mM D-glucose, 5 mM L-glutamine, 4 mM NaHCO_3 , 0.023 mM bovine hemin (omitted when required), 25 mM Hepes to a final pH of 6.5, and 20% pretested fetal calf serum (FCS). The population of axenically grown amastigote forms appeared homogeneous, round to ovoid, aflagellate, and immotile when examined under a phase-contrast light microscope. Extracellular amastigote forms have morphological, biochemical, and biological characteristics similar to those of *in vivo*-isolated amastigote forms.

Promastigote cultures were derived from axenically cultured amastigote stages and were maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ by weekly subpassages in RPMI 1640 medium (Gibco BRL), buffered with 25 mM Hepes and 2 mM NaHCO_3 , pH 7.2, supplemented with 10% heat-inactivated FCS. Initial parasite concentrations were 5×10^5 flagellates per milliliter of medium.

All the parasites were harvested from late-log-phase cultures and were washed three times by centrifugation at 2500g and 4°C for 15 min in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2.

Treatment of *Leishmania* parasites with antimycin A. Promastigote and amastigote cultures were initiated with an initial cell density of 10^6 parasites per milliliter of culture medium in the presence of increasing concentrations of antimycin A (0.1, 1, and 10 $\mu\text{g/ml}$) which inhibits the cytochrome electron transport chain at complex II.

Treatment of *Leishmania* parasites with authentic NO gas. Washed promastigote or axenically grown amastigote forms from late-log phase of growth were suspended in 3 ml of degassed PBS, pH 7.2 (5×10^6 parasites/ml) in culture tubes and were flushed for 15 min with O_2 -free N_2 gas (Aga, Paris, France) for N_2 -treated parasites or with 1% NO-99% N_2 gas (Aga) for NO-treated parasites according to a method described by Hibbs *et al.* (1988). Time-dependent effect of NO was studied in degassed PBS using a modified method previously described for the promastigote stage of *L. major* by Liew *et al.* (1990). In some experiments, 100 μM FeSO_4 + 1 mM L-cysteine (James and Glaven 1989) or 3 mM α -ketoglutarate (Sigma) + 3 mM *cis*-aconitate (Sigma) or 3 mM citrate (Sigma), respectively, were added immediately after gas treatment to suspensions of NO-treated and N_2 -treated parasites.

Immediately and after postflushing incubations of 4, 12, and 24 hr at room temperature in degassed PBS under an-

aerobic conditions, the morphological aspect and motility were observed with a light microscope. Erythrosin-B staining was also used to differentiate between alive and dead cells. Twenty microliters of cell suspensions and 20 μl of 0.4% Erythrosin-B staining solution were previously pre-cooled to 4°C and then mixed. After 5 min of incubation in ice, the percentage of viability (stained parasites were considered nonviable) was determined. Simultaneously, 2×10^6 N_2 -treated or NO-treated parasites (promastigote or axenically grown amastigote forms) were inoculated in 2 ml of the adapted culture medium at the appropriate temperature. Cell concentrations were determined by daily counting of parasites with a hemacytometer at 400 $\times$ magnification after adequate dilution in PBS containing 0.1% glutaraldehyde. The transformation of extracellular amastigote forms into promastigote forms was estimated microscopically after methanol fixation and Giemsa staining.

In some experiments, parasites were incubated in PBS containing 1 mM NO_2^- (sodium nitrite), which is a stable metabolite of NO.

Citric acid cycle enzyme activities. *Cis*-aconitase, glucose phosphate isomerase, aspartate aminotransferase, and phosphoglucomutase activities were determined according to protocols yet described for isoenzyme analysis (Ben Abderrazak *et al.* 1993). Briefly, about 10^7 N_2 -treated or NO-treated parasites (promastigote or extracellular amastigote forms) were pelleted and washed three times in PBS by centrifugation. The organisms were then suspended in an equal volume of enzyme stabilizer solution (2 mM dithiothreitol, 2 mM amino-*n*-caproic, and 2 mM EDTA, pH 6) and were kept on ice for 20 min. Lysed cells were pelleted by centrifugation. The water-soluble enzymes (supernatant) were separated by cellulose acetate electrophoresis (Helena System, Beaumont, France). Staining procedures were carried out with solutions containing the specific substrate of each enzyme (Ben Abderrazak *et al.* 1993).

RESULTS

Effect of antimycin A on *Leishmania* growth. As shown in Fig. 1, a dose-dependent inhibition of parasite growth was observed when antimycin A, an inhibitor of mitochondrial respiration, was added within the first 96 hr of culture of promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis* and *L. chagasi*. Amastigote forms appeared to be less sensitive to antimycin A than the corresponding promastigote forms. A concentration of 1 μg of antimycin A/ml strongly inhibited promastigote growth of both *Leishmania* species (about 75 and 95%, respectively), whereas inhibitions of 40 and 55% were respectively obtained on axenically cultured amastigote forms of *L. amazonensis* and *L. chagasi*.

(F1)

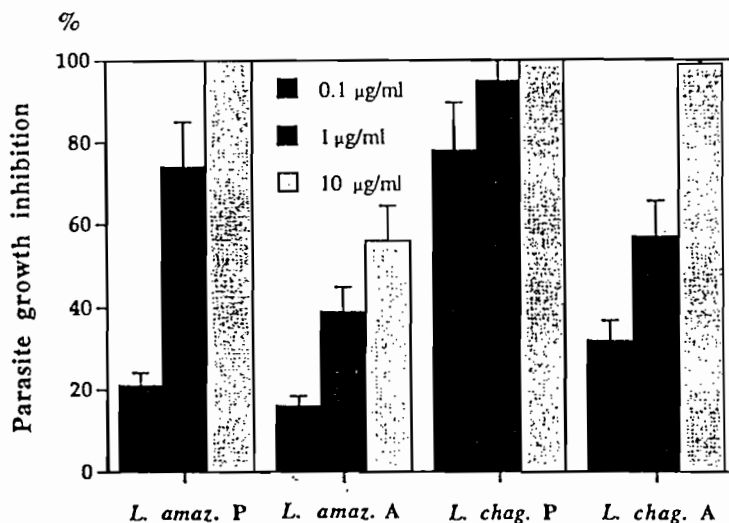


FIG. 1. Growth of promastigote (P) and axenically cultured amastigote (A) forms of *L. amazonensis* (*L. amaz.*) and *L. chagasi* (*L. chag.*) in the presence of increasing concentrations of antimycin A, for the entire 96-hr culture period. For each parasite, 100% corresponds to the number of parasites obtained in cultures without antimycin A. Each result is the mean $\pm$ standard deviation from three experiments.

Effect of NO on parasite viability. The anti-leishmanial effect of NO gas, previously described on the promastigote stage of *L. major* (Liew *et al.* 1990), was extended to promastigote forms of three other species representative of New World leishmaniasis. NO activity was also directly evaluated on the corresponding amastigote forms. NO-N₂ or pure N₂ gas was respectively flushed for 15 min into suspensions of promastigote (Fig. 2A) and of axenically grown amastigote (Fig. 2B) forms of *L. mexicana*, *L. amazonensis*, and *L. chagasi*. Parasites were then incubated in degassed PBS for various lengths of time as indicated under Materials and Methods before being analyzed for viability.

In the system we used, bubbling 1% NO-99% N₂ gas into PBS extends the lifetime of NO considerably since the reaction of NO with O₂ is second order (Ford *et al.* 1993). The calculated steady-state concentration of NO was around 10 µM. Microscopic examination revealed no striking morphological changes in either parasite developmental stage in the first 12 hr of incubation in PBS after bubbling. However, a loss of motility of NO-treated promasti-

gotes compared with N₂ and untreated controls was observed for all species studied.

Survival of N₂-treated and untreated parasites was closely similar whatever the stage and the species studied (data not shown). As shown in Fig. 2, the viability of NO-treated parasites compared to that of their respective controls gradually decreased as a function of postflushing time incubation in PBS. Immediately and after a postflushing of 4 hr in PBS, about 99 and 96% of control parasites remained healthy and viable, respectively. After a period of 4 hr exposure to NO, a significant leishmanicidal effect was observed on promastigote forms of *L. amazonensis*, *L. mexicana*, and *L. chagasi* (around 48, 31, and 28% of control viability, respectively), which was less pronounced on corresponding amastigote forms (around 76, 55, and 49%, respectively). NO killing was more pronounced after a period of 12 hr of incubation in PBS, while control suspensions of promastigote and amastigote forms revealed about 67 and 81% of viability, respectively. Promastigote forms treated with NO showed about a 9 (*L. amazonensis*) and a 20 (*L. mexicana* and *L. chagasi*)-fold reduction in viability compared to N₂

F2

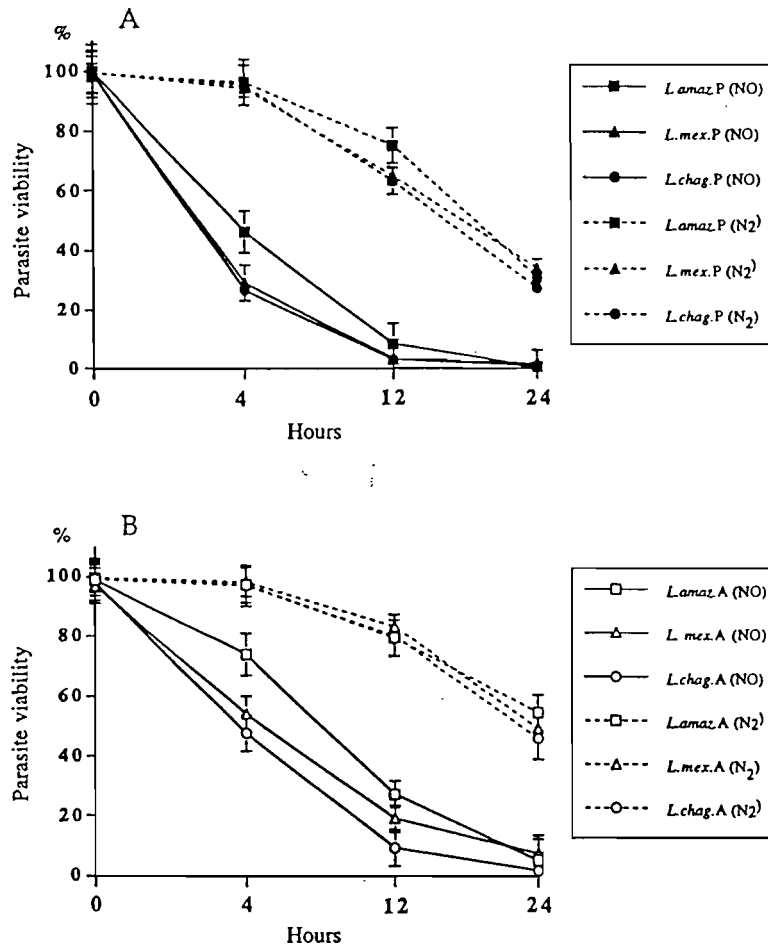


FIG. 2. Effect of NO gas on the viability of promastigote (A) and extracellular amastigote (B) forms of *L. amazonensis* (*L. amaz.*), *L. mexicana* (*L. mex.*), and *L. chagasi* (*L. chag.*) immediately (0 hr) and after respective postflushing incubations of 4, 12, and 24 hr in degassed PBS. Results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation of percentages of viability from two to three experiments.

or PBS controls. NO-treated amastigote forms of *L. mexicana*, *L. amazonensis*, and *L. chagasi* revealed a 3-, 5-, and 10-fold reduction in viability, respectively. By 24 hr of incubation, both untreated and treated parasites were affected, but a significant reduction was observed not only in viability but also in the number of NO-treated promastigotes and NO-treated amastigotes, compared to their respective controls. Interestingly, the detrimental effect by NO with time was more pronounced on promastigotes than on amastigotes (Fig. 2).

Alternatively, the effects of 1 mM sodium

nitrite on parasite survival were also determined. NO-cytotoxic activity was not due to its oxidation product NO_2^- as it did not affect the viability and the growth of both promastigote and amastigote forms of the three *Leishmania* species (data not shown) as previously shown on promastigote forms of *L. major* (Liew *et al.* 1990).

Effect of NO on Leishmania growth and differentiation. Immediately and after postflushing incubations of 4 and 12 hr, parasites were cultured under standard culture conditions required for each stage. Proliferation of N₂-treated and

untreated parasites was very similar (data not shown). Addition of complete medium immediately and after 4-hr incubation in PBS did not significantly affect the growth of either promastigote (Fig. 3A) or amastigote forms (Fig. 3B) of *L. mexicana*, *L. amazonensis*, and *L. chagasi*, as shown by the parasite concentrations determined for the entire 96-hr culture period. By contrast, after a 12-hr incubation period, a significant inhibitory effect of NO was observed on the proliferation of parasites (Fig. 3). Except for amastigote forms of *L. amazonensis*, NO-treated parasites, unlike N₂-treated ones, failed to proliferate.

After 4 hr of incubation, NO-treated amastigote forms of all species studied were able to proliferate under amastigote culture conditions (Fig. 3). However, under promastigote culture conditions, even if they remained healthy and viable for at least 48 hr, amastigote forms flushed with NO gas were unable to transform into promastigotes, unlike N₂-treated amastigotes (Fig. 4).

Effects of iron and citric acid cycle substrates on NO leishmanicidal activity. Since NO causes a selective iron removal from target cells, the role of iron enrichment was investigated according to James and Glaven (1989). When 100 μ M FeSO₄ + 3 mM L-cysteine was added immediately after NO flushing to promastigote and amastigote suspensions, the leishmanicidal effect of NO previously observed after a post-flushing incubation of 12 hr was respectively reversed by about 58 and 75% for promastigote and amastigote forms of *L. mexicana*, 70 and 81% for *L. amazonensis*, and 84 and 98% for *L. chagasi* as shown by the number of parasites counted at the end of 96 hr of culture (Fig. 5A).

The role of citric acid cycle substrates on NO leishmanicidal effect was also studied. Addition of 3 mM α -ketoglutarate + 3 mM *cis*-aconitate in PBS immediately after NO flushing significantly reversed the NO inhibitory effect on the proliferation of promastigote and axenically cultured amastigote forms of the three *Leishmania* species (Fig. 5B). This effect was less pronounced when 3 mM citrate was added

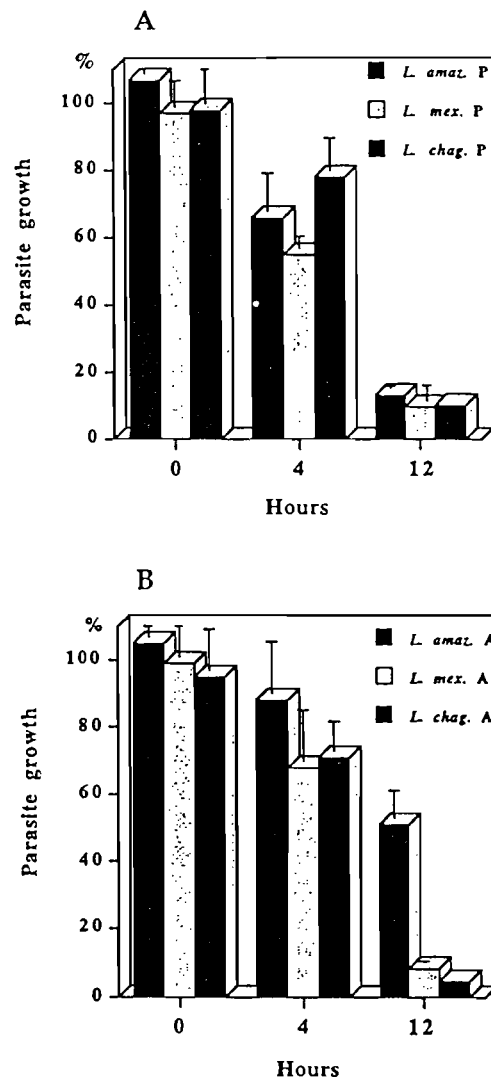


FIG. 3. Effect of NO gas on the growth under standard culture conditions of promastigote (A) and axenically cultured amastigote (B) forms of *L. amazonensis* (*L. amaz.*), *L. mexicana* (*L. mex.*), and *L. chagasi* (*L. chag.*) immediately (0 hr) and after respective postflushing incubations of 4 and 12 hr in degassed PBS, for the entire 96-hr culture period. For each parasite stage, 100% corresponds to the number of parasites obtained in the respective N₂-treated controls. Each result is the mean $\pm$ standard deviation from two experiments.

(from 30 to 50% of growth restoration depending on the species) (data not shown).

Inhibition of aconitase by NO. Immediately after flushing gas, parasites were frozen until

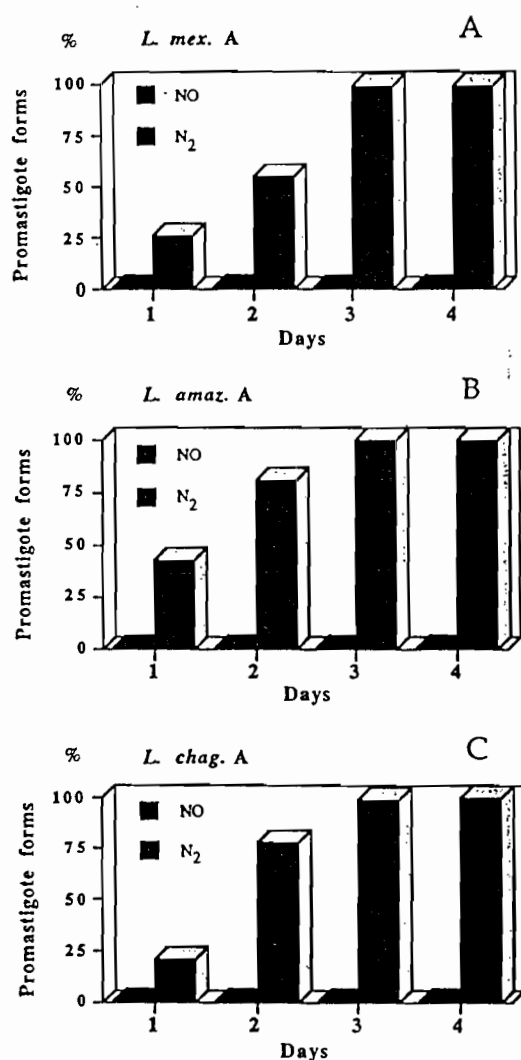


FIG. 4. *In vitro* differentiation of N₂- and NO-treated amastigote forms of *L. mexicana* (*L. mex.*) (A), *L. amazonensis* (*L. amaz.*) (B), and *L. chagasi* (*L. chag.*) (C) into promastigote forms. Results are given as means of three independent experiments. The standard deviations ranged between 5 and 10%.

enzymatic analysis. Glucose phosphate isomerase, aspartate transferase, and phosphoglucosomutase activities were not modified by NO treatment (data not shown). By contrast, *cis*-aconitase activity of NO-treated promastigote and amastigote forms of *L. mexicana* and *L. amazonensis* was completely inhibited compared to N₂-treated parasites (Fig. 6). For the

two species studied, *cis*-aconitase activity of N₂-treated parasites was greater for promastigotes than for amastigotes.

DISCUSSION

Recently, we have successfully established axenic cultures of amastigote forms of various *Leishmania* species (Lemesre Patent PCT/FR 94/00577). Thus, the effects of NO have been studied directly on a form of the parasite which normally is only found intracellularly. This report provided direct evidence that nitric oxide, an effector molecule synthesized by activated macrophages, exerted static and lytic effects on both parasitic developmental stages of three different species of *Leishmania*. A major finding in this report was that authentic NO gas not only affected the viability but also inhibited the proliferation *in vitro* of active and dividing populations of extracellular amastigote forms of different *Leishmania* species. This effect was ablated on both parasite stages of *Leishmania* by the immediate addition of excess iron or citric acid cycle substrates, α -ketoglutarate, and *cis*-aconitate. Furthermore, NO gas treatment markedly inhibited *cis*-aconitase. We also showed that NO gas inhibited the course of the developmental life cycle *in vitro*, since viable amastigotes were unable to differentiate into promastigotes under promastigote culture conditions.

These data strongly suggested that the mammalian stage of *Leishmania* is not well adapted to survive NO action. However, it was interesting to note that, whatever the species studied, amastigote forms were less sensitive than promastigote forms to NO-induced early lysis. Under our experimental conditions, where degassing the PBS favored NO stability, we showed that an exposure time of 4 hr was sufficient to induce a significant killing of promastigote forms, whereas killing of amastigote forms required a longer exposure time. This relative resistance of axenically grown amastigote forms to NO remained controversial and suggested that *in vivo* a prolonged contact with NO is necessary for amastigote form killing inside macrophages. Intracellular tissue forms of

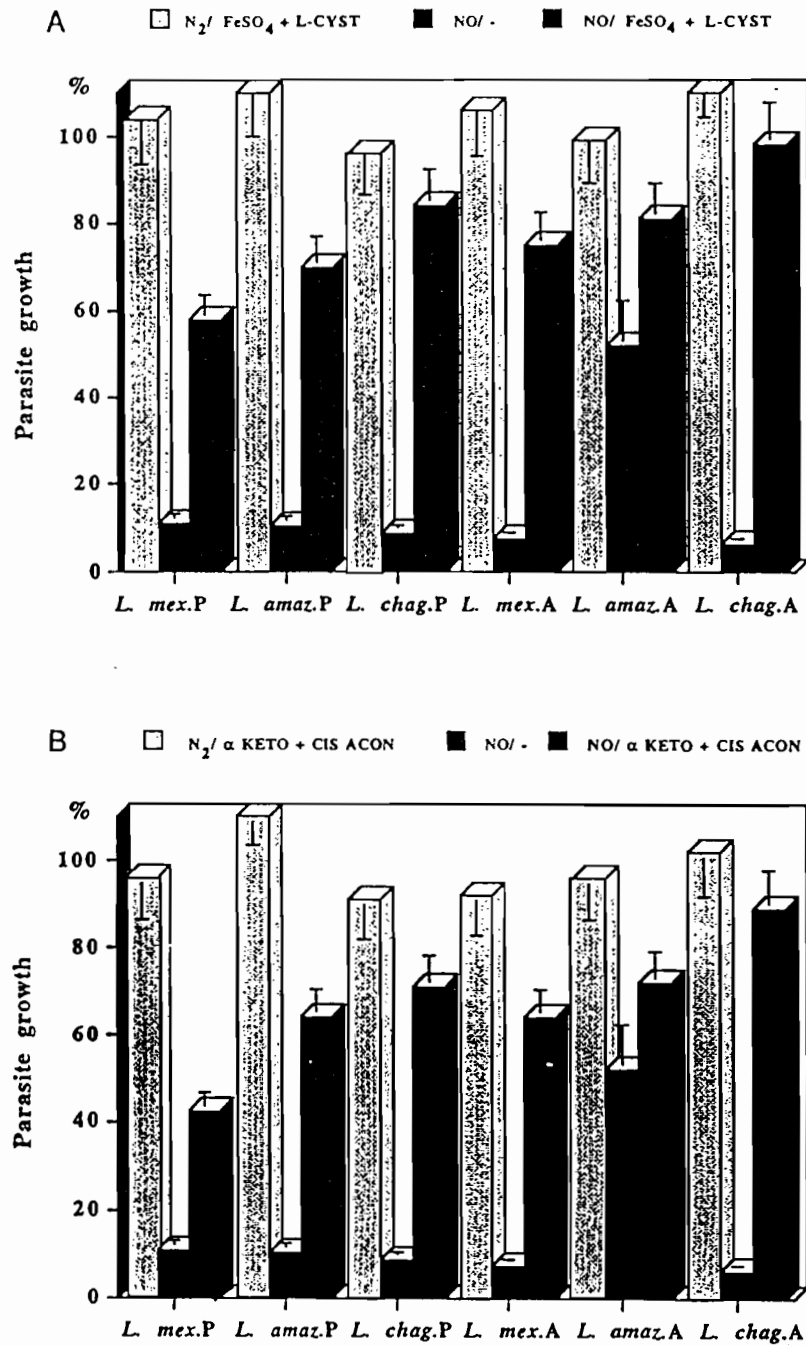


FIG. 5. *In vitro* growth of promastigote (P) and axenically cultured amastigote (A) forms of *L. mexicana* (*L. mex.*), *Leishmania amazonensis* (*L. amaz.*), and *L. chagasi* (*L. chag.*) for the entire 96-hr culture period, flushed with N_2 or NO gas for 15 min and immediately supplemented with or without iron (A) or with or without citric acid cycle substrates (B). For each parasite, 100% corresponds to the number of parasite obtained in the respective N_2 -treated controls. Each result is the mean $\pm$ standard deviation from two experiments.

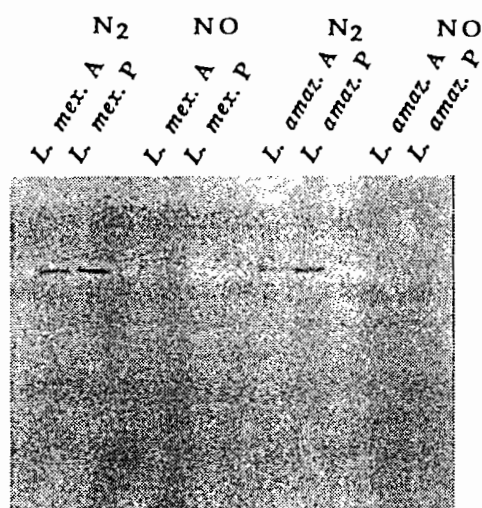


FIG. 6. *Cis*-aconitase activity of N_2 - or NO-treated promastigote (P) and axenically grown amastigote (A) forms of *L. amazonensis* (*L. amaz.*) and *L. mexicana* (*L. mex.*) by cellulose acetate gel analysis.

Leishmania, which replicate exclusively in phagolysosomes of macrophages, are under strong evolutionary pressure and may have developed compensatory mechanisms that subvert antimicrobial effector activities. We also demonstrated that a short exposure time (4 hr) with NO prevented the conversion of viable amastigote forms into promastigote forms *in vitro*. This result was consistent with the finding that the differentiation of amastigotes into promastigotes is essential to the parasite survival and instrumental to the propagation of the disease. It also suggested a mechanism through which NO acted to restrict parasite differentiation which appears to be different from the cytotoxic effect on amastigote forms. Amastigote forms of *L. amazonensis* were particularly more resistant to NO killing than those of other *Leishmania* species. This difference is consistent with the finding that *L. amazonensis* is responsible for the diffuse cutaneous leishmaniasis.

The concentration of NO required to kill the promastigote and extracellular amastigote forms of *Leishmania in vitro* was comparable to that required for tumor cell killing (Hibb *et al.* 1988). In the bubbling experiment (1% NO–99% N_2 gas), the steady-state NO concentration

(around 10 μM) was of the same order as that generated in the immediate vicinity of adherent cells (around 4–5 μM) expressing inducible NO synthase which was predicted from kinetic modeling studies (Laurent *et al.* 1996). This system was used for investigation of anti-tumoral properties of activated macrophages. Killing of tumor cells by a macrophage NO-dependent mechanism induced DNA fragmentation, whereas killing of tumor cells by a macrophage NO-independent mechanism did not result in the appearance of DNA fragmentation (Cui *et al.* 1994). The prolonged half-life of NO in degassed PBS, opposite to the short half-life of NO under conventional *in vitro* and *in vivo* conditions, led us to use NO gas exposure as an approach to investigate the macrophage NO-dependent mechanism of *Leishmania* killing. It has been shown that activated macrophages exhibit anti-tumor cell effects by causing selective metabolic inhibition of the iron-containing enzymes NADH-ubiquinone oxidoreductase and succinate-ubiquinone oxidoreductase of the complexes I and II in the mitochondrial electron transport chain (Granger *et al.* 1980; Granger and Lehninger 1982), aconitase of the citric acid cycle (Drapier and Hibbs 1986; Hibbs *et al.* 1987, 1988), and ribonucleotide reductase involved in DNA replication (Hibbs *et al.* 1987; Lepoivre *et al.* 1992). These enzymes have been identified as potential targets for the action of reactive nitrogen intermediates (NO and stable oxidative NO end-products), as they all contained catalytically active Fe–S prosthetic groups. Inactivation of these enzymes by NO correlated with the formation of nitrosyl-Fe complexes (Drapier *et al.* 1991).

In *Leishmania*, the precise nature of the metabolic changes in the parasites induced by inorganic nitrogen oxides that lead to amastigote death have not yet been identified, although there were a number of postulated targets. Data reported here demonstrated that NO gas, which mimics macrophage-mediated tumor cytotoxicity (Hibbs *et al.* 1988), might disrupt Fe-dependent enzymatic pathways vital for the survival of amastigote forms within macrophages. Addition of complete medium immediately and

after 4 hr of incubation completely or partially reverses the NO effect, respectively. This protection may occur either by a new synthesis of enzymes favored by the presence of essential elements or by transfer of NO from parasite targets to medium components such as proteins. By contrast, after 12-hr incubation, no proliferation was observed, suggesting a metabolic injury that could not be reversed by addition of NO acceptor. Addition of both FeSO₄ and L-cysteine to PBS immediately after NO flushing reversed the capacity of authentic NO gas to inhibit the multiplication of both promastigote and amastigote forms of *Leishmania*. This combination has been shown to maximally reconstitute aconitase activity in tumor cell targets (Drapier and Hibbs 1988). We demonstrated that parasite suspensions supplemented with citric acid cycle substrates such as α -ketoglutarate and *cis*-aconitate after NO flushing also reversed the leishmanicidal activity of NO. Enzymatic analysis showed that activity of *cis*-aconitase, an enzyme containing catalytically active Fe-S prosthetic groups, was dramatically reduced by NO gas, whereas glucose phosphate isomerase, aspartate transferase, and phosphoglucosmutase activities were unchanged.

Collectively all these data demonstrate that *Leishmania* killing is caused, at least in part, by a mechanism proposed for tumor cytotoxicity, whereby production of NO triggers iron loss from critical target cell enzymes leading to lethal metabolic inhibition. In accordance, promastigote as well as amastigote forms of *Leishmania* exposed to NO are likely killed by inhibition of mitochondrial respiration. This result suggests that macrophage effector mechanism inhibiting mitochondrial respiration could contribute to *Leishmania* killing. Interestingly, extracellular amastigote forms appeared to be less sensitive than corresponding promastigote forms to the antimycin A activity, as was also found for NO action. This difference was consistent with the relatively weak development of the mitochondria in amastigote forms compared to promastigote ones (Mukkada *et al.* 1985).

The role of NO in *Leishmania* killing by human monocytes was recently demonstrated

(Vouldoukis *et al.* 1995). A better understanding of the biochemical pathway, regulation, and biological function of L-arginine-derived inorganic nitrogen oxides by activated macrophages may facilitate design of drugs that enhance protective host immunity against infectious agents and of strategies to selective upregulate NO in infected cells. The detection of biochemical differences between host and parasite cells and identification of parasite molecular targets could provide information for new therapeutic approaches.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the INSERM (Contrat de Recherche Externe 920613) and from the ORSTOM institute. We thank Jean-Luc Chevrolier for revising the language in the manuscript.

REFERENCES

- Adams, L. B., Hibbs, J. B., Taintor, R. R., and Krahenbuhl, J. 1990. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*: Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *Journal of Immunology* 144, 2725-2729.
- Bates, P. A. 1993. Axenic culture of *Leishmania* amastigotes. *Parasitology Today* 9, 143-146.
- Ben Abderrazak, S., Guerrini, F., Matthieu-Daude, F., Truc, P., Neubauer, K., Lewicka, K., Barnabe, C., and Tibayrenc, M. 1993. Isoenzyme electrophoresis for parasite characterization. *Methods in Molecular Biology* 21, 361-382.
- Cui, S., Reichner, J. S., Mateo, R. B., and Albina, J. E. 1994. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. *Cancer Research* 54, 2462-2467.
- Drapier, J. C., and Hibbs, J. B. 1986. Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cells. *Journal of Clinical Investigation* 78, 790-797.
- Drapier, J. C., Pellat, C., and Henry, Y. 1991. Generation of EPR-detectable nitrosyl-iron complexes in tumor target cells cocultured with activated macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 266, 10162-10167.
- Evans, T. G., Thai, L., Granger, D. L., and Hibbs, J. B. 1993. Effect of *in vivo* inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *Journal of Immunology* 151, 907-915.
- Ford, P. C., Wink, D. A., and Stanbury, D. M. 1993. Autooxidation kinetics of aqueous nitric oxide. *FEBS Letters* 326, 1-3.
- Granger, D. L., Taintor, R., Cook, J., and Hibbs, J. B. 1980. Injury of neoplastic cells by murine macrophages leads to inhibition of mitochondrial respiration. *Journal of Clinical Investigation* 65, 357-370.

- Granger, D. L., and Lehninger, L. 1982. Site of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. *Journal of Cellular Biology* 95, 527–535.
- Green, S. J., Meltzer, M. S., Hibbs, J. B., and Nacy, C. A. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of Immunology* 144, 278–283.
- Green, S. J., Scheller, L. F., Marletta, M. A., Segun, M. C., Klotz, F. W., Slayter, M., Nelson, B. J., and Nacy, C. 1994. Nitric oxide: Cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunology Letters* 43, 87–94.
- Hibbs, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, Z., and Rachlin, E. M. 1988. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical Biophysical Research Communications* 157, 87–94.
- Hibbs, J. B., Vavrin, Z., and Taintor, R. R. 1987. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition of target cells. *Journal of Immunology* 138, 550–565.
- James, S. L., and Glaven, J. 1989. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *Journal of Immunology* 143, 4208–4212.
- Laurent, M., Lepoivre, M., and Tenu, J. P. 1996. Kinetic modelling of the nitric oxide gradient generated *in vitro* by adherent cells expressing inducible nitric oxide synthase. *Biochemical Journal* 314, 109–113.
- Lepoivre, M., Flaman, J. M., Bobe, P., Lemaire, G., and Henry, Y. 1992. Quenching of the tyrosyl radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide: Relationship to cytostasis induced in tumor cells by cytotoxic macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 269, 21891–21897.
- Liew, F. Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R. M. J., and Moncada, S. 1990. Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Journal of Immunology* 144, 4794–4797.
- Mukkada, A. J., Meade, J. C., Glaser, T. A., and Bonventre, P. F. 1985. Enhanced metabolism of *Leishmania donovani* amastigotes at acid pH: An adaptation for intracellular growth. *Science* 229, 1099–1101.
- Nussler, A., Drapier, J. C., Renia, L., Pied, S., Miltgen, F., Gentilini, M., and Mazier, D. 1991. L-Arginine-dependent destruction of intrahepatic malaria parasites in response to tumor necrosis factor and/or interleukin 6 stimulation. *European Journal of Immunology* 21, 227–232.
- Sereno, D., and Lemesre, J. L. Use of an enzymatic micro-method to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* *in vitro*. *Parasitology Research*, in press.
- Vincendeau, P., Daulouede, S., Veyret, B., Darde, M. L., Bouteille, B., and Lemesre, J. L. 1992. Nitric oxide-mediated cytostatic activity of *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Experimental Parasitology* 75, 353–360.
- Vouldoukis, I., Riveros-Moreno, V., Dugas, B., Ouaz, F., Becherel, P., Debre, P., Moncada, S., and Mossalayi, M. D. 1995. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the FCεRII/CD23 surface antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92, 7804–7808.

Received 1 August 1996; accepted with revision 30 December 1996

Mise en place d'une microméthode enzymatique permettant de déterminer la viabilité et la prolifération des formes amastigotes de cultures axéniques de *Leishmania amazonensis*. (Accepté pour publication, *Parasitology Research*).

Les techniques couramment utilisées pour évaluer l'activité leishmanicide de nouveaux composés consistent actuellement en l'utilisation (i) des cultures de formes promastigotes, seul modèle expérimental de culture *in vitro* disponible en routine (simples à mettre en oeuvre) (ii) de modèles *in vitro* d'interaction parasite-macrophage (fastidieux et peu reproductibles) (iii) de modèles d'infection expérimentale (lourds à mettre en oeuvre). La mise au point d'un test de viabilité utilisant les formes amastigotes de culture axénique de leishmanies, seul stade parasitaire réellement en contact avec la drogue, rendait possible l'évaluation plus réaliste des profils de chimiosensibilité et/ou de chimiorésistance des différentes espèces de leishmanies. Ce travail avait pour objectif principal la mise au point d'une technique simple, reproductible et peu coûteuse nous permettant de quantifier la viabilité et la prolifération du stade amastigote et donc de pouvoir réaliser un criblage rapide de nouvelles molécules à activité leishmanicide.

Principaux résultats

- 1) Les amastigotes de culture axénique sont capables de se multiplier dans des plaques de 96 puits, sans qu'aucun phénomène de différenciation en formes promastigotes n'ait été observé. Dans ces conditions le profil des cinétiques de croissance sont comparables à celles classiquement observées.
- 2) Lorsque les parasites sontensemencés à 2.10^5 parasites/puits et bien que les activités déhydrogénases des amastigotes axéniques soient significativement plus faibles que celles des formes promastigotes correspondantes, le test utilisant le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-tétrazolium bromide (MTT) reflète réellement la viabilité et les différentes étapes de la prolifération des formes amastigotes durant les 72 premières heures.
- 3) La toxicité de solvants (DMSO et éthanol) utilisés couramment en pharmacologie a pu être déterminée sur les formes amastigotes de *L. amazonensis*. D'autre part une première détermination de la toxicité de la pentamidine a été réalisée. La pentamidine présente une forte activité leishmanicide à des concentrations supérieures à $5 \mu\text{M}$.

4) Il est donc possible d'évaluer la prolifération, la viabilité ainsi que la chimiosensibilité des formes amastigotes de culture axénique de *L. amazonensis* à l'aide du test MTT. Un modèle de criblage précoce d'activité leishmanicide pouvait alors être envisagé.



ORIGINAL PAPER

Denis Sereno · Jean-Loup Lemesre

Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stages of *Leishmania amazonensis* in vitro

Received: 11 June 1996 / Accepted: 30 July 1996

Leishmaniasis is a significant cause of morbidity and mortality in tropical and subtropical areas. These protozoan parasites exist as a flagellate extracellular promastigote form in their sandfly vectors. In the mammalian hosts, only the nonflagellate amastigote form persists, surviving and dividing in the phagolysosome of macrophages. *Leishmania* promastigotes have often been quantified in vitro by an enzymatic method that involves the conversion of a tetrazolium salt, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), into a colored, insoluble formazan product, the amount of which depends on the number of viable parasites present (Mossman 1983; Cole 1986; Rabinovitch et al. 1986; Berg et al. 1994). The use of amastigote forms has been hampered by difficulties in obtaining sufficient amounts of the purified mammalian stage. Toward that end, we and other investigators have recently developed culture systems for the in vitro growth of large amounts of extracellular amastigote forms that are free of host-cell contamination (Bates 1993; Lemesre, patent PCT/FR 94/00577). In the present paper we report the use of an MTT-based microassay to quantify the proliferation and the viability of axenically grown amastigote forms of *L. amazonensis*. The efficiency of the method was compared with that of another conventional method, cell counting.

A general procedure was used in the current study to generate large quantities of each of the parasite stages. Active and dividing populations of axenically grown amastigote forms of *L. amazonensis* (MHOM/BR/76/LTB-012) were maintained at $32 \pm 1^\circ\text{C}$ by weekly subpassage in a cell-free medium called MAA (medium for axenically grown amastigotes) in 25-cm² flasks

(Lemesre et al. 1994; Lemesre, patent PCT/FR 94/00577). From a starting inoculum of 5×10^5 amastigote forms/ml a cell density of about 5×10^7 parasites/ml was obtained on day 7. Promastigote cultures were maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in RPMI 1640 medium (Gibco BRL) buffered with 25 mM HEPES and 2 mM NaHCO₃ (pH 7.2) and supplemented with 20% heat-inactivated fetal calf serum (FCS). Initial parasite concentrations were 5×10^5 flagellates/ml of medium. For verification of the correlation between the MTT-based assay and the number of parasites, increasing concentrations of late-log-phase parasites, ranging from 2.5 to 40×10^5 cells/well, were distributed in triplicate in 100 µl of media in 96-well flat-bottom microtrays. Plates were then incubated with 10 µl of MTT (10 mg/ml) for 4 h at 27°C or $32 \pm 1^\circ\text{C}$, depending upon the parasite stage. The enzyme-substrate reaction was stopped by the addition of 100 µl of a solution of 50% isopropanol and 10% sodium dodecyl sulfate (SDS; pH 5.4). Microplates were further incubated for 30 min at room temperature. The optical density (OD) was determined at 570 nm with a Titer-tech 96-well scanner. To evaluate the possibility of using the MTT-based assay to achieve growth kinetics curves as is possible with cell-counting experiments, microorganisms were seeded at two inocula (1 and 2×10^5 parasites/well) and the dehydrogenase activities were measured daily as described above. Cell concentrations were determined by daily counting of parasites in a Thoma chamber at 400x magnification after adequate dilution in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). Morphological aspects of parasites were determined daily by microscope examination to detect the possible occurrence of differentiation phenomena in 96-well plates.

As shown in Fig. 1, for densities higher than or equal to 2.5×10^5 parasites/well a linear correlation between the OD signal and the parasite number was revealed when both amastigote and promastigote forms were used. Amastigote forms of *L. amazonensis* showed lower levels of dehydrogenase activities than did their corresponding promastigote forms. This difference was con-

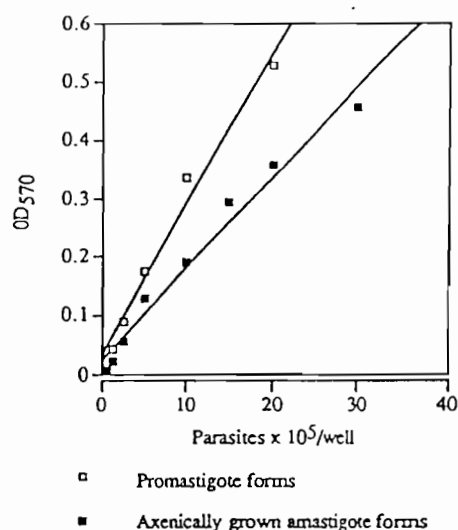


Fig. 1 Relationship between the number of amastigote and promastigote forms of *Leishmania amazonensis* and the dehydrogenase activities, respectively. Results are given as mean values for three experiments; The SDs ranged between 2% and 8%

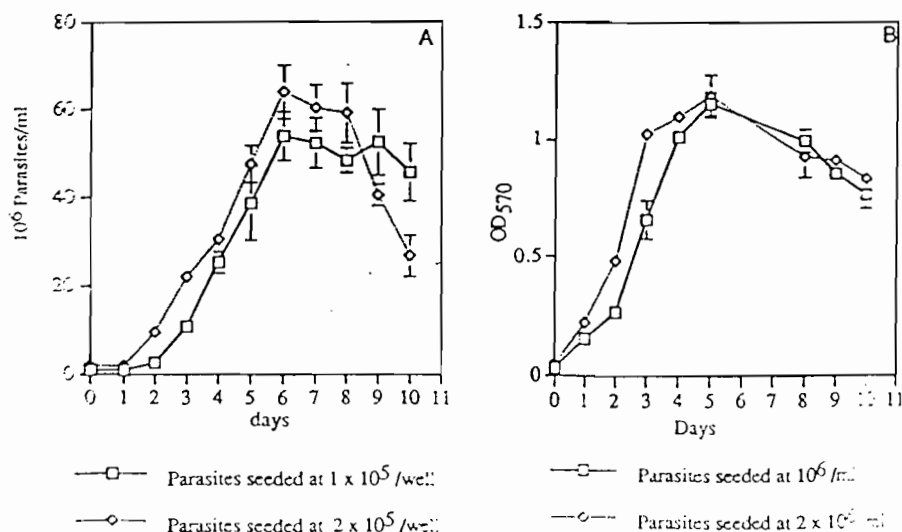
sistent with the relatively poor development of the mitochondria in amastigote forms as compared with promastigotes (Marr 1980; Mukkada et al. 1985). The relationship between increasing concentrations of amastigote forms and dehydrogenase activities showed that an MTT-based assay can be applied to this parasite stage. When amastigote forms were cultured in 96-microwell plates, typical parasite-growth curves were obtained, showing an initial latent phase of growth followed by logarithmic and stationary phases and cell death, leading to a decrease in density (Fig. 2A). Cell yields at the culture confluence were about $5-6 \times 10^6$ parasites/well, depending on the initial inoculum, as has previously been shown for promastigote forms of different leishmanial species (Lemesre et al. 1988). The time at which the latent phase finished and the point at which the logarithmic phase merged into the stationary phase

were also dependent on the original density. Under our experimental conditions, analysis of the morphological parameters did not show the occurrence of differentiation phenomena of amastigote into promastigote forms during parasite growth.

A comparison of the results given in Figs. 2A and 2B clearly demonstrated that whatever the initial density, the latent periods were not monitored by MTT, which showed an increase in the OD signal. After the 1st or 2nd day of culture an increase in the OD value was always correlated with an increase in the number of parasites until the 5th day of culture. However, after the 3rd and 4th days of culture, depending on the initial cell concentration, a slight increase in the OD signal was observed even if a large increase in parasite number was monitored (Fig. 2A, B). Cell death, which occurred after 8 days of culture when parasites were seeded at 2×10^5 cells/well, was poorly monitored by MTT, which showed only a slight decrease in the OD signal. The variations observed between the counting method and the MTT-based assay could be explained by the observation that dividing cells release more formazan than do resting cells (Mosmann 1983). These data showed that cultures initiated with 2×10^5 amastigote forms/well in 96-well flat-bottom microtrays followed by 72 h of incubation were the most suitable conditions for performance of the MTT-based assay to quantify the proliferation of extracellular amastigote forms of *L. amazonensis*.

As shown in Fig. 3, the leishmanicidal activity of pentamidine was tested successfully. Pentamidine depressed both the OD₅₇₀ signal and the parasite number in a dose-dependent manner as compared with the respective controls. It is noteworthy that measurement via the MTT-based micromethod reflects cellular survival. Pentamidine had only poor activity, if any, at concentrations ranging from 1 to 2 μ M. A maximal effect was seen at concentrations higher than 5 μ M. These results demonstrate that pentamidine was directly toxic to dividing amastigote forms. Finally, dimethylsulfoxide (DMSO) and ethanol could be used as drug solvents

Fig. 2 A, B Growth curves generated for axenically grown amastigote forms of *L. amazonensis* in 96-well plates as determined by A counting and B MTT test. Parasites were seeded at two cell concentrations. The results are given as mean values for three experiments



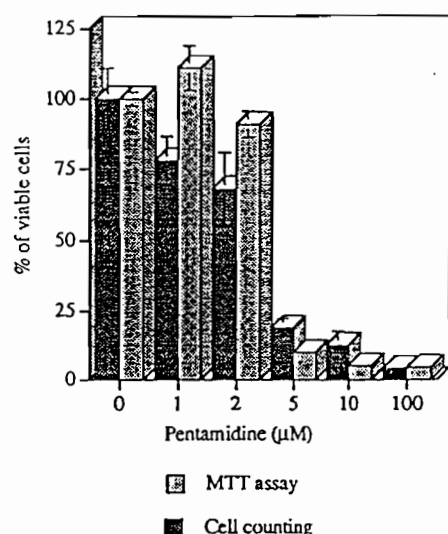


Fig. 3 Leishmanicidal activity of increasing concentrations of pentamidine on *L. amazonensis* amastigote forms. Cells were seeded at 2×10^5 parasites/well; after an incubation period of 72 h, dehydrogenase activities were measured and parasites were counted by microscope examination. The results are expressed as the percentage of viable cells as compared with the control without drug and represent mean values for three experiments

with minor cytotoxic effects at concentrations lower than 1% and 2%, respectively (data not shown).

This report demonstrates that it is now possible to perform a rapid, simple, and reliable colorimetric microassay for evaluation of the proliferation, viability, and dehydrogenase activities of axenically cultured amastigote forms. The currently available methods for in vitro drug screening on the amastigote forms are based on the use of infected mouse or human macrophages (Berman and Wyler 1980). To our knowledge, we describe for the first time the use of axenically cultured amastigote forms for the determination of drug sensitivity. This in vitro model may therefore provide a tool to investigate the pharmacological effect of antileishmanial agents at a cellular level, a method for early

screening of new potential agents, and a system in which the sensitivity of new isolates of *Leishmania* could be ascertained. It represents a general and useful tool in the field of parasitology.

Acknowledgements This work was supported by grants from INSERM-CNAM (921303) and from the ORSTOM institute. We thank J. L. Chevrolier for revising the language in the manuscript.

References

- Bates PA (1993) Axenic culture of *Leishmania* amastigotes. *Parasitol Today* 9: 143-146
- Berg K, Zhai L, Chen M, Kharazmi A, Owen TC (1994) The use of a water-soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of *Leishmania major* promastigotes. *Parasitol Res* 80: 235-239
- Berman JD, Wyler DJ (1980) An in vitro model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. *J Infect Dis* 142: 83-86
- Cole SPC (1986) Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother Pharmacol* 17: 259-263
- Lemesre JL, Darcy F, Capron A, Santoro F (1988) Requirements of defined cultivation conditions for standard growth of *Leishmania* promastigotes in vitro. *Acta Trop (Basel)* 45: 99-108
- Lemesre JL, Blanc MP, Grebaut P, Zilberfarb V, Carriere V (1994) Culture continue des formes amastigotes de leishmanies en condition axénique. Réalisation du cycle évolutif in vitro. *Med Armées* 22: 99
- Marr JJ (1980) Carbohydrate metabolism in *Leishmania*. In: Levandowsky M, Hunter SH (eds) *Physiology and biochemistry of protozoa vol 3*. Academic Press, New York, pp 171-211
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 65: 55-63
- Mukkada AJ, Meade JC, Glaser TA, Bonventre PF (1985) Enhanced metabolism of *Leishmania donovani* amastigotes at acidic pH: an adaptation for intracellular growth. *Science* 229: 1099-1101
- Rabinovitch M, Zilberfarb V, Ramazeilles C (1986) Destruction of *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes within macrophage by lysosomotropic amino acid esters. *J Exp Med* 163: 520-535

L'utilisation des formes amastigotes de culture axénique dans un modèle de criblage précoce d'activité leishmanicide. (Accepté pour publication, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*).

Les médicaments utilisés pour traiter les leishmanioses sont issus de recherches effectuées dans les années 1940. De part leur toxicité et l'émergence des problèmes de chimiorésistance, il devient urgent de pouvoir disposer de nouvelles molécules très actives et moins toxiques pour les patients, contre le stade intracellulaire du parasite. La détermination des profils de chimiosensibilité des formes amastigotes de différentes espèces de leishmanies, comparativement aux formes promastigotes a révélé tout l'intérêt de l'utilisation d'un test de criblage d'activité leishmanicide directement effectué sur le stade parasitaire médicalement important.

Principaux résultats

- 1) Pour la première fois, nous avons déterminé les profils de chimiosensibilité à 7 composés leishmanicides dont 3 sont couramment utilisés pour traiter les leishmanioses, des formes amastigotes de culture axénique de *L. mexicana*, de *L. amazonensis* et de *L. infantum*.
- 2) Nous avons confirmé la toxicité du Pentostam®, de la pentamidine et de l'amphotéricine B vis à vis du stade médicalement important des différentes espèces étudiées. Cependant, aux concentrations sériques potentiellement présentes chez les patients: (i) le Pentostam®, médicament de première intention, est faiblement actif directement sur les formes amastigotes et ceci quelques soient les espèces étudiées, (ii) la pentamidine est faiblement toxique, (iii) par contre l'amphotéricine B l'est fortement.
- 3) Il existe de grandes différences de chimiosensibilité entre les deux stades parasitaires. Les amastigotes de culture axénique sont plus sensibles que les formes promastigotes au Pentostam®. L'inverse est trouvé pour la pentamidine et l'amphotéricine B.
- 4) Le potassium antimonyle trihydrate (antimonié trivalent, SbIII) se révèle être beaucoup plus toxique que le Pentostam® (antimonié pentavalent, SbV) vis à vis du stade amastigote. Chez *L. infantum*, contrairement aux deux autres espèces, ce dérivé trivalent est beaucoup plus toxique vis à vis des formes amastigotes comparativement aux formes promastigotes correspondantes. L'ensemble de ces observations suggère la possibilité d'une conversion métabolique *in vivo* des

dérivés SbV en dérivés hautement toxiques SbIII, déjà suggérées à 50 ans d'intervalle par Goodwin (1943, 1996).

5) Des différences de chimiosensibilité sont aussi observées pour des composés à activité leishmanicide reconnue tel que le bérénil, le sodium arsénite et la primaquine.

6) Ce modèle expérimental offre de multiples avantages par rapport aux méthodes de criblage classiquement utilisées: (i) il est possible de déterminer l'activité antileishmanienne directement sur une population active de formes amastigotes, (ii) la méthode est rapide, reproductible, facilement interprétable et n'utilise pas de produits radioactifs; elle est donc aisément transférable vers les pays du sud concernés, (iii) elle rend possible l'analyse des différences de chimiosensibilité entre diverses espèces et souches de leishmanies, (iv) elle permet d'établir facilement le degré de chimiorésistance d'une souche, (v) enfin, couplée à des expériences d'interaction parasite-macrophage, elle permet de déterminer précisément le rôle joué par le macrophage dans la toxicité d'un composé. Ce modèle représente donc un excellent outil dans les domaines de la parasitologie et de la pharmacologie.

Axenically Cultured Amastigote Forms as an In Vitro Model for Investigation of Antileishmanial Agents

DENIS SERENO* AND JEAN-LOUP LEMESRE

Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies à Vecteur, Unité de Biologie Parasitaire, ORSTOM, Montpellier, France

Received 29 October 1996/Returned for modification 13 December 1997/Accepted 20 February 1997

Using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide microassay, previously described as a means of quantifying *Leishmania amazonensis* in vitro at the amastigote stage (34), we have compared the activities of seven drugs, including those currently used to treat leishmaniasis, against axenically grown amastigote and promastigote forms of three *Leishmania* species (*L. amazonensis*, *L. mexicana*, and *L. infantum*, responsible for diffuse cutaneous, cutaneous, and visceral leishmaniasis, respectively). The ability of axenically cultured amastigote organisms to be used in an investigation of antileishmanial agents was first evaluated. We have confirmed the toxicities of sodium stibogluconate (Pentostam), pentamidine, and amphotericin B to active and dividing populations of axenically cultured amastigotes. The toxicity of potassium antimonyl tartrate trihydrate, which is generally higher than those of the other drugs tested, seemed to indicate that pentavalent antimony can be metabolized in vivo to compounds, possibly trivalent in nature, which are more active against the amastigote organisms. When the drug susceptibilities of parasites at both stages were compared, great variations were found for all the drugs studied. These major differences, which show the specific chemosusceptibility of the parasite at the mammalian stage, demonstrate the potential of using cultured amastigotes instead of promastigotes in a drug-screening procedure for early detection. This in vitro model may help in the isolation of active compounds, particularly those with low-grade activities, against the mammalian stage of the parasite.

Leishmaniasis is a significant cause of morbidity and mortality in several countries. A vertebrate host is infected with flagellated, extracellular promastigotes of the parasite via the bite of a sand fly. Promastigotes are rapidly transformed into nonflagellated amastigotes within the mononuclear phagocytes of the vertebrate host. The basic treatment consists in the administration of sodium stibogluconate (Pentostam), meglumine (Glucantime), or pentamidine. Treatment failure, especially in kala-azar, mucosal leishmaniasis, and diffuse cutaneous leishmaniasis, is becoming a common problem in many areas where the diseases are endemic. There is now strong indication that treatment failure may be partly due to the drug resistance of the parasite (15). In addition, the low efficacy of pentavalent antimony in the treatment of patients coinfecting with AIDS and *Leishmania* spp. is often noticed (28). These problems prompted the development of additional antileishmanial drugs.

The development of new drugs has been impeded by the lack of a simple and rapid drug evaluation system directly applied to the parasite at the mammalian stage. *Leishmania* organisms in the amastigote form have been cultured in a wide range of mammalian cells. Some of them, including sticker dog sarcoma cells (fibroblasts) (22, 23), transformed rodent macrophages, primary isolated mouse peritoneal macrophages (27), human monocyte-derived macrophages (6, 7), and human leukemia monocyte THP-1 cells (12), have been used in vitro drug-screening procedures. Great variations in the activity of pentavalent antimony (Pentostam and Glucantime) were shown, depending on the model used. Pentostam, which was shown to be poorly toxic for amastigote forms of *Leishmania donovani*

and *L. mexicana* in cell lines (26), was in contrast highly toxic in the human-derived monocyte macrophage or mouse peritoneal macrophage model (6, 27). There is still no indication of the activity of this drug against a dividing population of extracellular amastigotes. The recent development of axenic cultures of amastigote forms of different *Leishmania* species (3, 4, 20a) provided new opportunities to investigate the leishmanicidal activities of new compounds directly at the mammalian stage of the parasite.

In this report we evaluate the ability of axenically grown amastigotes to be used in a relevant drug-screening procedure. The chemosensitivities of extracellular amastigote forms of three *Leishmania* species to different drugs, including those currently used for leishmaniasis, are evaluated and compared with those of the promastigote forms. Results are compared with those previously reported by researchers using classical screening procedures. These axenically cultured amastigotes appear to be a useful tool for the early determination of antileishmanial activity.

MATERIALS AND METHODS

Antileishmanial agents. Pentamidine isethionate, amphotericin B, diminazene aceturate, sodium arsenite, and potassium antimonyl tartrate trihydrate were supplied by Sigma (St. Louis, Mo.). Pentostam was a generous gift of H. Amini, University of Teheran, (Teheran, Iran). Our batch contained 0.1% *m*-chlorocresol as a preservative. Primaquine was given by J. Rodriguez (Bel Horizonte, Brazil).

Parasites. *L. infantum* clone 1 (MHOM/MA/67/TMAP-263), *L. amazonensis* clone 1 (MHOM/BR/76/LTB-012), and *L. mexicana* clone 3 (MNYC/BZ/62/M-379) were cloned by a micromanipulation method.

Cultures. We have successfully established axenic cultures of amastigote forms of different *Leishmania* species. A general procedure was used to generate large quantities of each parasite stage. Axenically grown amastigote forms of *L. amazonensis* and *L. mexicana* were maintained at $32 \pm 1^\circ\text{C}$, and *L. infantum* was maintained at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ with 5% CO_2 by weekly subpassages in a cell-free medium called MAA/20 (medium for axenically grown amastigotes) in 25-cm² flasks. From a starting inoculum of 5×10^5 amastigotes/ml, cell densities in the range of 2×10^7 to 7×10^7 /ml were obtained on day 7. MAA/20 consisted of modified medium 199 (Gibco BRL) with Hanks' salts, supplemented with 0.5%

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies à Vecteur, Unité de Biologie Parasitaire, ORSTOM, 911 Av. Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier Cédex 1, France. Phone: 04 67 41 61 67. Fax: 04 67 54 78 00.

TABLE 1. Susceptibilities of axenically grown amastigote and promastigote forms of *L. mexicana*, *L. amazonensis*, and *L. infantum* to drugs currently used to treat leishmaniasis

Parasite type	Parasite	Mean IC ₅₀ ± SD (n)* of:		
		Pentostam [μg of Sb(V)/ml]	Pentamidine (μM)	Amphotericin B (μM)
Amastigote	<i>L. mexicana</i>	220 ± 30 (4)	7.95 ± 1.63 (5)	0.21 ± 0.03 (5)
	<i>L. amazonensis</i>	270 ± 50 (3)	4.52 ± 0.13 (4)	0.26 ± 0.02 (3)
	<i>L. infantum</i>	134 ± 45 (4)	4.55 ± 0.32 (4)	0.79 ± 0.11 (6)
Promastigote	<i>L. mexicana</i>	470*** ± 50 (4)	1.03*** ± 0.10 (6)	0.14 ± 0.02 (4)
	<i>L. amazonensis</i>	410 ± 72 (4)	0.48*** ± 0.13 (4)	0.16* ± 0.05 (3)
	<i>L. infantum</i>	248** ± 36 (4)	0.45*** ± 0.11 (4)	0.24*** ± 0.11 (3)

* n, number of independent experiments, in triplicate; *, P < 0.05; **, P < 0.005; ***, P < 0.001.

soybean tryptone-casein (Pasteur Diagnostics, ●●●, France), 0.01 mM bathocuproinedisulfonic 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 at a final pH of 6.5 and supplemented to 20% with pretested fetal calf serum. The population of axenically grown amastigotes appeared homogeneous, round to ovoid, aflagellated, and immotile when examined under a phase-contrast light microscope. Axenically grown amastigotes had morphological, biochemical, and biological characteristics similar to those of in vivo-isolated amastigotes (20a).

Promastigote cultures were derived from axenically cultured parasites at the amastigote stage and were maintained at 25 ± 1°C by weekly subpassages in RPMI 1640 medium (Gibco BRL) buffered with 25 mM HEPES and 2 mM NaHCO₃ (pH 7.2) and supplemented with 20% heat-inactivated fetal calf serum. Initial parasite concentrations were 5 × 10⁵ flagellates per ml of medium.

Viability test. To estimate 50% inhibitory concentrations (IC₅₀s), the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) micromethod previously described (34) was used. Briefly, axenically grown amastigotes or promastigotes, from late log phase of growth, were seeded in 96-well flat-bottom microtiter plates (Nunc) in a volume of 100 μl under adequate culture conditions. Drugs were added at 1/10 of the final concentration in a volume of 10 μl in triplicate (range depended on the drug). After 72 h of incubation, 10 μl of MTT (10 mg/ml) was added to each well and plates were further incubated for 4 h. The enzyme reaction was then stopped by addition of 100 μl of 50% isopropanol-10% sodium dodecyl sulfate. The plates were incubated for an additional 30 min under agitation at room temperature before the optical density at 570 nm was read with a titer-each 96-well scanner. Two or more independent experiments in triplicate were performed for the determination of sensitivity to each drug. As a control, the activity of a drug alone in reagent was determined, and no substantial interaction was found.

Data analysis. The results of each experiment were analyzed by the method described by Hills et al. (18) and Huber and Koella (19). Briefly, Hills proposed finding two concentrations, x_1 and x_2 , such that the parasite density, y_1 , at concentration x_1 (and all lower concentrations) was more than half of the density found in the control, y_0 , and that the parasite density, y_2 , at concentration x_2 (and all higher concentrations) was less than half of y_0 . The IC₅₀ was then found by linear extrapolation between x_1 and x_2 : $\log(\text{IC}_{50}) = \log(x_1) + [(y_1 - y_0/2)/(y_1 - y_2)] [\log(x_2) - \log(x_1)]$.

Statistical analysis. The Student *t* test, with significance at *P* values of <0.05, <0.005, and <0.001, was used to compare drug susceptibilities of parasites at both stages.

RESULTS

Activities of drugs currently used to treat leishmaniasis against axenically grown amastigotes. The presence in culture of Pentostam at a concentration to give about 134 μg of Sb(V) per ml for 3 days resulted in the elimination of 50% of the amastigotes of *L. infantum*. Concentrations of Pentostam yielding approximately 250 μg of Sb(V) per ml had the same effect on the viability of *L. amazonensis* and *L. mexicana* (Table 1). These concentrations, which were about 6- to 13-fold higher than the peak level of Pentostam in human serum (14, 33), could not explain the high in vivo activity of this drug.

Concentrations of pentamidine in the range of 4.5 to 7.5 μM killed approximately 50% of the parasites at the mammalian stage for the three species studied. Even if slight differences in pentamidine susceptibility were noticed among *Leishmania* species (Table 1), pentamidine was only poorly potent against

the amastigote forms at the concentration achieved in the sera of humans (about 1 μM) given intramuscular injections of 4 mg/kg of body weight (35).

As indicated in Table 1, amphotericin B showed a high toxicity for all the amastigote forms studied, at concentrations close to those found in the plasma of humans receiving intravenously 70 mg of amphotericin B (about 1 μM) (1). However, *L. infantum* was found to be the least susceptible species.

Differences in the chemosusceptibilities of parasites at the two stages. Promastigote forms of the three species were fairly susceptible to Pentostam. *L. mexicana* and *L. amazonensis*, with IC₅₀s of 470 ± 50 and 410 ± 72 μg/ml, respectively, were the less susceptible species (Table 1). Promastigotes were significantly less susceptible to this drug than amastigotes (Table 1).

IC₅₀s for pentamidine were in the range of the micromolar concentrations of the drug for the promastigote forms of *L. infantum*, *L. amazonensis*, and *L. mexicana* (Table 1). Amastigote forms of the three species studied showed an eightfold reduction in susceptibility to pentamidine when they were compared with the respective promastigote forms (*P* < 0.005) (Table 1).

Amphotericin B was highly toxic to parasites at the two stages. IC₅₀s ranged between 0.1 and 0.2 μM for promastigotes and varied from about 0.2 to about 0.8 μM for organisms at the intracellular stage (Table 1). Amastigotes of *L. infantum* (*P* < 0.005) and *L. amazonensis* (*P* < 0.05) were significantly less susceptible than their corresponding promastigotes (Table 1), whereas *L. mexicana* showed virtually the same amphotericin B susceptibility at both parasite stages.

Activities of other leishmanicidal compounds. As shown in Table 2, potassium antimonyl tartrate trihydrate [Sb(III)], a trivalent antimonial, was more toxic than pentavalent antimony (Pentostam) to the three species of parasites at the two developmental stages studied. *L. infantum* organisms in the promastigote form were less susceptible to this drug than the two other species, in particular, *L. amazonensis* [IC₅₀, 1.58 ± 0.65 μg of Sb(V)/ml], *L. mexicana* expressing an intermediate susceptibility. The two cutaneous species (*L. amazonensis* and *L. mexicana*) at the mammalian stage were significantly less sensitive to Sb(III) than their corresponding promastigotes (*P* < 0.01 and *P* < 0.005, respectively), whereas amastigotes of the visceral species (*L. infantum*) were about 10-fold more susceptible (*P* < 0.005) than the promastigotes (Table 2).

The 8-aminoquinoline compound primaquine, which has been described to be highly potent against the intramacrophagic amastigote form of *L. donovani* (27), was highly toxic to the axenically cultured amastigote forms of the three *Leishmania* species. *L. amazonensis* and *L. infantum* at both parasite

TABLE 2. Susceptibilities of axenically grown amastigote and promastigote forms of *L. mexicana*, *L. amazonensis*, and *L. infantum* to potassium antimonyl tartrate, primaquine, sodium arsenite, and diminazene aceturate

Parasite type	Parasite	Mean IC ₅₀ ± SD (n) ^a of:			
		Potassium antimonyl tartrate (μg/ml)	Primaquine (μM)	Sodium arsenite (μM)	Diminazene aceturate (μM)
Amastigote	<i>L. mexicana</i>	100.24 ± 9.51 (3)	22.24 ± 1.94 (5)	6.15 ± 1.36 (4)	6.88 ± 0.53 (3)
	<i>L. amazonensis</i>	32.22 ± 8.35 (3)	53.09 ± 1.13 (3)	2.68 ± 0.47 (4)	1.49 ± 0.55 (3)
	<i>L. infantum</i>	3.80 ± 2.50 (6)	62.14 ± 6.78 (4)	4.93 ± 2.72 (3)	7.01 ± 1.03 (3)
Promastigote	<i>L. mexicana</i>	21.82*** ± 2.84 (3)	54.89*** ± 3.69 (5)	7.02 ± 1.33 (3)	10.28 ± 3.89 (3)
	<i>L. amazonensis</i>	1.58** ± 0.65 (3)	42.27 ± 1.13 (3)	1.88** ± 0.15 (5)	1.01 ± 0.53 (5)
	<i>L. infantum</i>	35.08*** ± 5.20 (3)	59.84 ± 3.33 (3)	16.23*** ± 2.03 (3)	2.47*** ± 0.48 (3)

^a n, number of independent experiments, in triplicate; *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.005; ***, *P* < 0.001.

stages did not show differences in their chemosensitivities to primaquine, unlike *L. mexicana* in its amastigote form, which was about twofold more susceptible than its promastigote form (*P* < 0.005) (Table 2).

As shown in Table 2, *L. mexicana* organisms at both parasite stages were equally sensitive to sodium arsenite, a metalloid. By contrast, major differences were noticed between the two stages of the other two species. Axenically grown amastigotes of *L. amazonensis* and *L. infantum* were about twofold and fourfold more susceptible than their corresponding promastigotes, respectively (*P* < 0.001 and *P* < 0.01, respectively) (Table 2).

Diminazene aceturate showed differences in toxicity not only among species (with IC₅₀s in the range of 1 to 10 μM) but also between both parasite stages of *L. infantum* (*P* < 0.001) (Table 2).

DISCUSSION

The in vivo efficiencies of drugs have been reported to be under the control of different parameters, such as pharmacokinetic parameters. One of the most important parameters was a drug's direct activity against a parasite at the mammalian stage. Axenically grown amastigotes may thus become a powerful tool in the isolation of new compounds with high activities against active and dividing populations of amastigote organisms. We and other investigators have previously shown that extracellular amastigotes clearly resembled intracellular amastigotes in their ultrastructural, biological, biochemical, and immunological properties (3, 4, 20a). Moreover, characterized amastigotes, such as intracellular ones, differed from promastigotes in having a variety of biochemical characteristics, including proteinase, ribonuclease, adenine deaminase, peroxidase, and dehydrogenase activities, glucose catabolism, nucleic acid synthesis, and nitric oxide activity (11, 17, 21, 29, 34). In this report, a relevant viability test (34) was used to investigate the ability of axenically cultured amastigotes of different *Leishmania* species to be used in an in vitro drug-screening procedure.

We have found that Pentostam was poorly toxic to axenically grown amastigotes at the concentration achieved in human serum (14, 33). Active and dividing populations of axenically cultured amastigotes were generally more susceptible to Pentostam than their corresponding promastigotes. It is known that sodium stibogluconate is a complex mixture of components (5). A fractionation experiment using Pentostam has shown that the preservative *m*-chlorocresol accounts for virtually all the leishmanicidal activity of the fractionated material (31). So it will be of interest to determine the activities of these

compounds against leishmanias in the amastigote forms. The mode of action of the pentavalent antimonials is poorly understood (5, 8, 10). The possibility of metabolic conversion of pentavalent to trivalent antimony in vivo was suggested more than 50 years ago (13, 14). Previous in vitro experiments with *L. mexicana* promastigotes demonstrated that antimony sodium gluconate (Triostam), a trivalent analog of sodium stibogluconate, had a 50% lethal dose of 20 μg of Sb(III)/ml, while sodium stibogluconate at 100 μg of Sb(V)/ml has no effect (25). We and other investigators have shown that trivalent antimonial compounds were highly toxic to different *Leishmania* species in the promastigote form at concentrations ranging from 1.58 to 35.00 μg of Sb(III)/ml (25, 30–32). Potassium antimony (III) tartrate was shown to be substantially more potent than sodium stibogluconate against both promastigotes and amastigotes (30–32). The generally higher toxicity of potassium antimonyl tartrate, when compared with that of pentavalent antimony, to organisms at both parasite stages, strongly supports the hypothesis of an in vivo reduction of sodium stibogluconate to an active trivalent antimony species. It has been reported that potassium antimonyl tartrate, which is highly toxic to promastigotes of *L. pifanoi*, which belongs to the *L. mexicana* family, at concentrations of 1 to 2 μg of Sb(III)/ml is less toxic to axenic amastigotes of *L. pifanoi* [20 μg of Sb(III)/ml] (30, 31). In agreement with these finding, we show that extracellular amastigotes of *L. mexicana* and *L. amazonensis* were less susceptible to potassium antimonyl tartrate than their corresponding promastigotes. More interesting is the finding that amastigotes of *L. infantum* were more susceptible to potassium antimonyl tartrate than their corresponding promastigotes.

Pentamidine was significantly less active against axenically grown amastigotes than promastigotes of the three *Leishmania* species studied. Using our experimental model of axenic cultures, researchers have shown that axenically grown amastigote organisms, like promastigote organisms, possess an active carrier involved in pentamidine uptake (2). In addition, same authors have demonstrated that axenically cultured amastigotes have a reduced number of transport sites per cell when compared with promastigotes. These observations may explain the lower susceptibilities of extracellular amastigotes to this drug. At concentrations achieved in serum, 0.5 to 0.8 μM (35), pentamidine has little or no effect on amastigotes. These results suggest a major role for macrophages in the cytotoxicity of pentamidine, either in metabolizing or in concentrating the drug, as was previously described (9).

All the leishmanias at both parasite stages were found to be highly susceptible to amphotericin B, the amastigote forms

being significantly less sensitive. These results are in substantial agreement with those obtained with a macrophage model (6, 20). Interestingly, this drug, which was used to treat unresponsiveness to Pentostam, was highly potent against extracellular amastigotes at concentrations below the maximal concentration achieved in serum (1). These data showed that amphotericin B was directly toxic to the parasite at the amastigote stage and did not seem to depend upon macrophage activation for its antileishmanial activity (16).

The additional differences in drug susceptibility between axenically grown amastigote and promastigote forms observed for primaquine, diminazene aceturate, and sodium arsenite, together with those observed for drugs in use to treat leishmaniasis, indicate the potential of this *in vitro* model for the assessment of direct drug activity against the parasite stage in contact with drugs.

Collectively, all these data show that most well-known leishmanicidal agents, whose activities have been demonstrated *in vitro* with macrophage models, significantly inhibit growth of axenic amastigotes. However, some limitations of this method should be enumerated: (i) a drug active *in vitro* in a macrophage model (Pentostam) does not significantly inhibit growth at concentrations achieved in serum, (ii) drugs which have to be metabolized by the host before affecting the parasite are likely to be missed, (iii) drugs which have to be concentrated by macrophages may show only slight activity in our *in vitro* model, and (iv) the MTT test may not be accurate, due to the interaction of the drug with tetrazolium. For example, we were not able to determine the activity of Glucantime on promastigote and amastigote forms because of this kind of problem. In fact Glucantime (and/or its preservative) alone in reagent seems to interact with the medium, thus showing inaccurate optical densities (unpublished results). This interaction may have some effect on the drug activity and may explain the different activities observed for this drug under variable growth conditions (24).

However, this *in vitro* model presents numerous technical advantages over the traditional early drug-screening procedure: (i) reliable experiments tolerating higher drug concentrations and requiring shorter experimental periods can be carried out easily, (ii) interpretation of the results is easier and it is possible to examine variation in drug susceptibility among strains and species, (iii) sensitivities of new isolates of *Leishmania* can also be ascertained rapidly in order to evaluate their drug resistance profiles, and (iv) with *in vitro* models using macrophages, the influence of macrophages on drug activity can be analyzed.

It is now possible to directly evaluate the toxicities of new compounds to a parasite at the mammalian stage. This may help in isolating new leishmanicidal compounds with high specific activities against the parasite at the mammalian stage. This model represents a general and useful tool in the field of pharmacology and parasitology.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from ORSTOM institute.

We thank J. L. Chevrolier and G. Nicaise for revising the language of the manuscript.

REFERENCES

- Atkinson, A. J., and J. E. Bennett. 1978. Amphotericin B pharmacokinetics in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13:271-276.
- Bassell, M., F. Lawrence, and M. Robert-Gero. 1996. Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Biochem. J.* 315:631-634.

- Bates, P. A. 1993. Axenic culture of *Leishmania* amastigotes. *Parasitol. Today* 9:143-146.
- 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. 1988. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. *Rev. Infect. Dis.* 10:560-586.
- Berman, J. D., and D. J. Wyler. 1980. An *in vitro* model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 142:83-86.
- Berman, J. D., and J. V. Gallalee. 1985. Semiautomated assessment of *in vitro* activity of potential antileishmanial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28:723-726.
- 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.
- Berman, J. D., J. V. Gallalee, and B. D. Hansen. 1987. *Leishmania mexicana* uptake of sodium stibogluconate (Pentostam) and pentamidine by parasite and macrophage. *Exp. Parasitol.* 64:127-131.
- 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.
- 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.
- 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.
- Goodwin, L. G. 1995. Pentostam® (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89:339-341.
- 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.
- 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.
- Haldaris, C. G., and P. F. Bonventre. 1993. Efficacy of combined immunostimulation and chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32:327-340.
- Hassan, H. F., and G. H. Coombs. 1985. *Leishmania mexicana*, purine metabolizing enzymes of amastigotes and promastigotes. *Exp. Parasitol.* 59:15-28.
- Hills, M., C. Hudson, and P. G. Smith. 1986. Global monitoring of the resistance of malarial parasites to drugs: statistical treatment of micro-test data. Working paper 2.8.5. Informal consultation on the epidemiology of drug resistance of malaria parasites. Geneva, Switzerland.
- Huber, W., and J. C. Koella. 1993. A comparison of three methods of estimating EC50 in studies of drug resistance of malaria parasites. *Acta Trop.* 55:257-261.
- Lamy, L., T. Wondé, and H. Lamy. 1966. Activité de l'amphotéricine B sur *Leishmania donovani* en multiplication dans des macrophages de souris entretenus *in vitro*. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 59:964-968.
- Lemesre, J.-L. 1994. French patent PCT/FR 94/00577. *Fla7*
- Lemesre, J. L., D. Sereno, S. Daulouède, B. Veyret, N. Brajon, and P. Vincendeau. *Leishmania* spp.: nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically-grown amastigote forms. *Exp. Parasitol.*, in press.
- Mattock, N. M., and W. Peters. 1975. The experimental chemotherapy of leishmaniasis. II. The activity in tissue culture of some antiparasitic and antimicrobial compounds in clinical use. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 69:359-371.
- Mattock, N. M., and W. Peters. 1975. The experimental chemotherapy of leishmaniasis. I. Technique for the study of drug action in tissue culture. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 69:359-371.
- Moreira, E. S., R. M. Soares, and M. L. Petrillo-Pelxoto. 1995. Glucantime susceptibility of *Leishmania* promastigotes under variable growth conditions. *Parasitol. Res.* 81:291-295.
- 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.
- Neal, R. A. 1987. Experimental chemotherapy, p. 793-845. In W. Peters and R. Killick-Kendrick (ed.), *The leishmaniasis in biology and medicine*, Vol. II. Academic Press Inc., London, United Kingdom.
- Neal, R. A., and S. L. Croft. 1984. An *in vitro* system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* 14:463-475.
- 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 feature and response to therapy. *Q. J. Med.* 77:1101-1111.
- Rainey, P. M., T. W. Splthill, D. McMahon-Pratt, and A. Pan. 1991. Biochemical and molecular characterization of *Leishmania pifanoi* amastigotes in continuous axenic culture. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49:111-118.
- Roberts, W. L., and P. M. Rainey. 1993. Antimony quantification in *Leishmania* by electrothermal atomic absorption spectroscopy. *Anal. Biochem.* 211:1-6.

AUTHOR: SEE QUERY PAGE _____

VOL. 41, 1997

CHEMOSUSCEPTIBILITIES OF LEISHMANIAL FORMS 5

31. Roberts, W. L., and P. M. Rainey. 1993. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:1842-1846.
32. Roberts, W. L., J. D. Berman, and P. M. Rainey. 1995. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1234-1239.
33. Rees, P. H., M. I. Keating, P. A. Kager, and W. T. Hockmeyer. 1980. Renal clearance of pentavalent antimony (sodium stibogluconate). *Lancet* ii:226-229.
34. Sereno, D., and J. L. Lemesre. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* in vitro. *Parasitol. Res.*, in press.
35. Waalkes, T. P., and V. T. Devita. 1970. The determination of pentamidine (4-4'-diaminodiphenoxypentane) in plasma, urine and tissues. *J. Lab. Clin. Med.* 75:871-878.

Action de la pentamidine sur les caractéristiques ultrastructurales des formes promastigotes et amastigotes de *L. mexicana*. (Soumis pour publication, *Memorias instituto de Oswaldo Cruz*)

L'action de la pentamidine sur le kinétoplaste des formes promastigotes de leishmanies est connue depuis fort longtemps. En effet, elle induit sa fragmentation et sa condensation. Dans l'étude précédente, nous avons montré que les formes amastigotes axéniques de différentes espèces de leishmanies étaient significativement moins sensibles que les formes promastigotes à ce médicament. Cette étude ultrastructurale tend à démontrer que cette observation est à mettre en relation avec l'action plus marquée de la pentamidine sur le kinétoplaste des formes promastigotes.

Principaux résultats

L'analyse en microscopie électronique à transmission montre que la pentamidine, à une concentration de 5 μM , induit une condensation du kinétoplaste et une destruction des mitochondries des formes promastigotes. En effet, les mitochondries sont distendues et ne présentent plus de structures internes organisées. Par contre, le kinétoplaste et les mitochondries des formes amastigotes, semblent intacts. La plus grande toxicité de la pentamidine vis à vis des formes promastigotes par rapport aux formes amastigotes est donc à corrélérer avec les modifications ultrastructurales observées.

**Action of pentamidine on axenically-grown amastigotes of
Leishmania mexicana : Ultrastructural studies.**

Denis SERENO and Jean Loup LEMESRE

Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies à Vecteur, Unité de Biologie Parasitaire. ORSTOM.
34 032 Montpellier Cedex.

Running title : Action of pentamidine on axenically-grown amastigote forms of *Leishmania mexicana* .

Key words: Promastigotes, Amastigotes, Pentamidine.

Reprint requests should be addressed to : Denis SERENO, Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies à Vecteur, Unité de Biologie Parasitaire, ORSTOM, 911 Av Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1.

Fax: 67 54 78 00

Tel: 67 41 61 67

email:Lemesre@melusine.mpl.orstom.fr

Leishmaniasis is a significant cause of morbidity and mortality in tropical and sub-tropical area. *Leishmania* species were responsible for a wide range of human diseases from the self-healing cutaneous lesions to fatal visceral infections. These protozoan parasites exist as a flagellated extracellular promastigote form in their sandfly vectors. However, following the initial infection, only amastigotes forms persist in the mammalian host, surviving and dividing into the phagolysosomes of various vertebrate macrophages. By the way promastigotes forms can be cultured *in vitro* under a variety of different conditions. Extensive biochemical, pharmacological and metabolic studies have been carried out with promastigotes. By contrast the study of the amastigote forms has been hampered by difficulties to obtain sufficient purified mammalian stage. Toward that and recently, we and others have developed culture systems for the *in vitro* growth of large amounts of axenic leishmanial amastigotes free of host cell contamination (PA Bates et al 1992 *J Parasitol* 105: 193-202, PA Bates 1993. *Parasitol Today* 9: 143-146, JL Lemesre PCT/FR N° 94/00577, D Sereno and JL Lemesre *Parasitol Res*: in press). Ultrastructural modifications, induced by pentamidine, were extensively studied on the promastigote forms and on amastigote *in vivo* or on intracellular amastigote. Pentamidine induced major changes in the structure of the mitochondrion and the kinetoplast of the promastigote and of the amastigote forms (B Hentzer and T Kobayashi 1977 *Ann Trop Med and Parasitol* 71: 157-166, SL Croft and RP Brazil 1982 *Ann Trop Med and Parasitol* 76: 37-43, Langreh et al 1983 *J Protozool.* 30: 555-561). In order to evaluate the influence of pentamidine on the ultrastructure of axenically-grown amastigote of *L.mexicana* and to compare with their corresponding promastigote, ultrastructural studies were performed on both stages *in vitro*.

Axenically-grown amastigotes of *Leishmania mexicana* (MNYC/BZ/62/M-379) were cultured in MAA medium containing 20% of heat inactivated foetal calf serum at 32+/- 1 °C. Corresponding promastigotes were cultured in RPMI 1640 (GIBCO) medium containing 20% of heat inactivated foetal calf serum at 27+/- 1 °C. Pentamidine isethionate (SIGMA) was sterilized by filtration (Millipore GS-0,22µM) and added to parasite cultures to give the appropriate concentrations. Promastigote and amastigote cultures were treated with 5 µM pentamidine and incubated for 24 hours and then collected. Promastigote and amastigotes were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0,1M Sorensen phosphate buffer (pH 7.2) for 2 hours at 4°C, washed twice in 0,175 M Sorensen phosphate (pH 7.2) and post fixed in 1% (w/v) OsO₄ in 0.1 M Sorensen buffer for 1 hour at room temperature. The samples were dehydrated in ethanol and embedded in epon resin. Ultrathin section were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined on phillips CM12 microscope at 100 kv.

The untreated cultures promastigotes showed structure characteristics described many times for *Leishmania* species (C Aleman 1969 *Exp Parasitol* 24: 259-264, SL Croft and RP Brazil 1982 *Ann Trop Med and Parasitol* 76: 37-43). When promastigotes were treated for 24 hours with 5 µM of pentamidine a major disruption of the mitochondrion was observed (Figure 1 A). The mitochondrion appeared distended and contains fragments of membranes. The disruption and the condensation of the kinetoplast DNA core was also observed. Untreated extracellular

amastigote forms showed typical structure (unshown results). When they were treated with 5 μ M of pentamidine for 24 hours, mitochondrion and kinetoplast remained intact (figure 1 B).

The results presented therein showed that ultrastructural changes appeared at lower concentration of pentamidine in promastigote than in axenically-grown amastigote forms. These results were in substantial agreement with previously reports showing a lower susceptibility of amastigotes to pentamidine than their corresponding promastigotes (D Sereno and JL Lemesre *Antimicrob Agents & Chemother* in press). They also agreed with those reported by SL Croft and RP Brazil (1982 *Ann Trop Med and Parasitol* 76: 37-43), which showed that pentamidine induced quicker ultrastructural changes in promastigotes than on *in vitro* intracellular amastigotes. Entry of pentamidine was shown to be dependent upon an active transport system in *Trypanosoma Brucei* (D Damper and CL Patton 1976. *Biochem pharmacol* 25: 271-276, D Damper and CL Patton 1976 *J Protozool* 23: 349-356). Our results suggest that amastigote forms were less susceptible to pentamidine probably because these forms have a lower uptake of pentamidine (M Basselin et al 1996. *Biochem J* 315: 631-634).

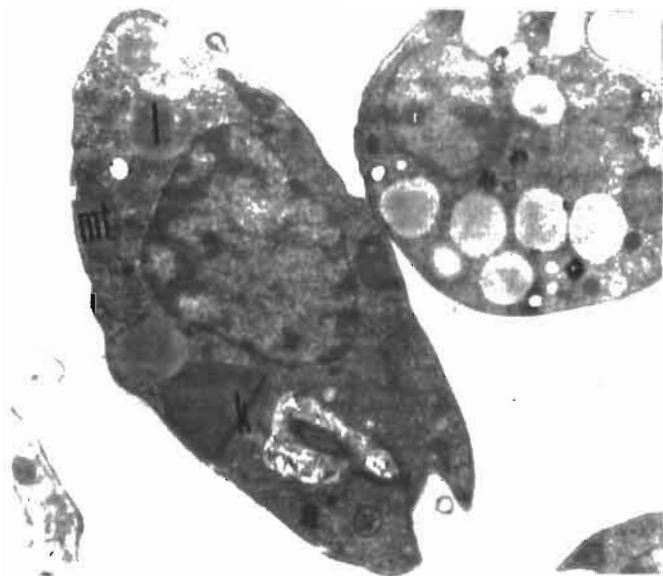
Figure 1. Ultrastructural aspect of *Leishmania mexicana* (A) promastigote forms treated with 5 μ M of pentamidine for 24 hours x 19 000 (B) Axenically grown amastigote forms treated with 5 μ M of pentamidine x 13 000.

(fp) Flagellar pocket (k) kinetoplast (m) mitochondrion (l) lipid droplet.

A



B



Caractérisation phénotypique des formes promastigotes chimiorésistantes à la pentamidine de *L. mexicana*: transmission de la résistance au cours du cycle de développement parasitaire *in vitro*. (Soumis pour publication, *Parasitology Research*)

Les échecs thérapeutiques et les rechutes après chimiothérapie sont actuellement les problèmes majeurs rencontrés dans le traitement des parasitoses, dont la leishmaniose. Ces problèmes sont à relier, en partie, avec l'émergence des phénomènes de chimiorésistance. Les études effectuées *in vitro* sur les mécanismes de chimiorésistance portent sur des molécules qui ne sont pas utilisées en thérapie antileishmanienne et sur le stade parasitaire qui n'est pas réellement en contact avec la drogue. De plus, peu d'informations sont disponibles quant: (i) au bon déroulement du cycle de développement parasitaire d'une lignée chimiorésistante (indispensable à la survie et à la propagation du parasite), (ii) à l'éventuelle transmission du caractère chimiorésistant au cours de ce cycle. Dans cette étude nous avons sélectionné par pression médicamenteuse continue des formes promastigotes de *Leishmania mexicana* chimiorésistantes à la pentamidine. Un premier volet de l'étude a consisté en la caractérisation phénotypique de deux lignées résistantes à différentes concentrations de pentamidine. Dans un deuxième temps, la transmission et/ou la modulation de la chimiorésistance de ces phénotypes ont été étudiés au cours du cycle complet de développement parasitaire *in vitro*.

Principaux résultats

1) Nous avons étudié deux variants résistants à 5 μ M (LmR5Cl2) et à 20 μ M (LmR20Cl1) de pentamidine. Toutes les études de caractérisation et de transmission des phénotypes chimiorésistants ont été effectuées sur des clones présentant une résistance stabilisée à la pentamidine. La résistance induite chez les clones de *L. mexicana* est conservée après plus de deux mois de culture en l'absence de pentamidine, les mutants étant toujours résistants à 5 et 20 μ M de pentamidine respectivement.

2) Nous montrons que les mutants résistants présentent plusieurs résistances croisées, notamment au diminazène acéturate et au méthotrexate. Le variant le plus fortement résistant présente aussi une faible résistance croisée à l'arsénite de sodium. Le vérapamil (molécule connue pour réverser la multirésistance des cellules cancéreuses et de *Plasmodium*) diminue fortement et de façon dose-dépendante la chimiorésistance à la pentamidine des deux clones étudiés. Cependant la famille des P-glycoprotéines, impliquée dans les mécanismes de multi-résistance,

ne semble pas être responsable de la chimiorésistance induite. En effet, aucune immunoréactivité n'est révélée avec des anticorps spécifiquement dirigés contre celle-ci.

3) La possibilité de réaliser le cycle de développement parasitaire *in vitro*, en condition axénique, nous a permis de suivre les phénotypes de chimiorésistance au cours de celui-ci. Nous montrons que le caractère chimiorésistant du clone présentant le plus fort degré de résistance (LmR20Cl1) est totalement perdu après un seul cycle de différenciation *in vitro*. La perte de la chimiorésistance est très rapide et semble être induite dès que les formes promastigotes subissent une différenciation en formes amastigotes. A l'opposé, le clone faiblement résistant (LmR5Cl2) conserve son phénotype après un, voire même plusieurs cycles de différenciation.

4) Les variants chimiorésistants sont capables de pénétrer, de se différencier et de survivre dans des macrophages péritonéaux de souris. Lorsque le cycle passe par l'intermédiaire de macrophages péritonéaux de souris, les résultats confirment ceux précédemment obtenus lors de la réalisation du cycle *in vitro* en condition axénique.

5) Dans nos conditions expérimentales, nous montrons qu'un parasite chimiorésistant est capable de réaliser normalement son cycle. La transmission de son phénotype semble dépendre du degré de chimiorésistance induite. Cette étude met l'accent sur l'intérêt d'étudier le devenir du caractère chimiorésistant lors du déroulement du cycle évolutif. Cependant il est difficile d'étendre les résultats obtenus avec les formes promastigotes aux formes amastigotes présentes chez l'hôte infecté soumis à un traitement médicamenteux.

Phenotypic characterization of pentamidine-resistant promastigote forms of Leishmania mexicana : transmission and modulation of the resistance during developmental life cycle.

Denis SERENO, Pascal MICHON, Nathalie BRAJON and Jean Loup LEMESRE*

Laboratoire d'Epidémiologie des maladies à vecteur, Unité de Biologie Parasitaire, ORSTOM Montpellier.

Running title: Pentamidine resistance of L. mexicana during developmental life cycle.

Key words: Leishmania mexicana, drug resistance, pentamidine, promastigote, amastigote.

Corresponding author

JL LEMESRE, Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies à Vecteur, Unité de Biologie Parasitaire, ORSTOM, 911 Av Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France.

Fax: 67 54 78 00

Tel: 67 41 61 67

Email: Lemesre@melusine.mpl.orstom.fr

Abstract

Pentamidine-resistant promastigote clones of Leishmania mexicana, were selected in vitro using a continuous drug pressure protocol. Two clones resistant to 5 μ M (LmR5CL2) and 20 μ M (LmR20CL1) pentamidine, derived from a parental wild-type clone (LmWTCL3), were studied. Both resistant clones expressed a strong cross-resistance to diminazene aceturate and methotrexate. The most resistant one was also cross-resistant to sodium arsenite. Pentamidine resistance was partially reversed by verapamil in a dose-dependent manner. No differences in their *in vitro* infectivity for mouse peritoneal macrophages between wild-type and pentamidine-resistant promastigotes were observed. During these experiments, promastigotes of LmR20CL1 derived from intramacrophagic amastigote forms reverted to pentamidine sensitive phenotype, unlike the lower resistant ones (LmR5CL2). In the same way, when a complete developmental sequence of L. mexicana was achieved in axenic cultures by manipulation of appropriate culture conditions, LmR20CL1 promastigotes derived from axenically growing amastigotes expressed an IC₅₀ value close to the wild-type one, whereas resulting LmR5CL2 promastigotes remained pentamidine-resistant. This modulation of the chemoresistance during the developmental life cycle could be significant in the transmission of drug-resistant strains by Phlebotominae as well as in basic research to follow drug-resistance during in vitro and in vivo life cycle Leishmania.

Introduction

Leishmaniasis is a significant cause of morbidity and mortality in tropical and subtropical areas. These protozoan parasites exist as a flagellate extracellular promastigote form in their sandfly vectors. In the mammalian hosts, only a nonflagellate amastigote form persists, surviving and dividing in the phagolysosome of macrophages. Current chemotherapeutic manipulations for the treatment of leishmaniasis are far from ideal, and the emergence of drug-resistant organisms is a serious and widely recognized problem in many parasitic diseases (Chulay et al, 1983; Bryceson et al, 1985; Grögl et al, 1992). The design of an effective chemotherapeutic strategy for the treatment of leishmaniasis depends on the comprehension of fundamental mechanisms by which parasites become resistant to drugs and transmit the chemoresistance during life cycle of the parasites. Promastigote forms of Leishmania species have served as a prototype genus for elucidating the molecular mechanism and the biochemical alterations that provoke drug resistance in parasitic protozoa, due to the facility by which their culture conditions can be manipulated (Ouellette and Papadopolou, 1993). The development of drug resistance in vitro greatly facilitates studies on the molecular basis of drug resistance or drug insusceptibility. Only little information is available on the transmission of the drug resistance during life cycle of the parasite. Some authors have reported a possible conservation of the drug resistance phenotype during the promastigote-amastigote-promastigote differentiations using macrophage model or experimental infections in vivo (Kink and Chang, 1987; Detke et al, 1989; Phelouzat et al, 1993). In this report, clones of L. mexicana at different levels of pentamidine resistance (5 μ M and 20 μ M respectively) were obtained using a continuous drug pressure procedure. Drug-resistant phenotype, including cross-resistance to structurally related and unrelated drugs and stability of the resistance without drug pressure was determined. By using induced-resistant parasites, we have analyzed the modulation of the pentamidine resistance of promastigotes derived from intramacrophagic amastigotes. Moreover, as it was yet described (Bates et al, 1992; Bates, 1993) we have developed axenic cultures of amastigote forms of L. mexicana to reproduce a complete developmental sequence by manipulation of media, pH and temperature conditions (Lemesre et al, 1994; Lemesre, patent PCT/FR N°94/00577). Using this model, it was possible to follow pentamidine-resistant phenotype of the parasites during their in vitro life cycle. Collectively, the results demonstrate that the drug resistance phenotype as well as the transmission of the pentamidine resistance during developmental life cycle of L. mexicana were dependent on the induced-chemoresistance level.

Materials and Methods

Leishmania species. *Leishmania mexicana* Cl3 (MNYC/BZ/62/M-379) was used in this study. Parasites were cloned by micromanipulation.

Drugs and reagents. Pentamidine isethionate, amphotericin B, diminazene aceturate, sodium arsenite, methotrexate, vimblastine, mycophenolic acid, verapamil and potassium antimonyl tartrate trihydrate were supplied by SIGMA. Pentostam® was a generous gift of Dr H. Amini, university of Teheran (Iran). Primaquine was a generous gift of Dr Rodriguez, Bel Horizonte (Brazil).

Selection of pentamidine-resistant promastigotes. Promastigote cultures were maintained at 25 +/- 1°C by weekly subpassages in RPMI 1640 (Gibco BRL) medium, buffered with 25 mM HEPES, 2 mM NaHCO₃, pH 7.2, supplemented with 20% (V/V) heat-inactivated fetal calf serum (FCS). Initial parasite concentrations were 5x10⁵ flagellates per ml of medium.

Cloned wild-type promastigote forms of *L. mexicana* (designated LmWTCL3) were adapted to survive in medium containing about 0.5 µM pentamidine. After six subcultures in medium containing the same pentamidine concentration, cells were cultured in medium containing an increasing amount of pentamidine. These cells were subjected to stepwise increasing drug pressure until cell line resistances to 5 and 20 µM pentamidine were established respectively. Cells were then cloned and pentamidine susceptibility of the clones was determined. Two clones selected for further studies (designated LmR5CL2 and LmR20CL1) were then cultured in RPMI 20% FCS medium containing 5 or 20 µM pentamidine respectively until. Analysis of the phenotypes and of the transmission of the pentamidine resistance was performed after the stabilization of the chemoresistance of both resistant clones. This was monitored by an unchange IC₅₀ value after different time of culture under drug pressure.

In vitro developmental sequence of *L. mexicana* in axenic conditions. Transformation experiments were initiated with 2x10⁶ parasites/ml. Metacyclic promastigotes of *L. mexicana* were transformed to axenically growing amastigotes by three subpassages in the MAA/20 medium, pH 6.5 (Lemesre et al, 1997, in press; Sereno and Lemesre, in press; Lemesre, patent PCT/FR N°94/00577), raising the temperature to 32 +/- 1°C. The differentiation of late-log phase axenic amastigotes into promastigotes was achieved by using promastigote culture conditions as described above. The morphological aspect of parasites was determined by microscopic examination after Giemsa staining. Results were expressed as a mean value of the percentage of differentiation.

Viability test. To estimate the IC₅₀ values, the MTT (3-[4.5-dimethylthiazol-2-yl]-2.5-diphenyl-tetrazolium bromide) micromethod yet described (Sereno and Lemesre, in press) was used. Briefly, axenically-grown amastigote or promastigote forms, from late-log phase of

growth, were seeded in 96-well flat-bottom microtrays (Nunc) at 2×10^5 parasites/well in a volume of 100 μ l in adequate culture conditions. Drugs were added at tenth of the final concentration in a volume of 10 μ l in triplicate (range depending on the drug). After a 72 hour incubation, 10 μ l 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 addition of 100 μ l 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. Two or more independent experiments in triplicate were performed for the determination of each drug sensitivity. Activity of the drug alone in reagent were determined and no substantial interaction was found. Results were analyzed using the mathematical model described by Hills (1986).

Parasite-macrophage interaction. Survival of cultured *L. mexicana* promastigotes in normal resident macrophages was performed as previously described (Kweider et al, 1989). In order to obtain promastigotes derived from intramacrophagic amastigotes the following method was used. Stationary phase promastigotes (6-7 days old) were added to the wells containing adherent macrophages at a ratio of 10 promastigotes/macrophage and incubated at 37°C in 5% CO₂. An hour later, all the wells were washed gently to remove the non-adherent promastigotes and wells were incubated for 48 hours. Wells were washed with RPMI1640 (Gibco) and then 250 μ l of fresh medium containing 0.1% of SDS were added to each wells. Plates were incubated 30 minutes at 37°C, then 250 μ l of fresh medium without SDS was added to the wells and further incubated in promastigote culture conditions for four days. Promastigote forms derived from intramacrophagic amastigote were then subcultured in 25 cm² flasks and IC₅₀ values for pentamidine were ascertained.

Statistical analysis. Statistical significance (*P<0.05, **P<0.005, ***P<0.001) was analyzed by student's *t*-test. At least three experiments in triplicate were performed.

Results

Phenotype of the pentamidine-resistant clones. Using the experimental procedure, resistance indexes (IR represents the IC_{50} value after drug pressure/ IC_{50} value before drug pressure) of 23 for LmR5CL2 and 74 for LmR20CL1 were determined after drug selection (Table 1). During the drug resistance acquisition and to a lesser extent after drug resistance stabilization (obtained by 10 and 17 subcultures under drug pressure after the cloning of LmR5CL2 and LmR20CL1 respectively) the parasite growth rates and the final cell densities were reduced as a function of the level of pentamidine resistance (Table 1). Stability of the pentamidine resistance in absence of drug pressure was also different between the two resistant clones. For LmR20CL1, the IC_{50} value decreased rapidly during the first 6 subcultures and then showed a stable IC_{50} superior to 20 μ M pentamidine (Figure 1). By contrast LmR5CL2 showed a slight gradual decrease of the IC_{50} value during the time course of the experiment. However, after 2 months of culture without drug pressure, LmR5CL2 and LmR20CL1 expressed IC_{50} values superior to 5 and 20 μ M respectively. They could be considered as still resistant (Figure 1).

As shown in Table 2 and in Figure 2, both resistant clones expressed a strong cross-resistance to diminazene aceturate (a molecule structurally analogous to pentamidine) and to methotrexate (MTX). LmR20CL1 was also cross-resistant to sodium arsenite (a metalloid) unlike LmR5CL2 (Table 2). For primaquine, mycophenolic acid, vimblastine, and amphotericin B (a drug in clinical use) no significant cross-reactivity was noticed. Interestingly, both resistant clones seemed to be more susceptible to Pentostam® (a pentavalent antimonial in clinical use) and antimonyl tartrate trihydrate (a trivalent antimonial) than the wild-type one (Table 2).

Verapamil, a calcium channel blocker known to reverse multidrug resistance (Safa et al, 1987; Bitonti et al, 1988), increased significantly the pentamidine susceptibility of LmR5CL2 and LmR20CL1 in a dose-dependent manner. At 20 μ M verapamil, the chemoresistance was reversed by about 66% and 87% respectively (Figure 3). This concentration was determined to be not toxic for parasites (data not shown).

Transmission and modulation of the pentamidine resistance during developmental life cycle. Both resistant clones like the wild-type one were as infectious as the wild-type one for mouse peritoneal macrophages. They could enter, survive and multiply within macrophages (unshown results). Promastigote forms of LmR20CL1 derived from intramacrophagic amastigotes expressed an IR value of about 2.5 and an IC_{50} value close to the wild-type one (Table 3). They could be considered as revertant cells. Those of LmR5CL2 with an IR value of about 21 and an IC_{50} value superior to 15 μ M were still pentamidine-resistant (Table 3).

Resistant and wild-type promastigote clones could readily be differentiated into axenic amastigotes in the absence of pentamidine. No significant differences in the rate of differentiation were noticed between the wild-type and the resistant clones. At 24 hours more than 80% of the parasite population was differentiated into amastigote forms, after 48 hours the differentiation was complete. Moreover, like the wild-type one, the resulting amastigote forms of both resistant-

clones were able to proliferate in amastigote culture conditions without compromising parasite growth rates. Both drug resistant promastigote forms could be differentiated into amastigote forms in presence of 5 μM and 20 μM pentamidine respectively. But resulting amastigotes of LmR20CL1 were unable to proliferate in the presence of 20 μM pentamidine unlike LmR5CL2 in presence of 5 μM (data not shown).

The resulting axenically-grown amastigotes of LmR20CL1 expressed a decrease in their IC_{50} value of about 73%. The IR value was about 2.5 showing a decrease in the pentamidine resistance of this clone (Table 3). Promastigote forms of LmR20CL1, stemmed from axenically-grown amastigotes showed a decrease in their IC_{50} value of about 90% as compared to the original population of pentamidine-resistant promastigotes. With an IR of 7, they could not still be considered as resistant to a concentration of 20 μM pentamidine and expressed a pentamidine susceptibility close to the wild-type one (Table 3). When an other *in vitro* cycle of differentiation was performed the resulting promastigotes expressed an IC_{50} value of $4.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ and an IR of 3.8 confirming the loss of the chemoresistant phenotype during developmental life cycle of the parasite. The resulting axenically-grown amastigotes of LmR5CL2 expressed a decrease in their IC_{50} value of 43%. The IR value was about 1.7 showing a decrease in the pentamidine resistance of this clone (Table 3). Promastigote forms of LmR5CL2 stemmed from axenically-grown amastigote forms showed approximately the same IC_{50} value when compared with the IC_{50} value of their corresponding amastigote forms. Unlike LmR20CL1, the promastigote-amastigote-promastigote transformation did not induce a decrease in the pentamidine resistance of LmR5CL1. The resulting promastigote forms with an IC_{50} superior to 13 μM and an IR of 11 could still be considered as resistant to a concentration of 5 μM pentamidine. Moreover, when compared with the IR of their corresponding amastigote forms, the pentamidine resistance seemed to be restored.

Discussion

The incidence of leishmaniasis refractory to chemotherapy is becoming an increasingly important problem (Grögl et al, 1992; Bryceson et al, 1985). The molecular basis of this phenomenon is still unknown. Amphotericin B and pentamidine are the drugs generally used to treat cases unresponsive to pentavalent chemotherapy. Most publications on *Leishmania* drug-resistance deal with molecules having specific targets or which are not used to treat leishmaniasis (Ouellette and Papadopolou, 1993; Kink and Chang, 1987; Detke et al, 1989). The main molecular mechanisms involved in drug resistance are changes in the membrane properties, resulting in decreased influx or increased efflux of the molecule, and quantitative or qualitative modifications of the target (Coons et al, 1990; Endicott and Ling, 1989; Flintoff and Essani, 1980, Katakura et al, 1991). Moreover the manner by which human leishmaniasis becomes insensitive to clinically used compounds, and how the chemoresistance is transmitted to the different parasite stages, have not been defined. In order to develop a system to analyze mechanisms and potential transmission of pentamidine unresponsiveness, two pentamidine-resistant clones (LmR5CL2 and LmR20CL1) have been generated *in vitro* from a parental wild-type of *L. mexicana*.

The parasite growth rate and the final cell density were reduced depending on the level of pentamidine resistance. Both resistant clones expressed a high cross-resistance to diminazene aceturate and methotrexate, the most resistant clone expressing also a cross-resistance to sodium arsenite. The two clones were as susceptible as the wild-type one to a spectrum of other antiparasitic drugs, including, amphotericin B, primaquine, vimblastine and mycophenolic acid. According to previous works (Ouellette and Papadopolou, 1993) and results reported here, continuous drug pressure can induce a possible multiple resistance. These results have prompted us to determine the activity of verapamil on both resistant clones. We showed that the pentamidine resistance is significantly reversed by this compound, whatever the clone studied. However, both resistant clones like the wild-type one did not show immunoreactivity neither to the monoclonal antibody C219 nor to the JSB1 (Unpublished results). Both antibodies were directed against highly conserved, but distinct epitopes located in the cytoplasmic domain of P-glycoprotein molecule (Kartner et al, 1985; Hijazi et al, 1993). The P-glycoprotein involved in many drug resistance mechanisms in *Leishmania* (Ouellette and Papadopolou, 1993) does not seem to be involved in the pentamidine resistance of the two promastigote clones. Recently, it has been shown that promastigote forms possessed an active carrier involved in the pentamidine uptake (Basselin et al, 1996). A decrease in the influx of pentamidine throughout this carrier could be involved in the drug resistance mechanism.

Pentamidine resistance did not affect *in vitro* the differentiation of metacyclic promastigotes into amastigotes. However when LmR20CL1 was allowed to differentiate in the presence of pentamidine, resulting amastigotes could not proliferate. This suggests a higher drug susceptibility of parasites during the transformation process. During parasitic life cycle major differences in the transmission of the drug resistance were observed. Particular attention should

be given to the fact that after differentiation of the promastigote stage into amastigotes, or vice versa, the drug resistant phenotype is not always conserved. Pentamidine resistance seems to be partially or totally lost during life cycle of Leishmania, depending on the pentamidine resistance level. Results obtained with in vitro differentiation in axenic culture condition were confirmed by those obtained using a macrophage model. Interestingly, LmR5CL2 which expressed a stable pentamidine phenotype during subcultures in the absence of pentamidine retained it on a lower level after a complete *in vitro* promastigote-amastigote-promastigote cycle. By contrast, LmR20CL1 which showed a rapid decreased in the IC₅₀ value during the first 6 subcultures but could be still considered as chemoresistant lost the ability to resist pentamidine after the same differentiation sequences. To clarify definitively the correlation between resistant level and the stability of resistant phenotypes it would be of interest to analyze several clones of both high and lower resistances levels.

These observations on the modulation of the chemoresistant phenotype must be confirmed by studies using the parasite stage in contact with drugs. Drug pressure directly on axenically-cultured amastigote forms in order to obtain viable pentamidine-resistant variants was actually in progress. This modulation of the chemoresistance might be significant in the transmission of drug resistant strains of Leishmania by phlebotominae. The knowing of these elementary questions of conservation or modulation of the chemoresistance phenotype during parasite life cycle could have a great impact on the epidemiology of the Leishmania chemoresistance in the field.

Acknowledgements

This work was supported by grants from INSERM-CNAM (921303) and from the ORSTOM institute. We thank J. L. Chevrollier for revising the language of the manuscript.

References

- Basselin M. Lawrence F. Robert-Gero M (1996) Pentamidine uptake in Leishmania donovani and Leishmania amazonensis promastigote and axenic amastigotes. *Biochem. J.* 315: 631-634.
- Bates PA (1993) Axenic culture of Leishmania amastigotes. *Parasitol. Today.* 9: 143-146.
- Bates PA. Robertson CD. Tetley L. Coombs GH (1992) Axenic cultivation and characterization of Leishmania mexicana amastigote-like forms. *Parasitol.* 105: 193-202.
- Bitonti AJ. Sjoerdsma A. McCann PP. Kyle DE. Oduola AMJ. Rossan RN. Milhous WK. Davidson DE (1988) Reversal of chloroquine resistance in malaria parasite Plasmodium falciparum by desipramine. *Science.* 242: 1301-1303.
- Bryceson AD. Chulay JD. Mugambi M. Were JB. Gachichi G. Chungu CN. Muigai JB. Bhatt SM. Ho M. Spencer HC. Meme J. Anabwani G (1985) Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. II. Response to high dosage sodium stibogluconate or prolonged treatment with Pentamidine. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med & Hyg.* 79: 705-714.
- Chulay JD. Bhatt SM. Muigai R. Ho M. Gachihi G. Were JB. Chungu C. Bryceson ADM (1983) A comparison of three dosage regimens of sodium stibogluconate in the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *J. Inf. Dis.* 148: 148-155.
- Coons T. Hanson S. Bitonti AJ. Mc Cann PP. Ullman B (1990) Difluoromethyl ornithine resistance in Leishmania donovani is associated with increased ornithine decarboxylase activity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 39: 77-90.
- Detke S. Katakura K. Chang KP (1989) DNA amplification in arsenite-resistant Leishmania. *Exp. Cell. Res.* 180: 161-170.
- Endicott JA. Ling V (1989) The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. *Ann. Rev. Microbiol.* 58: 137-171.
- Flintoff WF. Essani K (1980) Methotrexate-resistant chinese hamster ovary cells contain a dihydrofolate reductase with an altered affinity for methotrexate. *Biochemistry.* 19: 4321-4327.
- Grögl M. Thomason TN. Franke E (1992) Drug resistance in leishmaniasis: it's implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am. J. Trop. Med & Hyg.* 47: 117-126.

Hijazi YM. Anxiotis CA. Navarro S. Steinberg SM. Horowitz ME. Tsokos M (1993) Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in Ewing's Sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors before and after chemotherapy. *Anat. Pathol.* 102:61-67.

Hills M. Hudson C. Smith PG (1986) Global monitoring of the resistance of malarial parasites to drugs: statistical treatment of micro-test data. Working paper No. 2.8.5 for the informal consultation on the epidemiology of drug resistance of malaria parasites, Geneva.

Kartner N. Evernden-Porelle D. Bradley G. Ling V (1985) Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature.* 316: 820-823.

Katakura K. Peng Y. Pithawalla R. Detke S. Chang KP (1991) Tunicamycin-resistant variants from five species of Leishmania contain amplified DNA in extrachromosomal circles of different sizes with a transcriptionally active homologous region. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44: 233-244.

Kweider MK. Lemesre JL. Santoro F. Kusnierz JP. Sadigursky M. Capron A (1989) Development of metacyclic Leishmania promastigotes is associated with the increasing expression of GP65, the major surface antigen. *Parasite. Immunol.* 11: 197-209.

Kink JA. Chang KP (1987) Tunicamycin-resistant Leishmania mexicana amazonensis: Expression of virulence associated with an increased activity of N-acetylglucosaminyltransferase and amplification of its presumptive gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 84: 1253-1257.

Lemesre JL. Blanc MP. Grebaut P. Zilberfab V. Carriere V (1994) Culture continue des formes amastigotes de leishmanies en condition axénique. Réalisation du cycle évolutif in vitro. *Méd. Armées.* 22: 99.

Lemesre JL. Sereno D. Daulouéde S. Veyret B. Brajon N. Vincendeau P (1997) Leishmania spp.: Nitric Oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically-grown amastigote forms. *Exp. Parasitol.* in press.

Ouellette M. Papadopoulou B (1993) Mechanisms of drug resistance in Leishmania. *Parasitol. Today.* 9: 150-153.

Phelouzat MA. Laurence F. Robert-Gero M. 1993. Characterization of sinefungin-resistant Leishmania donovani promastigotes. *Parasitol. Res.* 79: 683-689.

Safa ARC. Glover JL. Sewell MB. Meyers MB. Biedler JL. Felsted RL (1987) Identification of the multidrug resistance related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers. *J. Biol. Chem.* 262: 7884-7888.

Sereno D. Lemesre JL (1997) Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of Leishmania amazonensis in vitro. Parasitol. Res. in press.

Legends to the figures

Figure 1. Pentamidine susceptibility of LmR5CL2 and LmR20CL1 after different times of culture without drug pressure. The first point represent the IC₅₀ value of the pentamidine-resistant clones after more than 120 days of culture with 5 and 20 μ M pentamidine respectively. Each point represents the value of one experiment in triplicate.

Figure 2. Sensitivity of LmWTCL3, LmR5CL2 and LmR20CL1 to growth inhibition by methotrexate (MTX). The effect of increasing concentrations of MTX was determined after 96 hours incubation with drug. Each point represent the mean value of three independent experiments in triplicate.

Figure 3. Dose dependent activity of verapamil on pentamidine susceptibility of the two resistant clones and on the wild-type one. Results represent mean values of three independent experiments in triplicate.

Legends to the tables

Table 1. Growth parameters of LmWTCL3, LmR5CL2 and LmR20CL1. Parasites were seeded at two cell concentrations. The SDs were between 5% to 10% of the mean value.

Table 2. Comparative effects of growth inhibitory agents on wild-type and pentamidine-resistant Leishmania mexicana clones. The effective concentrations of antiparasitic drugs, cytotoxic agents and metals ions that inhibit the growth of wild-type (LmWTCL3), LmR5CL2 and LmR20CL1 cells by 50% were determined as described under Materials and Methods.

ND: Not determined.

(a) Value of one experiment in triplicate.

IR: Index of resistance: IC_{50} value before drug pressure/ IC_{50} value after drug pressure.

Table 3. Transmission of the pentamidine resistance during life cycle of L. mexicana. The effective concentration of pentamidine (μ M) that inhibits the growth of parasite by 50% was determined as described under Materials and Methods.

(a) Axenically-grown amastigotes stemmed from promastigote forms after in vitro differentiation of parasites.

(b) Promastigote forms derived from axenically-grown amastigotes.

(c) Promastigote forms stemmed from intramacrophagic amastigote forms obtained as described under Materials and Methods.

IR: Index of resistance: IC_{50} value before drug pressure/ IC_{50} value after drug pressure.

Table 1

	LmWTCL3		LmR5CL2		LmR20CL1	
Initial inoculum x10 ⁶ (Parasites/ml)	2	4	2	4	2	4
Doubling time (Hours)	26	22.5	60	31	62	45
Total cell yields x10 ⁶ (Parasites/ml)	45	41.5	35.5	35	16	27.5

Table 2

	LmWTCL3		LmR5CL2		LmR20CL1	
	IR	IC ₅₀	IR	IC ₅₀	IR	IC ₅₀
Pentamidine μM	1	1.1 +/- 0.1	23	24.2 +/- 3.1***	74	77.1 +/- 1.5***
Diminazene aceturate μM	1	10.3 +/- 3.9	5	57.1 +/- 10.9***	29	290.0 +/- 60.0***
Sodium arsenite μM	1	7.0 +/- 1.3	0.7	5.23 +/- 0.1	1.8	12.7 +/- 1.0***
Primaquine μM	1	54.7 +/- 3.8	1.2	63.9 +/- 3.6	1	56.4 +/- 4.6
Pentostam® μg/ml	1	470 +/- 50	0.7	345 (a)	0.6	285 (a)
Mycophenolic acid μM	1	16.1 +/- 5.2	ND	ND	0.6	10.4 +/- 4.3
Vimblastine μM	1	40.3 +/- 12.9	1.8	74.7 +/- 16.8	1.2	49.5 +/- 5.8
Amphotericin B μM	1	0.21 +/- 0.03	ND	ND	0.7	0.15 +/- 0.07
Potassium antimonyl tartrate trihydrate μg/ml	1	32.6 +/- 4.2	0.6	20.7 (a)	0.7	25.1 (a)

Table 3

Developmental life cycle

	----->							
	Promastigote		Axenic ama (a)		Axenic-Pro (b)		IntraMacro-Pro (c)	
	IR	IC ₅₀ μ M	IR	IC ₅₀ μ M	IR	IC ₅₀ μ M	IR	IC ₅₀ μ M
LmWTCL3	1	1.1 +/- 0.1	1	7.9 +/- 1.6	1	1.1 +/- 0.1	1	0.7 +/- 0.1
LmR5CL2	23	24.1 +/- 3.1	1.7	13.8 +/- 2.9	11	13.1 +/- 1.4	21	15.3 +/- 3.1
LmR20CL1	74	77.1 +/- 1.6	2.5	20.2 +/- 6.1	7	7.7 +/- 0.2	2	1.7 +/- 0.1

Figure 1

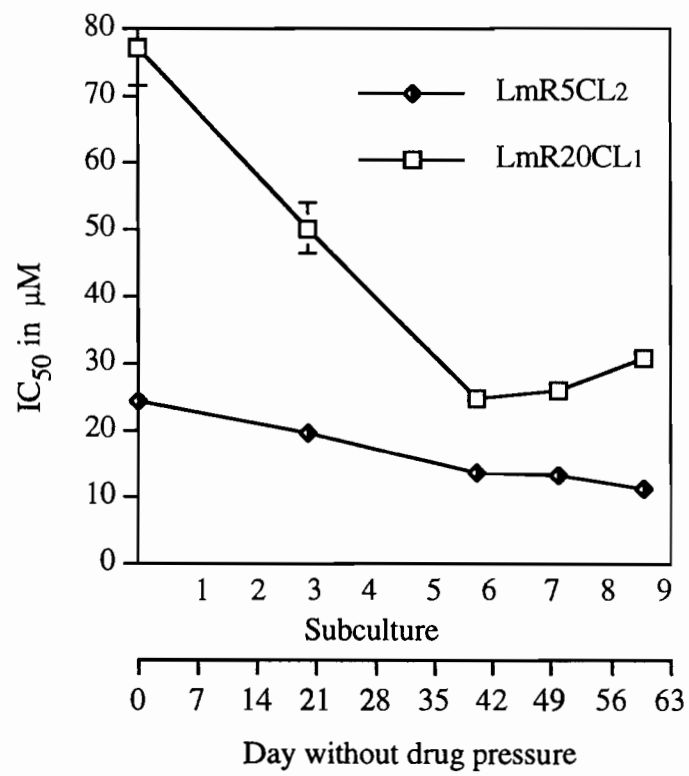


Figure 2

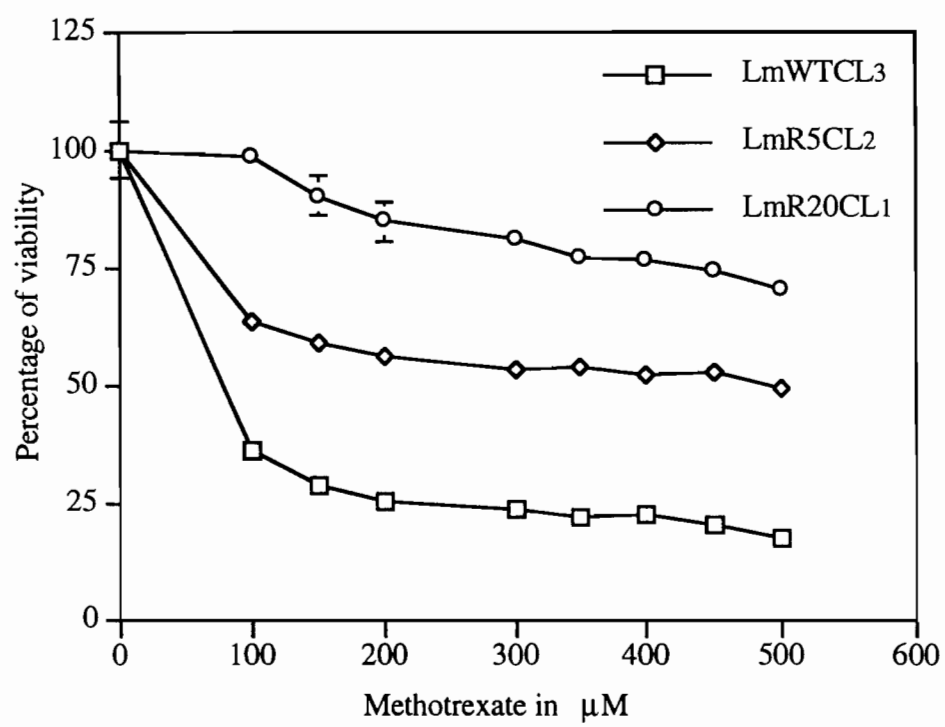
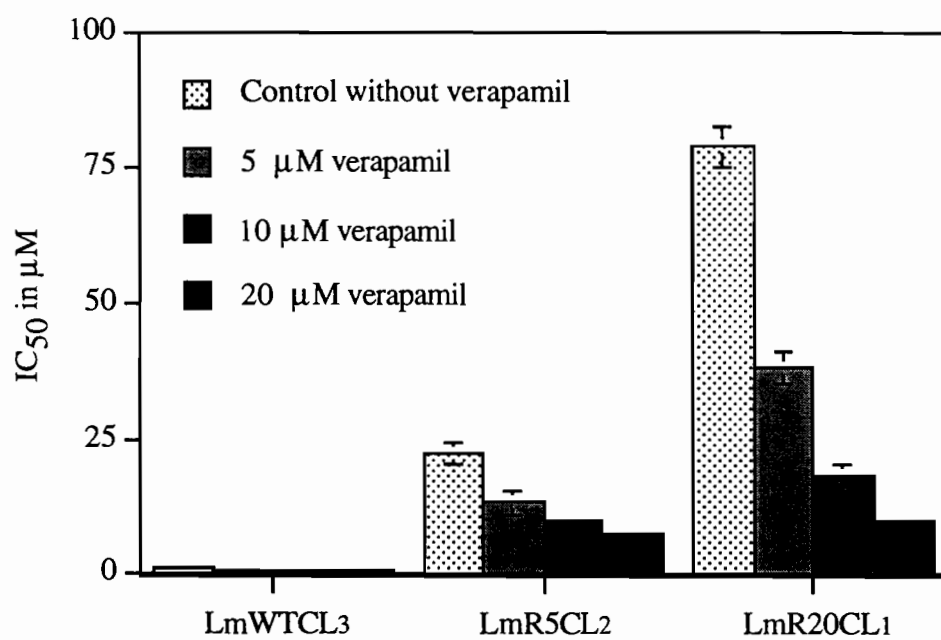


Figure 3



Sélection de variants amastigotes chimiorésistants à la pentamidine: caractérisation et modulation de la transmission au cours du cycle de développement parasitaire. (Soumis pour publication, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*)

L'étude précédente nous montre l'intérêt d'étudier la transmission de caractères chimiorésistants au cours du cycle évolutif des parasites. Cependant *in vivo* chez l'hôte vertébré, le stade amastigote est l'unique stade parasitaire pouvant potentiellement être soumis à une pression de sélection lors d'une thérapie. Dans cet article nous présentons les résultats obtenus concernant la caractérisation des formes amastigotes chimiorésistantes de *L. mexicana* et la transmission de ce phénotype au cours du cycle de développement parasitaire.

Principaux résultats

- 1) Nous avons induit une chimiorésistance à la pentamidine par pression médicamenteuse continue directement sur les formes amastigotes de *L. mexicana*. Deux variants chimiorésistants à 5 et 20 μ M de pentamidine (nommés LmPENT5 et LmPENT20 respectivement) ont été obtenus. Ces variants présentent des indices de résistance respectifs de 2 et 6.
- 2) La souche sauvage et les variants résistants présentent les caractéristiques ultrastructurales des formes amastigotes. Toutes deux possèdent des mégasomes et ne présentent pas de "paraxial rod", ni de flagelle apparent.
- 3) Les deux mutants présentent différents degrés de résistance croisée au diminazène acéturate et à la primaquine. Aucune résistance croisée au sodium arsénite n'a été mise en évidence. Le vérapamil quant à lui n'a aucun effet sur la chimiorésistance; ceci suggère que la famille des P-glycoprotéines n'est pas impliquée dans le mécanisme de résistance.
- 4) Les formes amastigotes de LmPENT20 conservent leur caractère chimiorésistant après six mois de culture *in vitro*, en l'absence de pression médicamenteuse. Celles de LmPENT5 révèlent une CI₅₀ stable pendant le premier mois de culture dans les mêmes conditions. Cette valeur diminue ensuite progressivement jusqu'à atteindre celle de la souche sauvage, après 6 mois de repiquage. Nous démontrons ainsi que la stabilité de la résistance à la pentamidine varie en fonction du degré de chimiorésistance induite chez les formes amastigotes.

5) L'addition de pentamidine dans le milieu de culture inhibe la différenciation des formes amastigotes sauvages et résistantes en promastigotes correspondants. En l'absence de pentamidine, la différenciation des variants chimiorésistants de LmPENT20 présente un retard de 24 heures par rapport à la souche sauvage. Ces résultats suggèrent que le mécanisme responsable de la chimiorésistance soit aussi impliqué dans celui intervenant dans le processus de différenciation des parasites.

6) Pour la première fois, nous avons pu suivre la transmission de la chimiorésistance à la pentamidine, induite initialement sur la forme amastigote, au cours du cycle de développement parasitaire. La chimiorésistance de LmPENT20 est conservée lors de la différenciation des parasites, ce qui n'est pas le cas pour le phénotype le plus faiblement résistant (LmPENT5). Le même phénomène de modulation est observé lorsque des amastigotes issus de macrophages sont différenciés en formes promastigotes et vice versa.

8) Ainsi, la résistance à la pentamidine, des formes amastigotes, semble être modulée au cours du cycle évolutif et serait dépendante du niveau de chimiorésistance. Ces résultats mettent l'accent sur le problème des thérapies mal conduites, pouvant induire un fort degré de chimiorésistance et donc avoir des répercussions dramatiques sur la propagation de telles souches dans la nature.

***In vitro* Life Cycle of Pentamidine-Resistant Amastigotes: Stability of the chemoresistant phenotypes is dependent on the level of resistance induced**

Denis SERENO and Jean loup LEMESRE*

Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies à Vecteur, Unité de Biologie Parasitaire. ORSTOM, Montpellier, France.

Running title: *In vitro* life cycle of pentamidine-resistant amastigotes.

Key words: *Leishmania mexicana*, amastigote, *in vitro* life cycle, drug resistance, pentamidine.

*Corresponding author. Mailing address: Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies à Vecteur, Unité de Biologie Parasitaire, ORSTOM, 911 Av. Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France. Fax: 04 67 54 78 00. Phone: 04 67 41 61 67. Email: Lemesre@melusine.mpl.orstom.fr

Abstract

Using a continuous drug pressure protocol, we have induced pentamidine resistance on an active and dividing population of amastigote forms of *Leishmania mexicana*. We selected *in vitro* two clones with different levels of resistance against pentamidine, LmPENT5 being resistant to 5 μ M while the clone LmPENT20 resistant to 20 μ M pentamidine. Resistance indexes (IC_{50} value after drug pressure/ IC_{50} value before drug pressure) of 2 (LmPENT5) and 6 (LmPENT20) were determined after drug selection respectively. Both resistant clones expressed a significant cross-resistance towards diminazene aceturate and primaquine. Pentamidine resistance was not reversed by verapamil, a calcium channel blocker known to reverse multidrug resistance (6, 27). There was no difference observed between wild-type (LmWT) and pentamidine-resistant clones in the *in vitro* infectivity for resident mouse macrophages. During *in vitro* infectivity experiments, when the life cycle was performed starting from intramacrophagic amastigotes, drug resistance of the resulting LmPENT20 amastigotes was preserved even if intermediate promastigote stage could not be considered as resistant to 20 μ M pentamidine. In the same way, when a complete developmental sequence of *L. mexicana* was achieved axenically by manipulation of appropriate culture conditions, the resulting axenically-grown LmPENT20 amastigotes remained pentamidine-resistant whereas LmPENT5 amastigotes lost its ability to resist pentamidine, expressing IC_{50} and IR values close to those of the LmWT clone. These results strongly indicate that the level of pentamidine tolerated by resistant amastigotes after life cycle was dependent on the induced-level of resistance. This fact could be significant in the *in vivo* transmission of drug-resistant parasites by *Phlebotominae*. Particular attention should be given to the finding that the emergence of parasite resistance is a potential risk of inadequate dose therapy in man.

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 are rapidly transformed in 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 in 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 the treatment of patients coinfecting with AIDS and *Leishmania spp.* is often noticed (25). There is now strong indication that treatment failure may be partly due to parasite drug resistance (13). The development of drug resistant cells lines *in vitro* has greatly facilitated studies on the molecular basis of chemoresistance. The main molecular mechanisms involved in drug resistance are changes in membrane permeability, resulting in decreased influx or increased efflux of the molecule (11) and/or quantitative or qualitative modifications of the target (10, 12, 23). These studies have been mainly carried out with the promastigote form which is not the parasite stage naturally in contact with drugs in patients. Beside this, little informations are available on the chemoresistance of amastigote organisms. Moreover, till now there is no study on the possible transmission of the drug-resistant phenotypes of amastigotes during developmental life cycle of the parasites. These basic studies could have great impact on the understanding of the propagation of chemoresistant parasites in the field.

We and other investigators have previously shown that axenically-grown amastigotes of different *Leishmania* species clearly resembled to intracellular amastigotes with regard to their ultrastructural, biological, biochemical and immunological properties (2, 3, 4, 22). Moreover, characterized extracellular amastigotes, such as intracellular ones, differed from promastigotes in having a variety of biochemical characteristics, including proteinase, ribonuclease, adenine deaminase, peroxylase, glucose catabolism, nucleic acid synthesis, dehydrogenase activities, nitric oxide and drug susceptibilities (8, 15, 21, 26, 22, 28). In order to obtain a system in which potential mechanisms of chemoresistance and their transmission during parasite life cycle could be studied, we have developped axenic cultures of amastigote forms of various *Leishmania* species to reproduce a complete developmental sequence by manipulation of media, pH and temperature conditions (22). In this report, pentamidine drug pressure was used to generate amastigotes exhibiting drug resistance phenotypes at two levels of chemoresistance, that were analyzed for stability of the resistance, cross-resistance and transmission of the resistance during the parasite life cycle *in vitro*. Taken together, these results demonstrate that it is possible to induce *in vitro* pentamidine resistance on the mammalian stage of *L. mexicana* and strongly suggest that the stability of the drug resistant phenotype after life cycle is dependent on the initially level of chemoresistance induced.

Materials and Methods

Drugs and reagents. Pentamidine isethionate, amphotericin B, diminazene aceturate, sodium arsenite and verapamil were supplied by SIGMA (St Louis). Primaquine was a generous gift of J Rodriguez (Bel Horizonte, Brazil).

Parasites cultures. Axenically-grown amastigote forms of *L. mexicana* (MNYC/BZ/62/M-379, Cl3) 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) in 25 cm² flasks. From a starting inoculum of 5×10^5 amastigote forms/ml, cell densities in the range of 2×10^7 to 7×10^7 parasites/ml were 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 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, aflagellate and immobile. They have morphological, biochemical and biological characteristics similar to those of *in vivo* isolated amastigote forms (22). Promastigote cultures were maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ by weekly subpassages in RPMI 1640 medium (Gibco BRL), buffered with 25 mM HEPES, 2 mM NaHCO₃, pH 7.2, supplemented with 20% heat-inactivated FCS.

Selection of pentamidine-resistant amastigote forms. Cloned wild-type amastigote forms of *L. mexicana* (designated as LmWT) were adapted to survive in medium containing about 5 μM pentamidine. The cultures were stabilized for 6 subcultures before increasing the drug level. Axenically-grown amastigotes were subjected to stepwise increasing drug pressure until cell lines resistant to 5 μM and 20 μM pentamidine (designated as LmPENT5 and LmPENT20) were established respectively. Both cell lines selected for further studies were then cultured in MAA 20% FCS medium containing 5 μM and 20 μM pentamidine respectively.

Ultrastructure of axenically-grown amastigote forms of *L. mexicana*. Amastigote forms of LmWT were fixed in 0.1 M Sorensen phosphate buffer (pH 7.2) containing 2.5% glutaraldehyde for 2 hours 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 hour at room temperature. The samples were dehydrated in ethanol and embedded in epon resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined on Phillips CM12 microscope at 100 kv.

Viability test. To estimate the IC₅₀ values, the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) micromethod previously described (28) was used. Briefly, axenically-grown amastigote or promastigote forms, from late-log phase of growth, were seeded in 96-well flat-bottom microtrays (Nunc) at 2×10^5 parasites/well in a volume of 100 μl in adequate culture conditions. Drugs were added at one tenth of the final concentration in a volume of 10 μl in triplicate (range depending on the

drug). After a 72 hours incubation, 10 ml 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 addition of 100 ml of 50% isopropanol, 10% SDS. The plates were incubated for an additional period of 30 minutes under agitation at room temperature before reading the OD value at 570 nm with a 96-well scanner. Two or more independent experiments in triplicate were performed for the determination of the sensitivity towards each drug. Activity of the drug alone in reagent was determined and no substantial interaction was found for the drug used. Results were analyzed using the mathematical model previously described (16, 29).

Complete *in vitro* developmental sequence. The complete developmental life cycle of *L. mexicana* in axenic cultures was previously described (4, 22). Briefly, amastigote forms harvested at the stationary phase of growth (6-7-day-old) were inoculated at 2×10^6 parasites/ml in RPMI 20% FCS medium at pH 7.2 and $25 \pm 1^\circ\text{C}$. After 2 subcultures, pentamidine susceptibility of resulting mid-log phase promastigotes was ascertained. Transformation of metacyclic promastigotes of *L. mexicana* into axenically growing amastigotes was initiated with 2×10^6 parasites/ml and performed in the MAA/20 medium, pH 6.5, raising the temperature to $32 \pm 1^\circ\text{C}$ (22). After three subcultures, the IC_{50} and index of resistance (IR) values of the newly transformed mid-log phase amastigotes were ascertained. The morphological aspect of parasites was determined by microscopic examination after Giemsa staining.

Parasite-macrophage interaction. Survival of cultured amastigotes of *L. mexicana* in normal resident macrophages was performed as previously described (20). In order to obtain promastigotes derived from intramacrophagic amastigotes, the following method was used. Stationary phase amastigote forms of LmPENT20 and LmWT were added to the wells containing adherent macrophages at a ratio of 10 amastigotes/macrophage in RPMI 10% FCS and incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in 5% CO_2 . After 72 hours incubation, wells were washed with RPMI1640 (Gibco) and 0.25 ml of fresh medium containing 0.1% of SDS was added to each well. Plates were incubated 30 min at 37°C , then 0.25 ml of RPMI 20% FCS medium was added to the wells and were further incubated at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ for four days. The promastigote forms derived from intramacrophagic amastigote ones were then subcultured as described above and pentamidine susceptibility was ascertained.

Statistical analysis. Statistical significance (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) was analyzed by student's *t*-test. Three or more experiments in triplicate were performed.

Results

Selection of pentamidine-resistant amastigotes. As shown in Table 1, pentamidine-resistant amastigotes of *L. mexicana* were readily obtained *in vitro*. Resistance indexes (IC_{50} value after drug pressure/ IC_{50} value before drug pressure) of 2 (LmPENT5) and 6 (LmPENT20) were determined after drug selection respectively (Table 1). The time required to induce pentamidine resistance *in vitro* varied with the degree of resistance induced, approximately less than 2 months for LmPENT5 and about 5 months for LmPENT20. During the drug resistance acquisition and also after drug resistance stabilization the amastigotes growth rates and the final cell yields were significantly reduced (data not shown).

Ultrastructure of axenically-grown amastigotes of *Leishmania mexicana*. Axenic amastigote of LmPENT20 as well as parental wild-type clone possessed general features characteristics of *Leishmania* parasites, but also features specifically found in amastigotes: a short non-emergent flagellum (Figure 1A and 1C) and the absence of paraxial rod (Figure 1B) (2, 24). They also contained megasomes (Figure 1C), the characteristic lysosomes of *L. mexicana*, which are not found in promastigotes (8, 9). Amastigotes of LmPENT20 also contained numerous lipid droplets (Figure 1C).

Cross-resistance studies. The cross-resistance profiles of the two resistant clones to other structurally related and unrelated drugs were summarized in Table 1. Both resistant clones expressed a strong cross-resistance towards diminazene aceturate and a weak one against primaquine. By contrast, the two cell lines were approximately as susceptible as the wild-type one to sodium arsenite.

As shown in Table 2, verapamil, a calcium channel blocker known to reverse multidrug resistance (6, 27) has poor and no significant effect on the susceptibility of LmPENT5 and LmPENT20 respectively. The concentrations used were not toxic for the parasites (data not shown).

Stability of the pentamidine resistance in absence of drug pressure. Before evaluating the potential transmission of the chemoresistant phenotypes during *in vitro* life cycle, the stability of the pentamidine resistance was analyzed after different periods of culture in drug-free medium. The pentamidine susceptibility of LmWT remained unaltered during the time course of the experiment. Even if LmPENT5 and LmPENT20 clones expressed IC_{50} s superior to 15 and 40 μ M pentamidine after two month of culture, the stability of the chemoresistance was then different between them (Figure 2). The IC_{50} value of LmPENT5 amastigotes gradually decreased with time and reverted to the wild-type one after 16 subcultures. By contrast, at 7 months of culture in drug free medium, clone of LmPENT20 expressed an IC_{50} value for pentamidine in the range of 30 μ M, showing a relatively stable chemoresistant phenotype (Figure 2).

Differentiation of axenically-grown amastigotes into promastigotes. As shown in Figure 3A, in absence of pentamidine when axenically-grown amastigotes were allowed to differentiate in promastigote culture conditions, about 80% of the population of LmWT were transformed into promastigotes after 24 hours. The transformation was total at 48 hours. Interestingly (in the same

experimental condition) a delay of 24 hours was observed in the differentiation of axenically-grown LmPENT20 amastigotes into promastigotes (Figure 3A).

In presence of drug, pentamidine substantially interacted in a dose dependent manner with the transformation process of LmWT (Figure 3B). Moreover, 20 μ M pentamidine dramatically enhanced the delay of differentiation of LmPENT20 amastigotes into promastigotes since, at 96 hours, only 40% of the parasite population were transformed. The complete differentiation was obtained at 120 hours (Figure 3B).

Transmission of the pentamidine resistance during *in vitro* developmental life cycle. For the first time, it was possible to follow pentamidine-resistant phenotypes during *in vitro* transformations of axenically-cultured amastigotes or those isolated from macrophages into promastigotes and then back into amastigotes. As shown in Figure 4, the pentamidine susceptibility between the two parasite stages was quite different. As it was previously described (28), the IC₅₀ value for pentamidine of the wild-type promastigotes was about 1 μ M and increased to approximately 8 μ M for the respective amastigote organisms of *L. mexicana*. The transformation experiments were performed in the absence of pentamidine. As summarized in Figure 4, significant differences were found between the two pentamidine-resistant amastigotes in respect the stability of the drug-resistant phenotype during developmental life cycle. When stationary phase amastigote forms of LmPENT20 were allowed to differentiate in promastigote culture conditions, the IC₅₀ value for pentamidine decreased from about 50 μ M to about 15 μ M and the resulting promastigotes could not be still considered as resistant to a concentration of 20 μ M pentamidine (Figure 4B). When these promastigote forms were transformed back into amastigotes, pentamidine resistance was restored as shown by the determination of the IC₅₀ and the IR values (Figure 4A and B). The conservation of the pentamidine resistance was confirmed, after another *in vitro* cycle of differentiation of the LmPENT20 parasites (Figure 4). The pentamidine resistance of the second cell line (LmPENT5) decreased significantly when amastigotes were differentiated into promastigotes and was lost when these promastigote forms were allowed to differentiate back into amastigotes. As shown in Figure 4A, the IR close to 1 confirmed the lost of the chemoresistant phenotype. Contrary to LmPENT20, pentamidine resistance of LmPENT5 amastigotes was not restored after one or two complete developmental sequences as compared to the original population of resistant ones (Figure 4). They could be considered as revertant cells.

Resistant amastigotes of LmPENT20 were able to enter, survive and multiply within macrophages (Data not shown). Promastigotes directly derived from intramacrophagic resistant-amastigotes showed a 7 fold reduction in the IC₅₀ value compared to axenically-grown LmPENT20 amastigotes. When they were transformed back into amastigotes the drug resistance was significantly restored as shown by the determination of the IC₅₀ and IR values (Figure 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* and to a lesser extent African sleeping sickness. For parasitic diseases, the public health is threatening, due to the low number of available drug. The incidence of leishmaniasis refractory to chemotherapy is also becoming an increasingly important problem (13). The manner by which human leishmaniasis becomes insensitive to clinically used compounds, and how the chemoresistance is transmitted by sandfly vector, have not been defined. For example the biochemical mechanisms that underlie antimonial resistance in field isolates of *Leishmania* is still unknown. The development of *in vitro* models of chemoresistance has greatly facilitated the studies on the molecular basis of drug resistance or drug insusceptibility. Unfortunately, most of the mechanisms responsible for *Leishmania* drug resistance were characterized on the promastigote forms, mainly encountered in the insect vector (10, 23, 30). The use of amastigotes, the relevant parasitic stage, have been hampered by the difficulty to obtain active and dividing population of axenically-grown amastigotes. However the design of an effective chemotherapeutic strategy for the treatment of leishmaniasis depends on the understanding of fundamental mechanisms by which amastigotes become resistant and transmit their phenotypes during parasite life cycle.

In order to study the potential mechanisms of resistance involved in the mammalian stage of the parasite and to investigate their potential transmissions during life cycle, pentamidine drug pressure directly on axenically-cultured amastigotes was performed. We report here that it is possible to induce different levels of pentamidine resistance on amastigotes of *L. mexicana*, using an appropriate drug pressure protocol. A low level of resistance (LmPENT5) was obtained in a relatively short period of selection, less than two months of drug pressure whereas induction of higher level (LmPENT20) needed longer time (about 6 months). So resistant cell lines were able to grow in presence of pentamidine levels as high as those potentially generated inside macrophages during chemotherapy in man. The plasma concentration of pentamidine was shown to be about 1 μ M to 2 μ M, depending on the number of injections (7, 31). The whole blood concentration of pentamidine was generally 2 to 3 times higher than the plasma one (7). Pentamidine is concentrated by macrophages with a concentration factor of 6 (5), thus leading to an intramacrophagic concentration of about 6 to 12 μ M pentamidine.

Both resistant amastigote clones were able to grow in long-term cultivation in presence of their respective pentamidine concentration. But acquisition of the drug resistance phenotype was associated with a lower growth rate of amastigotes, without affecting their viability. This result indicate that mechanism involved in the chemoresistant phenotype could interact with the amastigote proliferative process and could modulate the parasite propagation in the infected hosts. Both pentamidine resistant amastigote forms were cross-resistant to primaquine and to diminazene aceturate. According to previous works performed on promastigotes (23, 30) and results reported here, continuous drug pressure could induce a possible multiple resistance. The P-Glycoprotein family was shown to be involved in many mechanisms of *Leishmania* drug resistance (23, 30). However, the lack of effect of verapamil on the drug susceptibility of both resistant clones seemed to indicate that this mechanism was not responsible for the pentamidine resistance of the amastigote stage of *L. mexicana*. It has been shown that axenically-

grown amastigote forms possessed an active carrier involved in the pentamidine uptake (1). A decrease in the influx of pentamidine throughout this carrier could be responsible of the drug resistance phenotypes.

For the first time, it was possible to induce different levels of pentamidine resistance on amastigotes of *Leishmania* and to follow their chemoresistant phenotypes during the parasite developmental life cycle *in vitro*. Significant results obtained comparing the two pentamidine-resistant clones were of interest.

In the absence of pentamidine, both resistant cell lines were able to differentiate into promastigote forms. However, the differentiation rate of LmPENT20 amastigotes was substantially lower when compared to the wild-type ones. Thus, the mechanism of pentamidine resistance seemed to interact with the amastigote-promastigote transformation process of the parasite. In presence of drug, pentamidine substantially interferes in a dose dependent manner with the LmWT clone transformation process and dramatically enhanced the delay of differentiation of LmPENT20 amastigotes into promastigotes. It was yet described, using free amastigotes of *L. mexicana* isolated from macrophages, that pentamidine delayed substantially the parasite transformation process (14). This observation could be explained indirectly by the higher susceptibility towards pentamidine of the promastigotes of *L. mexicana* triggering the rapid death of this stage during amastigote-promastigote differentiation (28).

Particular attention should be given to the fact that the pentamidine resistance of both resistant and wild-type clones decreased significantly when amastigotes were differentiated into promastigotes. This finding could be significant with the difficulty to correlate the promastigote drug susceptibility with the efficacy of the treatment in human (17, 18). The procedure currently used to evaluate parasite drug resistance profile consists in the *in vitro* transformation of amastigotes isolates into promastigotes. The discrepancy in the resistance prediction could be due to a rapid loss of the chemoresistant phenotype after this differentiation process. Direct axenic cultures of amastigotes obtained from infected tissue rather than adaptation of promastigotes *in vitro*, could provide an useful model enabling the prediction of the drug resistance in leishmaniasis.

A significant difference was found between the two pentamidine-resistant clones in respect the stability of the drug-resistant phenotype after the developmental life cycle in absence of drug pressure. Interestingly, clone LmPENT20 which expressed a stable pentamidine-resistant phenotype during subcultures retained it on a same level after a complete *in vitro* amastigote-promastigote-amastigote cycle. By contrast clone LmPENT5 lost the ability to resist pentamidine after the same developmental sequence as well as after long-term cultivation. These data, confirmed with those obtained with a macrophage model, strongly support the hypothesis of a possible correlation between resistance level and the stability of the resistant phenotype. In parasitic diseases, the life cycle is essential to parasite survival and instrumental to the propagation of the disease. That's the reasons why our results are of potential importance in the understanding of the mechanisms how drug resistant of *Leishmania* is modulate during life cycle. They strongly suggest that if low resistance level could be induced in a relative short period of selection, the resulting phenotype could be probably lost during the propagation of the parasite. The induction of high drug resistance level required period of selection compatible with the treatment one. Because this phenotype was retained after life cycle, inadequate dose therapy could led to the selection of highly resistant parasites which could be transmitted from hosts to hosts without alteration of the

resistance level. So the modulation of the chemoresistance during life cycle could be significant in the transmission of drug-resistant strains of *Leishmania* by *Phlebotominae*. It could have a great impact on the epidemiology of *Leishmania* chemoresistance in the field.

Collectively, these results suggest that the emergence of parasite resistance is a potential risk of inadequate dose therapy and could explain relapses in some patients after pentamidine treatment (19, 29). Studies on the biochemical mechanisms involved in the pentamidine resistance of axenically-grown amastigote forms are actually in progress.

Acknowledgement

This work was supported by grants from INSERM-CNAM (921303) and from the ORSTOM institute. We thank J. L. Chevrollier for revising the language of the manuscript.

References

1. Basselin, M., F. Lawrence, and M. Robert-Gero. 1996. Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Biochem. J.* **315**:631-634.
2. Bates, P. A., C. D. Robertson, L. Tetley, and G. H. Coombs. 1992. Cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology.* **105**:193-202.
3. Bates, P. A. 1993. Axenic culture of *Leishmania* amastigotes. *Parasitol. Today.* **9**:143-146.
4. Bates, P. A. 1992. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology.* **108**:1-9.
5. Berman, J. D., J. V. Gallalee, and B. D. Hansen. 1987. *Leishmania mexicana* uptake of sodium stibogluconate (pentostam) and pentamidine by parasite and macrophage. *Exp. Parasitol.* **64**:127-131.
6. Bitonti, A. J., A. Sjoersdama, P. P. McCann, D. E. Kyle, A. M. J. Oduola, R. N. Rossan, W. K. Milhous, and D. E. Davidson. 1988. Reversal of chloroquine resistance in malaria parasite *Plasmodium falciparum* by desipramine. *Science.* **242**:1301-1303.
7. Bronner, U., F. Doua, O. Eericsson, L. L. Gustafsson, T. W. Miezán, M. Rais, and L. Rombo. 1991. Pentamidine concentrations in plasma, whole blood and cerebrospinal fluid during treatment of *Trypanosoma gambiense* infection in côte d'ivoire. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**:608-611.
8. 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.
9. Coombs, G. H., L. Tetley, V. A. Moss, and K. Vickerman. 1986. Three-dimensional structure of the *Leishmania* amastigote as revealed by computer-aided reconstruction from serial sections. *Parasitology.* **92**:13-23.
10. Coons, T., S. Hanson, A. J. Bitonti, P. P. McCann, and B. Ullman. 1990. Difluoromethyl ornithine resistance in *Leishmania donovani* is associated with increased ornithine decarboxylase activity. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**:77-90.
11. Endicott, J. A., and V. Ling. 1989. The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. *Ann. Rev. Microbiol.* **58**:137-171.

12. **Flintoff, W. F., and K. Essani.** 1980. Methotrexate-resistant chinese hamster ovary cells contain a dihydrofolate reductase with an altered affinity for methotrexate. *Biochemistry*. **19**:4321-4327.
13. **Grögl, M., T. N. Thomason, and E. Franke.** 1992. Drug resistance in leishmaniasis: it's implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **47**:117-126.
14. **Hart, D. T., K. Vickerman, and G. H. Coombs.** 1981. Transformation *in vitro* of *Leishmania mexicana* amastigotes to promastigotes: nutritional requirements and the effect of drugs. *Parasitology*. **83**:529-543.
15. **Hassan, H. F., and G. H. Coombs.** 1985. *Leishmania mexicana*, purine metabolizing enzymes of amastigotes and promastigotes. *Exp. Parasitol.* **59**:15-28.
16. **Hills, M., C. Hudson, and P. G. Smith.** 1986. Global monitoring of the resistance of malarial parasites to drugs: statistical treatment of micro-test data. Working paper N°. 2.8.5 for the informal consultation on the epidemiology of drug resistance of *malaria* parasites, Geneva.
17. **Jackson, J. E., J. D. Tally, and D. B. Tang.** 1989. An *in vitro* micromethod for drug sensitivity testing of *Leishmania*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **41**:318-330.
18. **Jackson, J. E., J. D. Tally, W. Y. Ellis, Y. B. Mebrahtu, P. G. Lawyer, J. B. Were, S. G. Reed, D. M. Panisko, and B. L. Limmer.** 1990. Quantitative *in vitro* drug potency and drug susceptibility evaluation of *Leishmania* spp. from patients unresponsive to pentavalent antimony therapy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **43**:464-480.
19. **Jha, S. N., N. K. P. Singh, and T. K. Jha.** 1992. Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonials. *J. Assoc. Physicians. India.* **46**:296-306.
20. **Kweider, M. K., J. L. Lemesre, F. Santoro, J. P. Kusnierz, M. Sadigursky, and A. Capron.** 1989. Development of metacyclic *Leishmania* promastigotes is associated with the increasing expression of GP65, the major surface antigen. *Parasite. Immunol.* **11**:197-209.
21. **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.*, in press.
22. **Lemesre, J. L.** May 1994. French Patent pCT/FR 94/00577.

23. Ouellette, M., and B. Papadopolou. 1993. Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. Parasitol. Today. 9:150-153.
24. Pan, A. A., and S. C. PAN. 1986. *Leishmania mexicana*: comparative fine structure of amastigotes and promastigotes *in vitro* and *in vivo*. Exp. Parasitol. 62:254-265.
25. 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 feature and response to therapy. Quat. J. Med. 77:1101-1111.
26. Rainey, P.M., T. W. Spithill, D. McMahon-Pratt, and A. A. Pan. 1991. Biochemical and molecular characterization of *Leishmania pifanoi* amastigotes in continuous axenic culture. Mol. Biochem. Parasitol. 49:111-118.
27. Safa, A. R. C., J. L. Glover, M. B. Sewell, M. B. Meyers, J. L. Biedler, and R. L. Felsted. 1987. Identification of the multidrug resistance related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers. J. Biol. Chem. 262:7884-7888.
28. 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.
29. Sundar, S., B. B. Thakur, A. K. Tandon, N. R. Agrawal, C. P. Mishra, T. M. Mahapatra, and V. P. Singh. 1994. Clinicoepidemiological study of drug resistance in Indian kala-azar. B. M. J. 308:307.
30. Ullman, B. 1995. Multidrug resistance and P-glycoproteins in parasitic *protozoa*. J. Bioenergetic. Biomembranes. 27:77-84.
31. Waalkes, T. P., and V. T. Devita. 1970. The determination of pentamidine (4-4'-diaminodiphenoxypentane) in plasma, urine and tissues. J. Lab. Clin. Med. 75:871-878.

Legends to the Tables

Table 1: Relative drug-resistance to pentamidine (PENT) and cross-resistance towards Diminazene aceturate (DIM), Primaquine (PQ) and sodium arsenite of the wild-type (LmWT) and the drug-resistant (LmPENT5 and LmPENT20) axenically-grown amastigotes of *L. mexicana*.

Table 2: Activity of verapamil on pentamidine susceptibility of both resistant amastigotes and of the wild-type ones of *L. mexicana*.

ND: not determined.

Legends to the figures

Figure 1: Ultrastructure of axenically-grown amastigote forms of LmWT and LmPENT20 of *L. mexicana* harvested from 7 day old culture (stationary phase). (A) flagellum (fg) of LmWT amastigotes confined within reservoir, megasomes (m) x 58,000. (B) transverse section of LmWT, no paraxial rod is present, subpellicular microtubules (mt) x 28,000. (C) Amastigote of LmPENT20, note the flagellum confined within reservoir (fg), lipid droplets (l), and the presence of megasomes (m) x 14,900.

Figure 2: Stability of the IC₅₀ value for pentamidine of both *L. mexicana* pentamidine resistant amastigotes (LmPENT5 and LmPENT20) and of the wild-type one (LmWT). Parasites were cultured in drug free medium for different periods. Each point represents the mean IC₅₀ values of one independent experiment in triplicate.

Figure 3: Differentiation of wild-type (LmWT) and pentamidine-resistant axenically-grown amastigote forms (LmPENT20) into promastigote ones, in the absence of pentamidine (A) and in presence of different pentamidine concentrations (B). Parasites were stained with Giemsa. Differentiation was monitored by counting 300 cells for each points. Results were expressed as a mean value of promastigotes percentages.

Figure 4: Variations of the IR values (A) and IC₅₀ values (B) of the two resistant *L. mexicana* clones (LmPENT5 and LmPENT20) and of the wild-type one (LmWT) during *in vitro* life cycle. Parasites were allowed to differentiate in appropriate culture conditions without drug pressure. After three subcultures, pentamidine resistance of the newly transformed parasites was ascertained. Each point represents the mean value of at least three independent experiments in triplicate.

§ LmPENT20 stemmed from intramacrophagic amastigotes.

£ index of resistance: IC₅₀ of the wild type/IC₅₀ of the resistant cell line

Table 1

Drugs	IC ₅₀ (μM) mean +/- SD (n=3)			Relative drug resistance (IR)	
	LmWT	LmPENT5	LmPENT20	LmPENT5	LmPENT20
PENT	7.9 +/- 1.6	16.4 +/- 2.5	48.7 +/- 5.9	2	6
DIM	6.8 +/- 0.5	12.1 +/- 0.9	25.4 +/- 2.9	1.8	3.7
PQ	22.2 +/- 2.0	58.8 +/- 5.1	48.9 +/- 4.2	2.6	2.2
Sodium Arsenite	6.2 +/- 1.4	5.3 +/- 1.5	9.5 +/- 2.2	0.8	1.5

Table 2

	IC ₅₀ (μM) mean +/- SD (n=3)			Relative drug resistance (IR)	
	LmWT	LmPENT5	LmPENT20	LmPENT5	LmPENT20
Verapamil (μM)					
0	7.9 +/- 1.6	16.4 +/- 2.5	48.7 +/- 5.9	2	6
5	7.4 +/- 1.6	16.2 +/- 2.1	43.4 +/- 1.7	2.2	6
10	7.1 +/-1.1	17.6 +/- 2.1	ND	2.5	ND
20	6.7 +/- 1.1	16.4 +/- 3.2	40.3 +/-5.9	2.4	6

Figure 1

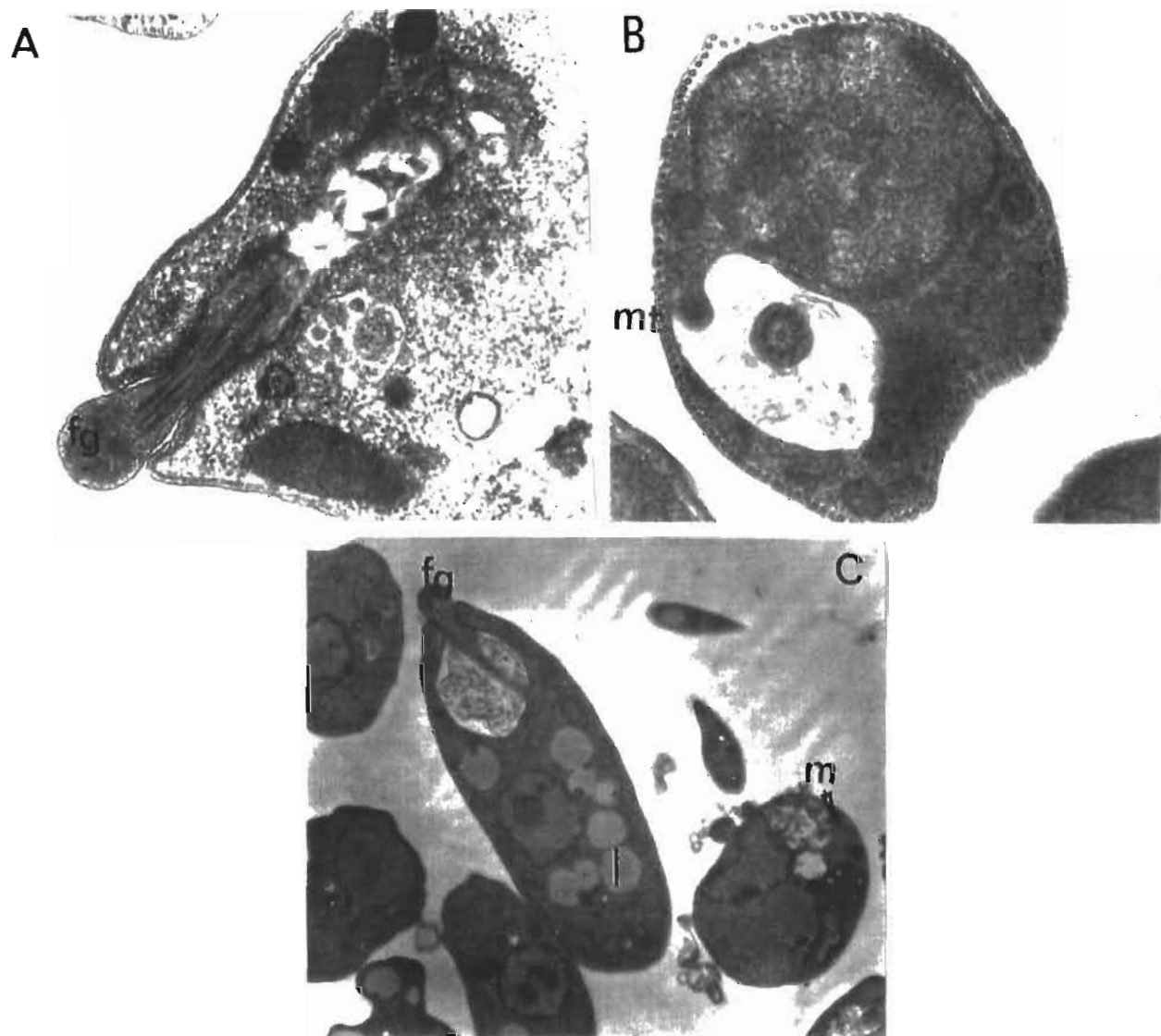


Figure 2

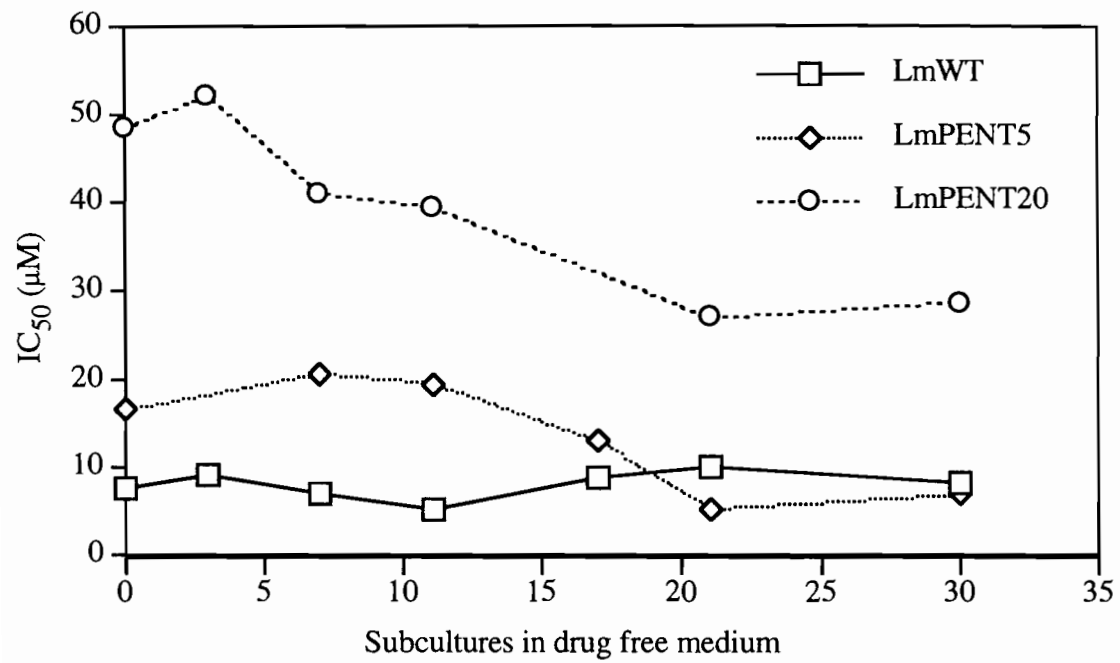


Figure 3

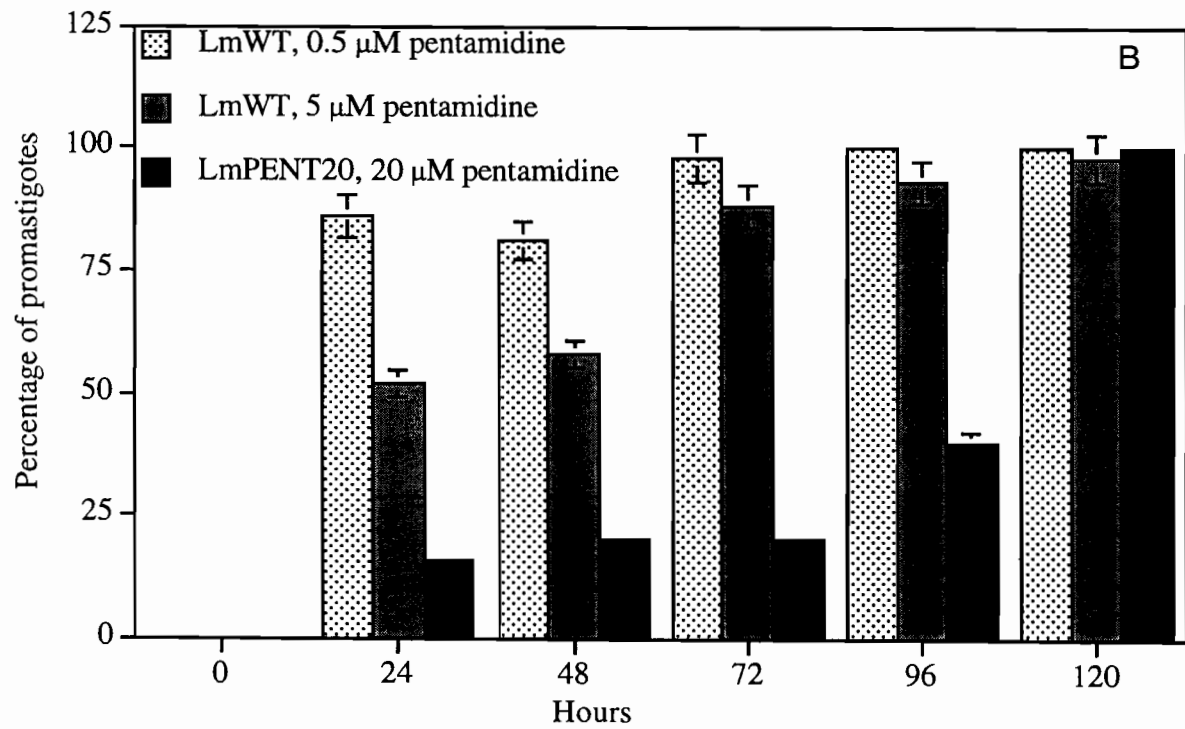
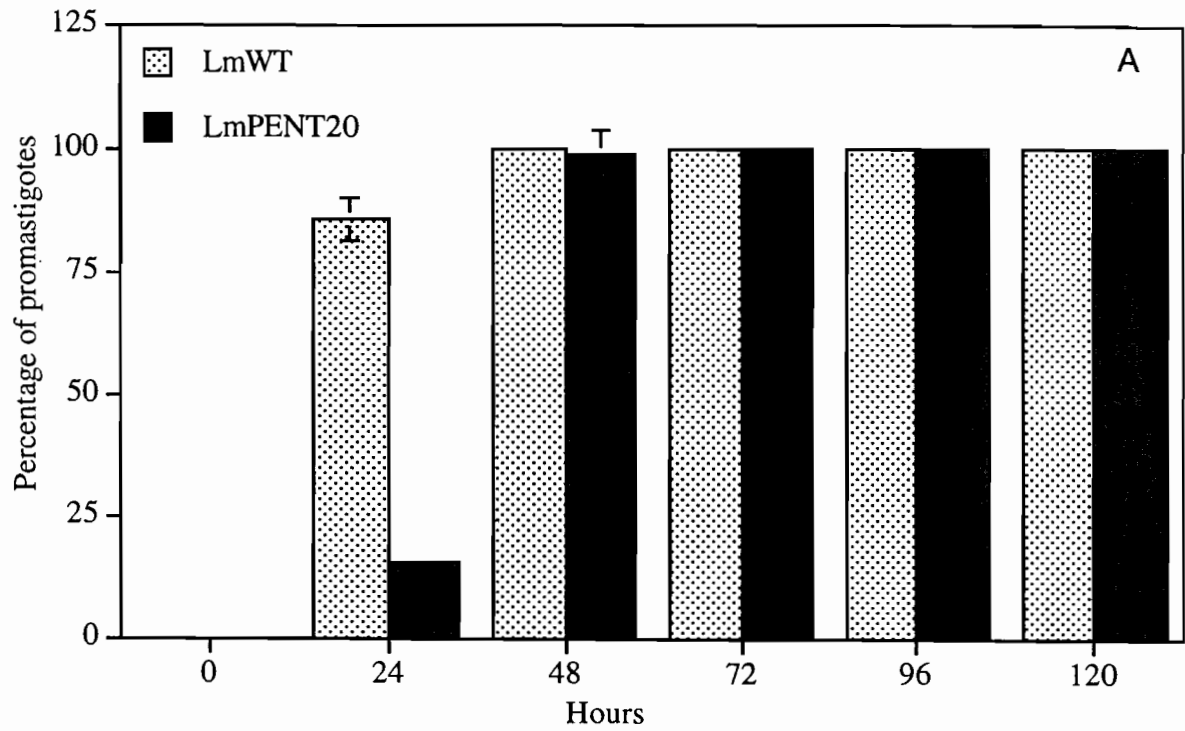
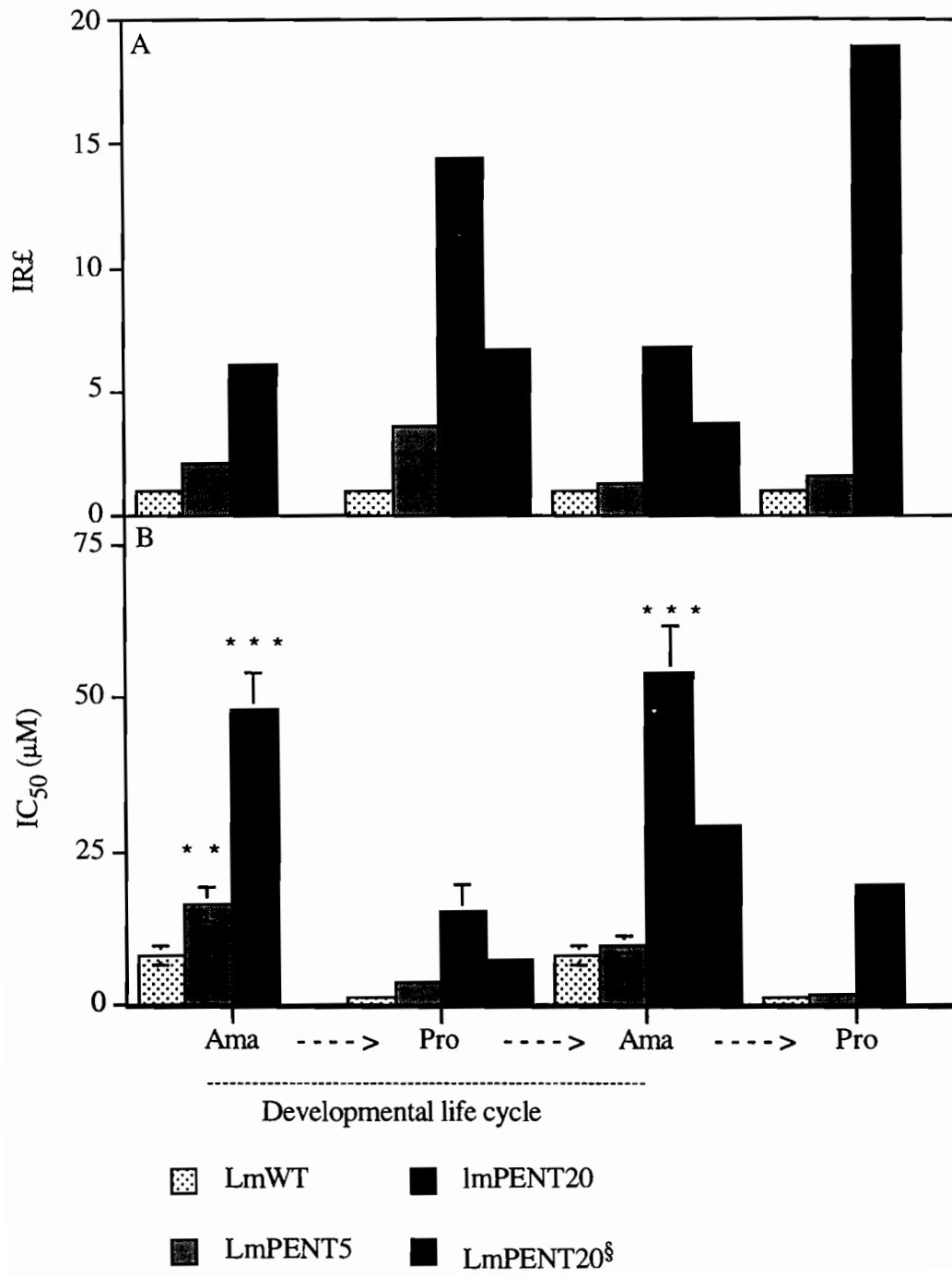


Figure 4



II. Autres Résultats

La perte de virulence des formes promastigotes de *Leishmania amazonensis* résistantes à la pentamidine est associée à un dysfonctionnement du cycle de développement parasitaire (En préparation)

L'infectivité des formes promastigotes de leishmanies et l'établissement durable du parasitisme sont dépendants du bon déroulement des différentes étapes du cycle de développement parasitaire: l'attachement aux macrophages par des interactions spécifiques de type ligands-récepteurs, l'internalisation, la différenciation, la survie et la multiplication des formes intracellulaires. Dans cet article, la caractérisation phénotypique de lignées chimiorésistantes à la pentamidine de *L. amazonensis* conduit à la mise en évidence de mutants avirulents *in vivo* chez la souris et *in vitro* vis à vis des macrophages péritonéaux de souris. L'étude des différentes étapes du cycle de développement parasitaire de ces mutants résistants indique que le mécanisme de chimiorésistance est aussi impliqué dans le processus de prolifération des formes amastigotes correspondantes.

Principaux résultats

- 1) Des clones de *L. amazonensis* chimiorésistants à 5 (LaR5CL1) et à 15 μ M (LaR15CL1) de pentamidine ont été obtenus dans notre laboratoire par pression médicamenteuse *in vitro* à partir d'une souche sauvage. Ils présentent des indices de résistance respectifs de 34 et 54 et une résistance croisée à la tunicamycine et à la primaquine.
- 2) Ces mutants présentent des propriétés biologiques tout à fait inattendues. En effet nous observons une perte d'infectivité *in vivo* dépendante du degré de chimiorésistance acquise. La lignée LaR5CL1 possède toutes les caractéristiques d'une lignée atténuée. Alors que LaR15CL1 présente celle d'une souche avirulente, ces dernières étant incapables de produire des lésions au point d'inoculation chez des souris Balbc expérimentalement infectées.
- 3) Des expériences d'infectivité *in vitro* vis à vis de macrophages péritonéaux murins montrent que les lignées chimiorésistantes sont capables de s'attacher aux macrophages, d'y être internalisées et de s'y différencier en formes amastigotes. Cependant, contrairement à la souche sauvage correspondante, elles sont incapables de survivre à l'intérieur des phagolysosomes.
- 4) Lorsque les lignées résistantes sont soumises à un cycle de développement parasitaire *in vitro*, les formes promastigotes prolifèrent, se différencient, et bien qu'elles soient viables, les formes amastigotes qui en résultent sont incapables de se multiplier.
- 5) L'analyse, sur gels d'empreintes, réalisée sur les formes promastigotes, met en évidence l'absence de l'expression d'une activité métalloprotéasique de 54 kDa correspondant

vraisemblablement à une étape intermédiaire de la N-glycosylation de la Gp63 (métalloprotéase majeure de surface des promastigotes). En effet, lorsque nous traitons des formes promastigotes sauvages avec la tunicamycine (inhibiteur spécifique de la N-glycosylation des protéines) nous concentrons des activités métalloprotéasiques dans la zone de 48-54 kDa qui s'accompagne d'une disparition de celles situées dans la zone de 60 à 70 kDa. Il est intéressant de noter que la métacyclogénèse chez *L. amazonensis*, processus conduisant à la formation de parasites très infectants, s'accompagne aussi de l'expression croissante de l'activité protéasique de 54 kDa.

6) Tout se passe comme si un dysfonctionnement au niveau du stade promastigote induisait, soit un arrêt de la prolifération du stade ultérieur, soit court-circuitait l'étape de multiplication du stade amastigote, en les faisant entrer précocément dans une phase de non-division. Nous envisageons maintenant d'étudier le ou les mécanisme(s) mis en jeux.

Specific Inhibition of Amastigote Proliferation of Pentamidine Resistant *Leishmania amazonensis* induced an avirulent phenotype

SERENO D, LECARDINAL A, HOLZMULLER P, MAQUAIRE S., CAVALEYRA M and LEMESRE J.L.*

Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies à Vecteur, Unité de Biologie Parasitaire. ORSTOM, Montpellier, France.

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

Corresponding author

JL LEMESRE, Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies à Vecteur, Unité de Biologie Parasitaire, ORSTOM, 911 Av Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France.

Fax: 67 54 78 00

Tel: 67 61 74 67

Email: Lemesre@melusine.mpl.orstom.fr

Abstract

Using a continuous drug pressure protocol we have induced pentamidine resistance on promastigote forms of *L. amazonensis*. Two clones resistant to 5 μ M (LaR5Cl1) and 15 μ M (LaR15Cl1) pentamidine, derived from a parental wild-type clone (LaWTCl1), were studied. Both pentamidine resistant clones were cross resistant to tunicamycin (TM) and sodium arsenite but not to primaquine. Curiously, they present a dramatic decrease in their infectivity for mice *in vivo*, depending on the induced-level of chemoresistance. Even if they could readily attach and enter into mouse peritoneal macrophages *in vitro* they could not survive and multiply inside the phagolysosome. We showed that this marked effect on the infectivity was due to a specific lack of proliferation of the amastigote forms. Moreover, both chemo-resistant clones lack of a metallo-proteinase activity of 54 kDa which was differentially expressed during metacyclogenesis of the wild-type clone. We present evidences showing that this proteinase activity could represent a step in the glycosylation of the major metallo-protease referred as Gp63. Thus the phenotype of avirulence observed for both resistant clones suggest that the induction of pentamidine resistance on promastigote clones led to a specific inhibition of the amastigotes proliferation, probably by a perturbation in the glycosylation process of proteins and particularly Gp63.

Introduction

Leishmaniasis is a significant cause of morbidity and mortality in many countries of the world. The vertebrate host is infected with flagellated, extracellular promastigote forms of the parasite via sandfly bites. Promastigotes are rapidly transformed in non-flagellated intracellular amastigote forms within the mononuclear phagocytes of the vertebrate host.

Infection begins with the introduction of the promastigotes into the host during a sandfly bite. This is followed by parasite attachment to host macrophages receptors, endocytosis, differentiation into amastigotes, survival, and replication of the amastigotes within the phagolysosomes (Chang, 1983; Chang et al, 1985). The interactions between macrophages and the parasites plays a central role in successfully establishing *Leishmania* infection. Several macrophage receptors, e.g., the mannosyl fucosyl receptor, CR3 receptor, a receptor for glycosylated molecules, and fibronectin receptors (Chang et al, 1990), have been implicated in the binding process. Two surface molecules of promastigotes, namely Gp63, a glycoprotein, and the lipophosphoglycan (LPG), have been described as ligands for attachment to these macrophages receptors. The obtention of attenuate strains has helped in the understanding of the basis of *Leishmania* virulence. These attenuate strains could readily be obtained *in vitro*, by long term cultivation of the promastigote forms in axenic conditions (Handman et al, 1983; Nolan and Herman, 1985; Segovia et al, 1992). The decrease in the attachment and entry of the parasites by macrophages were described to be the basis of this diminished virulence (Chakrabarty et al, 1996). Attenuate strains could also be obtained by treating promastigote forms with tunicamycin, which is a structural analog of UDP-N-Acetylglucosamine (GlcNAc). It inhibits N-Acetylglucosamine transferase, thereby preventing the transfer of GlcNAc-1-P to Dolichol phosphate, the first step in the lipid-linked pathway of protein glycosylation. The binding of these TM treated parasites seems not to be decreased (Nolan and Farrell, 1985). The diminished infectivity seems rather to be due either to a lack of differentiation of promastigotes after internalization (Nolan and Farrell, 1985) and/or to a lack of proliferation of the transformed amastigotes. However, after the attachment to macrophages, promastigotes were endocytosed and transformed into amastigotes. Only the amastigotes could survive and multiply within the phagolysosomes. So, the ability of the parasite to differentiate and proliferate were the second limiting step in establishing infection. Molecule of the parasite surface and/or the excreted factor are supposed to play an important role in the surviving of parasites (Chang et al, 1990). However there are only little informations on important factors involved in the promastigote-amastigote transformation process and in the proliferation of the resulting amastigote forms.

In this paper we described an original phenotype of virulence obtained after the induction of pentamidine resistance on promastigote forms of *L. amazonensis*. Both resistant clones showed a dramatic decrease in their *in vivo* infectivity as compared with their parental wild-type clone. The avirulent clones could readily attach and entry into macrophages and differentiate into amastigotes. However, the proliferation of the resulting amastigotes was specifically inhibited. Furthermore, these clones lack of a metalloproteinase activity of 54 kDa which was differentially

expressed during metacyclogenesis. We present evidences showing that this proteinase activity could represent a glycosylation state of the major surface metalloprotease referred to be Gp63.

Materials and Methods

Drugs and reagents. Pentamidine isethionate, sodium arsenite, tunicamycin, were supplied by SIGMA. Primaquine was a generous gift of Dr J. Rodriguez, Bel Horizonte (Brazil).

Parasite culture. Axenically-grown amastigote forms of *L. amazonensis* (MHOM/BR/76/LTB-012) 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) in 25 cm² flasks. From a starting inoculum of 5×10^5 amastigote forms/ml, cell densities in the range of 2×10^7 to 7×10^7 parasites/ml were 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, 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 pretested fetal calf serum (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 (Lemesre, patent PCT/FR N°94/00577). Promastigote cultures 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 NaHCO₃, pH 7.2, supplemented with 20% heat-inactivated FCS.

Selection of pentamidine resistant promastigote forms Cloned wild-type promastigote forms of *L. amazonensis* (designated LaWTCL1) were adapted to survive in medium containing about 0.5 μM pentamidine. After six subcultures in medium containing the same pentamidine concentration, cells were cultured in medium containing an increasing amount of pentamidine. These cells were subjected to stepwise increasing drug pressure until cell line resistances to 5 and 15 μM pentamidine were established respectively. Cells were then cloned and pentamidine susceptibility of the clones was determined. Two clones selected for further studies (designated LaR5CL1 and LaR15CL1) were then cultured in RPMI 20% FCS medium containing 5 or 15 μM pentamidine respectively.

***In vitro* developmental sequence of *L. amazonensis* in axenic conditions.** Transformation experiments were initiated with 3×10^6 parasites/ml. Metacyclic promastigotes of *L. amazonensis* were transformed into axenically growing amastigotes by passages in the MAA/20 medium, pH 6.5 (Lemesre et al, 1997, in press; Sereno and Lemesre, 1997; Lemesre, patent PCT/FR N°94/00577), raising the temperature to $32 \pm 1^\circ\text{C}$. Morphological aspect of parasites was determined by microscopic examination after Giemsa staining. Results were expressed as a mean value of the percentage of differentiation.

Viability test. To estimate the IC₅₀ values, the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) micromethod yet described (Sereno and Lemesre, 1997) was used.

Briefly promastigote forms, from late-log phase of growth, were seeded in 96-well flat-bottom microtrays (Nunc) at 2×10^5 parasites/well in a volume of 100 μ l in adequate culture conditions. Drugs were added at one tenth of the final concentration in a volume of 10 μ l in triplicate (range depending on the drug). After a 72 hour incubation, 10 ml 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 addition of 100 ml 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. Two or more independent experiments in triplicate were performed for the determination of each drug sensitivity. Activity of the drug alone in reagent were determined and no substantial interaction was found. Results were analyzed using the mathematical model described by Hills (1986).

Protein lysate and proteinase assays. *L. amazonensis* promastigotes were harvested from the culture at times between day 2 and day 7 after inoculation. The cells were washed twice in PBS and resuspended in Tris 50mM NaCl 150 mM 0.1% Triton X100, pH 7.5 for 30 minutes. Promastigote lysates were centrifuged at 5000 x g for 20 min, the supernatant was removed and protein concentration was determined with the Bradford method.

Proteinase activities were examined after electrophoretic separation of detergent lysates in gels containing copolymerized gelatin as previously described (Lacks and Springhorn, 1980). Briefly, Substrate hydrolysis was performed at room temperature in 0.2 M acetate buffer (pH 5.5), containing 1mM dithitritol (DTT) after the gel had been washed free of SDS in 2.5 % (v/v) Triton X-100 solution. The effect of inhibitors, 1-10 phenanthroline (10 mM), L-trans-epoxysuccinylleucylamido (4-guanidino) butane E64 (10 μ M) on the proteinases activities was determined after their separation in gelatin SDS-PAGE, by incubation of the gel in buffer supplemented with inhibitor. The gel were stained with Coomassie blue.

SDS-PAGE was performed according to the discontinuous buffer method of Laemmli (1970) using 10% separating/5% stacking gels in a protein minigel apparatus.

Infection of mice and macrophages with leishmanias. BALB/c mice in groups of six where each infected with parental wild-type clone long term culture as control and variants resistant to 5 and 15 μ M pentamidine. Promastigotes at 5×10^7 cells per 50 μ l of PBS (pH 7.2) were inoculated in footpad. Infection was assessed by measuring the diameter of the lesion at different time points after infection.

In vitro infection of mouse peritoneal macrophages with promastigotes was performed as described before (Kweider et al, 1987). Briefly stationary phase promastigotes (6-7 days old) were added to the wells containing adherent macrophages at a ratio of 5 or 2 promastigotes/macrophage and incubated at 37°C in 5% CO₂. After appropriate incubation periods, coverslips were fixed with methanol and stained with Giemsa. The binding of promastigotes to the macrophages was examined after 15, 30, 45, 60 minute incubation. At the end of 1 hours the wells were rinsed with RPMI 1640 to remove free parasites and culture were

left at 37°C for additional periods (24, 48 and 72 hr). For each experiment over 500 cells were counted in duplicate to determine the number of parasites per macrophage and the percentage of macrophages infected.

Statistical analysis. Statistical significance (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) was analyzed by student's *t*-test. At least three experiments in triplicate were performed.

Results

Obtention of pentamidine resistant promastigote forms of *L. amazonensis* Using a continuous drug pressure protocol we have obtained pentamidine resistant parasites with resistance indexes (IR represents the IC_{50} value after drug pressure/ IC_{50} value before drug pressure) of 35 for LaR5CL1 and 54 for LaR15CL1 after drug selection (Table 1). Significant cross resistance was observed towards tunicamycin and sodium arsenite, no cross resistance was noticed for primaquine (Table 1).

Virulence of pentamidine resistant variants and their parental wild-type *in vitro* and *in vivo*. During the time course of the selection of the chemoresistant variants, promastigotes of LaWTC11 were subcultured in parallel. Infection of the footpad of BALB/c mice with 5×10^7 *L. amazonensis* stationary-phase long term culture of LaWTC11 resulted in footpad lesions within 4 weeks (Figure 2). The footpads became greatly enlarged, ulcerated and necrotic from the 8th week onwards. In contrast, infection with 5×10^7 LaR5CL1 promastigotes, lesions only began to appear after 6 weeks, furthermore these lesions were smaller. During the time course of the experiment, promastigotes of LaR15CL1 did not produced lesions (Figure 1).

The interactions between *L. amazonensis* wild-type and resistant clones and normal resident mouse peritoneal macrophages *in vitro* were investigated at different incubations periods. As shown in figure 2A the binding of LaR5CL1 was significantly higher than that observed for LaR15CL1 and LaWTC11. Throughout the period, the percentage of macrophages with attached parasites was very comparable between wild-type and pentamidine-resistant promastigotes (Figure 2B). In Figure 2C, at similar time intervals, the uptake of promastigotes by macrophages increased more rapidly for both attenuated clones than for the virulent one. After 60 min interaction, macrophages were infected by about 2 avirulent clones and less than 1.5 for the wild type virulent one (Figure 2C). Thus the above results indicate that the resistant clone are internalized at a much faster rate than the wild-type one. This observation was confirmed by the higher percentage of infected macrophage observed for both attenuated clones (Figure 2D).

The virulence in mice of the wild-type and both chemo-resistant clones was predictive of their infectivity *in vitro*. Figure 3A and B, showed the kinetic of infection of macrophages by both resistant clones and the wild-type one during a course of infection for up to 72 hours. As describe above, after 1 hour of contact both resistant clone were internalized at a much faster rate than the wild type one. However after 24 hours the average number of resistant-parasites per macrophages was reduced by about 50% and gradually decreased until day 3 (Figure 3 A). Major differences in infections among clones became noticeable as soon as 48 hours after inoculation. In cultures infected with pentamidine-resistant clones the percentage of infection and the average number of parasites per cells both significantly decreased gradually until day 3 (Figure 3A and B). After 72 hours less than 7% of macrophages were still infected by about 1 pentamidine-resistant clones (Figure 3A and B). By contrast, after 72 hours the percentage of infection was about 45% for LaWTC11 (Figure 3A) and macrophage were still infected by about 3 parasites (Figure 3B). The

wild-type clone could readily survive within macrophages as shown by the about unchanged mean number of parasites per macrophages (Figure 3A).

***In vitro* differentiation and proliferation of parasites in amastigote culture conditions.**

As shown in Figure 4, both resistant and wild-type promastigote clones could readily be differentiated into axenic amastigotes in the absence of pentamidine. However significant differences in the rate of transformation were noticed between wild-type and resistant clones. At 24 hours more than 50% of the parasite-resistant population was differentiated into amastigote forms, after 96 hours the transformation was complete (Figure 4). However, the differentiation of the wild-type was delayed. At 24 hours less than 10% of the parasites population was in the amastigote forms. The transformation was complete at 96 hours (Figure 4).

Even if promastigotes of LaR5Cl1 and LaR15Cl1 could readily be differentiated into axenic amastigotes they present a reduced proliferation when they were in the amastigote culture conditions (Figure 5), unlike those of LaWTCl1. When stationary phase freshly transformed amastigote forms of both resistant and wild-type clones were subcultured at an inoculum of 3×10^6 parasite/ml, amastigote forms of LaWTCl1 readily proliferate unlike those of both resistant clones. Increasing the inoculum did not lead to a proliferation of the parasites (unshown results). This specific inhibition of the proliferation seems not to be due to a killing of the amastigotes since the viability determined by erythrosine B staining or by assessing the dehydrogenase activity at 72 hours was between 78 and 94% (94%, 78%, and 80% for LaWTCl1, LaR5Cl1 and LaR15Cl1 respectively).

Proteinase activity in SDS-PAGE gels. Proteinase activities present in cell lysates of wild-type and resistant clones were investigated using SDS-PAGE and gelatin as substrate. The multiple proteinase pattern detected varied among wild-type and pentamidine resistant clones. Briefly we have detected proteinase activities at 105-110 kDa, 85-90kDa, 62 to 70 kDa, a weak proteinase activity at about 54 kDa which was not observed in the cell lysate of both resistant clones (Figure 7 A). The 54 kDa proteinase activity was differentially observed during metacyclogenesis of LaWTCl1 (Figure 7B). These proteinase were specifically inhibited by 1-10 phenanthroline. Low molecular weight proteinase activity, specifically inhibited by E-64 (unshown results) were also detected. Major proteinase activity specifically inhibited with 1-10 phenanthroline was observed 48 to 54 kDa for wild-type parasites treated with 0.5 or 1 μ g/ml TM (Figure 8 A and data not shown).

Discussion

We defined pentamidine resistance of the variants produced by comparing their sensitivity to pentamidine, tunicamycin, primaquine and sodium arsenite with that of their parental wild type clone. We defined the virulence of the variant by comparing their differentiation from promastigotes into axenic amastigotes, infectivity for mice macrophages *in vitro* and mice *in vivo*. By all these criteria the pentamidine-resistant clones were found to be less virulent and infectious as compared with their parental wild-type clone.

The *in vitro* generation of promastigote from non-infective forms to infective or metacyclic forms has been reported and referred to as metacyclogenesis (Sacks, 1989). It is generally accepted that Gp63 and LPG are the parasites surface molecules involved in the attachment and potentially in the survival of the parasites in macrophages (Chaudhuri et al, 1989; Chakrabarty et al, 1996). Parasite attachment to macrophage receptors is the first limiting step which encounter parasites for establishing parasitism. Both avirulent parasites obtained by *in vitro* selection of pentamidine resistant clones were able to attach and enter inside macrophages more readily than the virulent one suggesting that the avirulence observed is not due to an impairment in the binding of parasites to macrophages.

After the attachment to macrophages, promastigotes were endocytosed and transformed into amastigotes. This differentiation is crucial for the survival of the parasites since only the amastigotes were adapted to grow at acid pH present the parasitophorous vacuole (Chang et al, 1990). We have developed axenic cultures of amastigote forms of *L. amazonensis* to reproduce a complete developmental sequence by manipulation of media, pH and temperature conditions (Lemesre, patent PCT/FR N°94/00577). Using this model, it was possible to follow, the differentiation and the proliferation of the pentamidine resistant clones *in vitro* in amastigote culture condition. In fact both avirulent clones present a rate of differentiation enhanced as compared to the virulent one. This observation could explain the higher level of internalization observed for avirulent clones as compared with the wild-type clone. Thus the inability of avirulent clone to parasites macrophages seems rather to be due either to the incapacity of the amastigotes to proliferate or to an increase susceptibility to microbicidal compounds produced by macrophages. We demonstrate that the proliferation of the resulting amastigote was specifically and dramatically decreased. Thus the avirulence observed was due to a specific lack of proliferation of the amastigote stage of the parasites.

Tunicamycin is a structural analog of UDP-N-Acetylglucosamine (GlcNAc). It inhibits N-Acetylglucosamine transferase, thereby preventing the transfert of GlcNAc-1-P to Dolichol phosphate, the first step in the lipid-linked pathway of protein glycosylation. Induction of TM resistance was often associated with an increase of virulence associated with an increased expression of N-acetylglucosaminyltransferase and amplification of its gene (Kink and Chang, 1987a; 1987b; Detke et al. 1988; Katakura et al. 1991). However, some authors reported a decrease infectivity for TM-resistant parasites (Wilson and Hardin, 1990). They have characterized an enzymatically inactive Gp63 derived from TM-resistant mutants which was

suggested to be inactive due to the absence of N-linked oligosaccharides. The abundance of Gp63 is indeed often positively correlated with *Leishmania* infectivity (Kweider et al, 1987). Gp63 is a glycoprotein with a metallo proteolytic activity (Kink and Chang, 1987; Chang et al, 1986; Chang et al, 1990). We have examined proteinases activities after electrophoretic separation of parasite lysate in gels containing copolymerized gelatin. The virulent clone like both resistant ones expressed metalloproteinase activity in the range of 60 to 70 kDa. During metacyclogenesis of the virulent clone (LaWTC11), we showed an increase in metallo-proteinase activity of 54 kDa. This proteinase activity which was characterized to be a metalloproteinase, was not detected in parasite lysate of both avirulent clones (LaR5C11 and LaR15C11).

Pretreating promastigote forms with TM lead to a dramatic decrease in the infectivity of parasites (Nolan and Farrel, 1985). An increase electrophoretic mobility of metallo proteinase activity from a multiple activity 53-70 Kda to a major pattern of proteinase activity ranging from 48 to 55 kDa was observed for parasites pretreated with (TM). It has been shown that glycosylation does not interfere with the proteolytic activity of Gp63 (Funk et al, 1994). Thus the absence of the 54 kDa proteinase activity observed for both avirulent clones could be due to a perturbation in the glycosylation of the proteins and in particular of the Gp63. It could represent a step in the glycosylation of the Gp63, thus both virulent clones which were significantly cross resistant to TM could have an enhanced N-acetylglucosaminyltransferase activity leading to high glycosylation of the protein and in particular of the Gp63.

Altogether these results suggests that protein glycosylations are essential in the differentiation processs of promastigotes and also for the induction of proliferation of the resulting amastigote forms. Thus minor modification of the carbohydrate metabolism could lead to a deleterious effect on the virulence of the parasites. The mechanism of pentamidine resistance substantially interferes with the regulation of the differentiation and the proliferation of parasites. However the exact mechanism(s) responsible for the avirulence and/or pentamidine resistance of these parasites is probably complex and required further investigations.

References

- Chakrabarty R, Mukherjee S, Lu HG, McGwire BS, Chang KP, Basu MK. 1996. Kinetics of entry of avirulent strains of *Leishmania donovani* into macrophages: A possible role of virulence molecules (Gp63 and LPG). *J. Parasitol.* 82: 632-635.
- Chang CS, and Chang KP. 1986. Monoclonal antibody affinity purification of a leishmania membrane glycoprotein and its inhibition of leishmania-macrophage binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 100-104.
- Chang CS, Inserra TJ, Kink JA, Fong D, Chang KP. 1986. Expression and size heterogeneity of a 63 kilodalton membrane glycoprotein during growth and transformation of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18: 197-210.
- Chang KP, Chaudhuri G, Fong D. 1990. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Ann. Rev. Microbiol.* 44: 499-529.
- Chang KP, Fong D, Bray RS. 1985. Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. (Chang KP, Bray RS, eds). Amsterdam, Elsevier Biomedical. pp1-27.
- Chang, K.P. 1983. Cellular and molecular mechanism of intracellular symbioses in leishmaniasis. *International Review Of Cytology Supplement.* 14: 267-305.
- Chaudhuri GM, Chaudhuri A, Pan A, Chang KP. 1989. Surface acid proteinase (Gp63) of *Leishmania mexicana*: a metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *J. Biol. Chem.* 264:7483-7489.
- Detke S, Chaudhuri G, Kink JA, Chang KP. 1988. DNA amplification in tunicamycin-resistant *Leishmania mexicana*: Multicopies of a single 63-kilobase supercoiled molecule and their expression. *J. Biol. Chem.* 263: 3418-3424.
- Funk VA, Jardim A, Olafson RW. 1994. An investigation into the significance of the N-linked oligosaccharides of *Leishmania* gp 63. *Mol. Biochem. Parasitol.* 63: 23-35.
- Handman E, Hocking RE, Mitchell GF, Spithil TW. 1983. Isolation and characterization of infective and non infective clones of *Leishmania tropica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 7: 111-126.

- Katakura K, Peng P, Pithawalla R, Detke S, Chang KP. 1991. Tunicamycin-resistant variants from five species of *Leishmania* contain amplified DNA in extrachromosomal circles of different sizes with a transcriptionally active homologous region. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44: 233-244.
- Kink JA, Chang KP. 1988. N-Glycosylation as a biochemical basis for virulence in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27: 181-190.
- Kink JA, Chang KP. 1987. Tunicamycin-resistant *Leishmania mexicana amazonensis*: expression of virulence associated with an increased activity of N-Acetylglucosaminyltransferase and amplification of its presumptive gene. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 84: 1253-1257.
- Kweider M, Lemesre JL, Darcy F, Kusnierz JP, Capron A, 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.
- Lacks SA, Springhorn SS. 1980. Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.* 255: 7467-7476.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680.
- Lemesre JL, Sereno D, Daulouede S, Veyret B, Brajon N, Vincendeau P. 1997. *Leishmania spp*: Nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically-grown amastigote forms. *Exp. Parasitol.* In press.
- Nolan TJ, Farrel JP. 1985. Inhibition of *in vivo* and *in vitro* infectivity of *Leishmania donovani* by tunicamycin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16: 127-135.
- Nolan TJ, Herman R. 1985. Effects of long term *in vitro* cultivation on *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Protozool.* 32: 70-75.
- Sereno D, Lemesre JL. 1997. Axenically-cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 41: 972-976.
- Sacks DL. 1989. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp. Parasitol.* 69: 100-103.
- Segovia M., Artero JM, Mellado E, Chance M 1992. Effects of long-term *in vitro* cultivation on the virulence of cloned lines of *Leishmania major* promastigotes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 86: 347-354.

Wilson ME, Hardin KK. 1990. The major *Leishmania donovani chagasi* surface glycoprotein in tunicamycin-resistant promastigotes. J. Immunol. 144: 4825-4834.

Legends to the tables

Table 1: Comparative effects of growth inhibitory agents on wild-type and pentamidine-resistant *Leishmania amazonensis* clones. The effective concentrations of antiparasitic drugs, cytotoxic agents and metals ions that inhibit the growth of wild-type (LaWTCL1), LaR5CL1 and LaR15CL1 cells by 50% were determined as described under Materials and Methods.

IR: Index of resistance: IC_{50} value before drug pressure/ IC_{50} value after drug pressure.

* Values are means $\pm$ SD (N=3).

a Abbreviations for drugs used are PENT, Pentamidine; PQ, Primaquine; TM, tunicamycin.

Legends to the figures

Figure 1: The development of lesions in mice infected with wild-type and pentamidine-resistant promastigote clones of *L. amazonensis*.

Figure 2: Infectivity of wild-type and pentamidine-resistant *L. amazonensis* promastigotes to mouse peritoneal macrophages *in vitro*. At the various time points indicated, the number of leishmania promastigote attached on macrophage (A) or inside macrophage (C) was determined (A). The percentage of macrophage presenting parasites attached on their surface (B) or infected (D) was evaluated.

Figure 3: Infectivity of wild-type and pentamidine-resistant *L. amazonensis* promastigotes to mouse peritoneal macrophages *in vitro*. At the various time points indicated, the number of leishmanias in macrophages (A) and the percentage of infection (B) was determined as described in the text.

Figure 4: differentiation of wild-type and pentamidine-resistant promastigotes into axenically-grown amastigote forms. Parasites were stained with Giemsa, differentiation was monitored by counting 300 cells for each point. Results were expressed as a mean value of promastigote percentages.

Figure 5: Proliferation of axenically-grown amastigotes of the pentamidine-resistant and of the wild type clones. Parasites were seeded at 3×10^6 parasites/ml in amastigote culture conditions. At day 4 parasites were subculture in amastigote culture conditions at 3×10^6 parasites/ml. The SDs were between 5 to 10%.

Figure 6: Detection of proteinase activity of *L. amazonensis*, (A) loaded with 5 μ g, 2.5 μ g and 1.5 μ g of proteine of LaWTCl1, lane 1, 4, 7. Loaded with 5 μ g, 2.5 μ g and 1.5 μ g of proteine of LaR5Cl1 lane 2, 5, 8 and loaded with 5 μ g, 2.5 μ g and 1.5 μ g of proteine of LaR15Cl1 lane 3, 6, 9. The positions of the molecular mass markers (in kDa) are indicated on the figure.

Differential activity of the 54 kDa protease activity during metacyclogenesis (B) of LaWTCl1 (A) and at day 7 of LaWTCl1les (B) of LaR5Cl1 (C) and LaR15Cl1 (D). In each lane 10 μ g of protein were harvested. The numbers above each lane indicate the day of harvest.

Figure 7: Detectection of proteinase activity of promastigotes of *L. amazonensis* treated with 0.5 μ g lane 1 and 1 μ g tunicamycin lane 2. The positions of the molecular mass markers (in kDa) are indicated on the figure.

Table 1

Drugs (a)	IC ₅₀ (μM)*			Relative drug resistance (IR)	
	LaWTCl1	LaR5Cl1	LaR15Cl1	LaR5Cl1	LLaR15Cl1
PENT	0.5 +/- 0.1	17.8 +/- 5.1	27.10 +/- 4.3	35	54
TUN	1.5 +/- 0.5	6.2 +/- 1.1	6.7 +/- 1.1	4	4.5
PQ	42.2 +/- 1.1	50.3 +/- 1.3	37.1 +/- 3.0	1.2	0.9
Sodium Arsenite	1.6 +/- 0.6	4.4 +/- 1.3	3.8 +/- 0.6	2.8	2.4

Figure 1

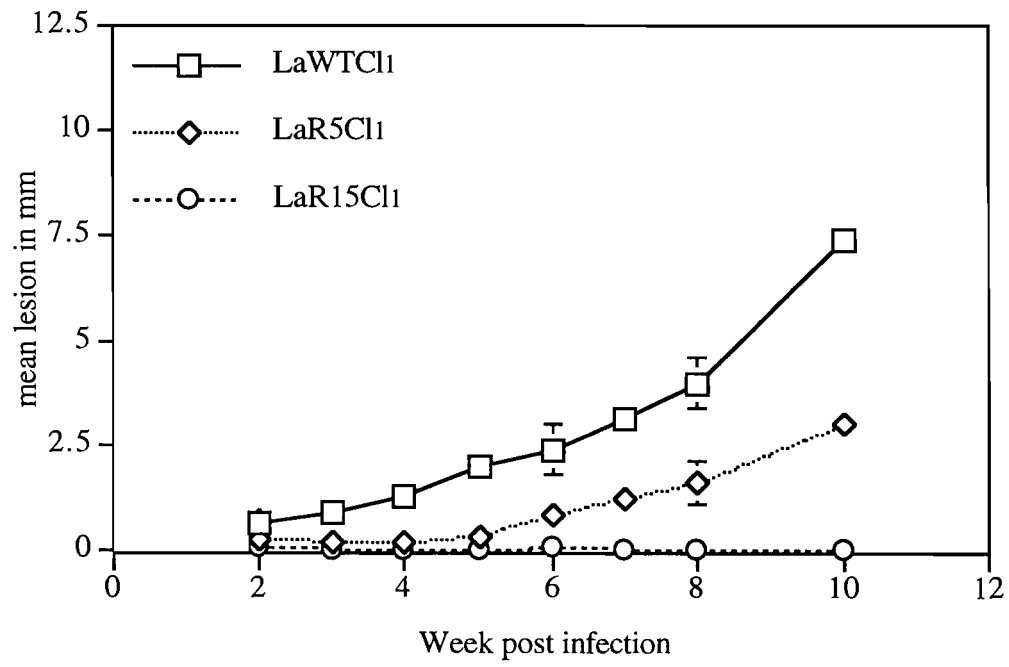


Figure 2 A & B

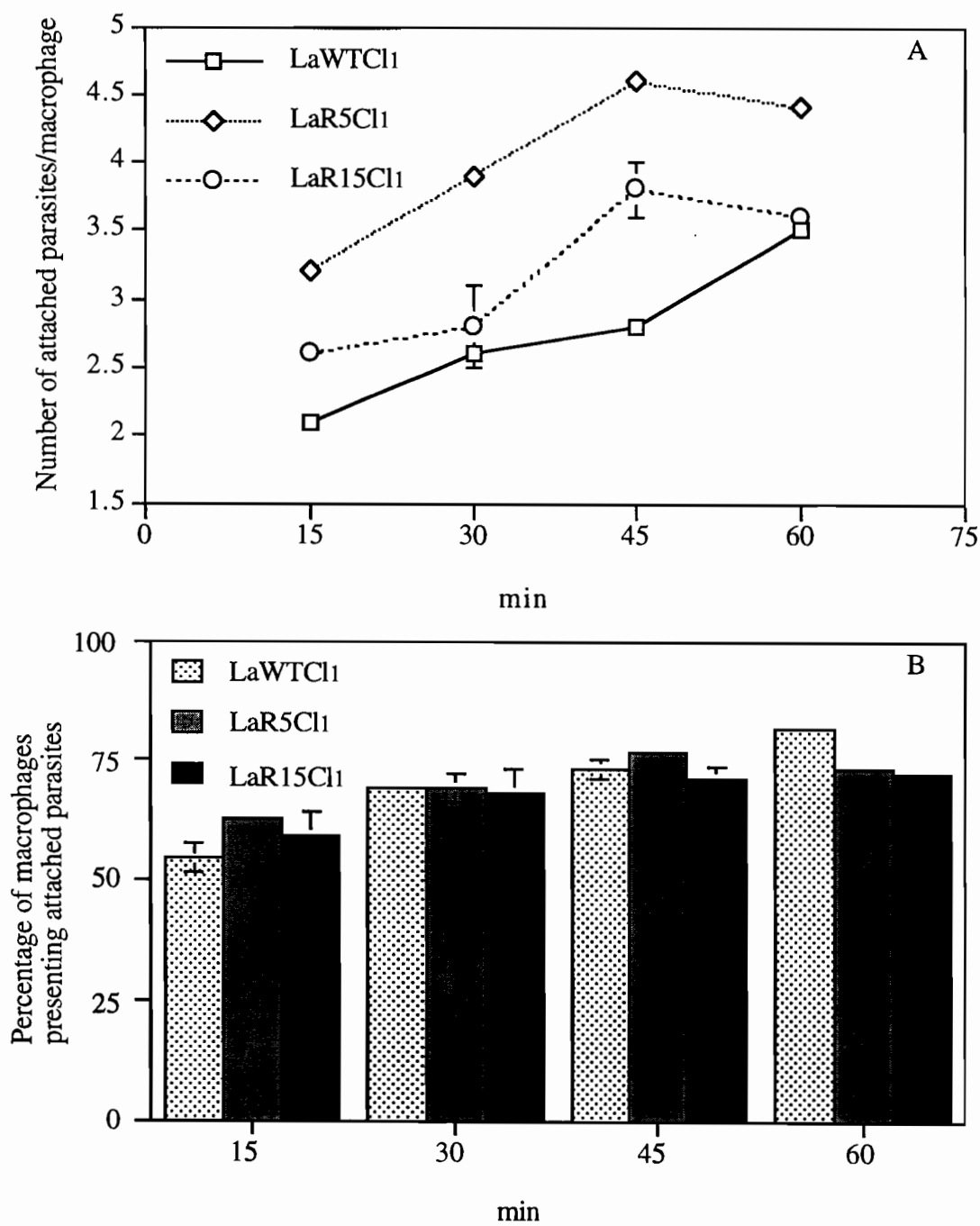


Figure 2 C & D

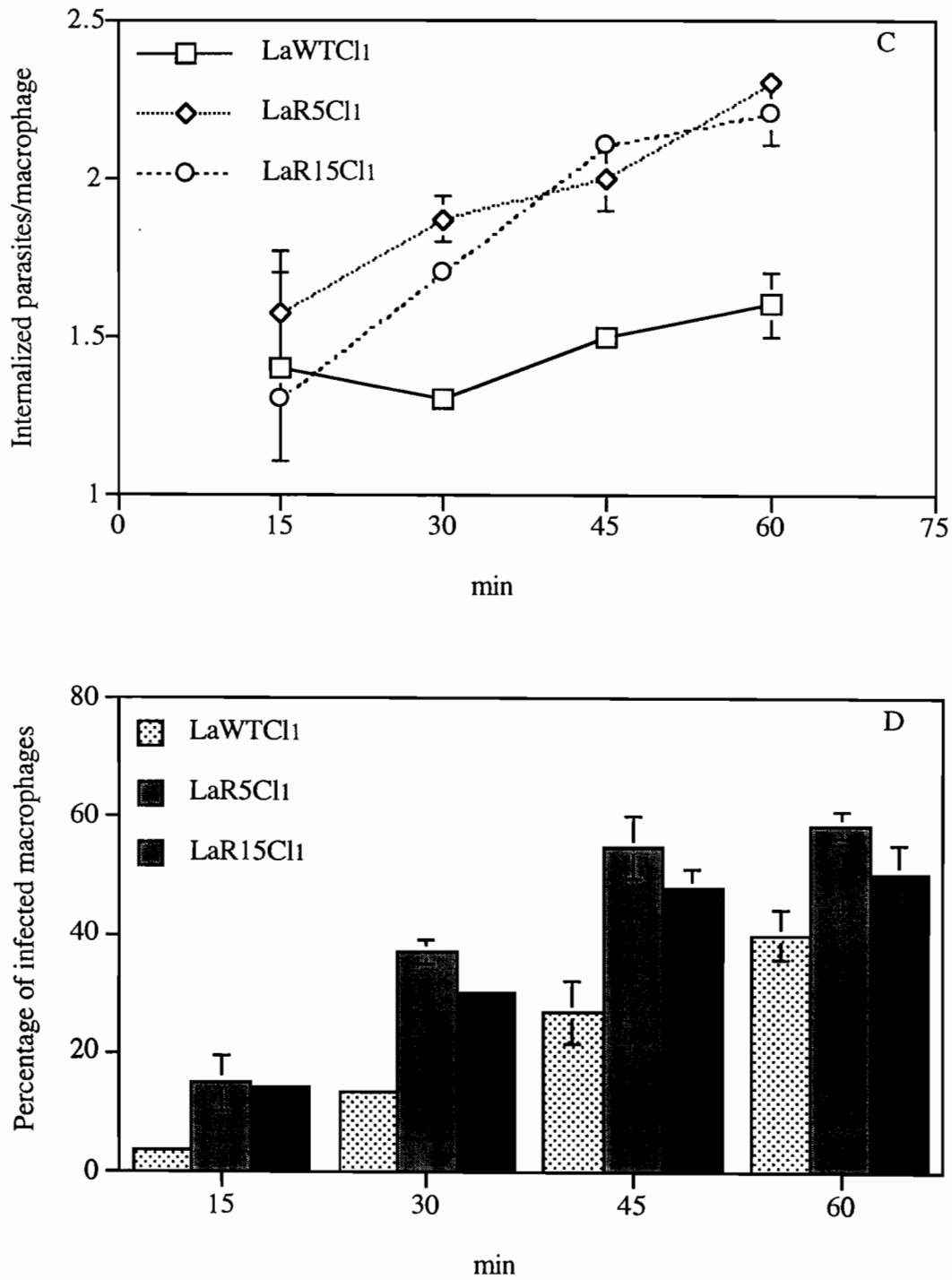


Figure 3 A & B

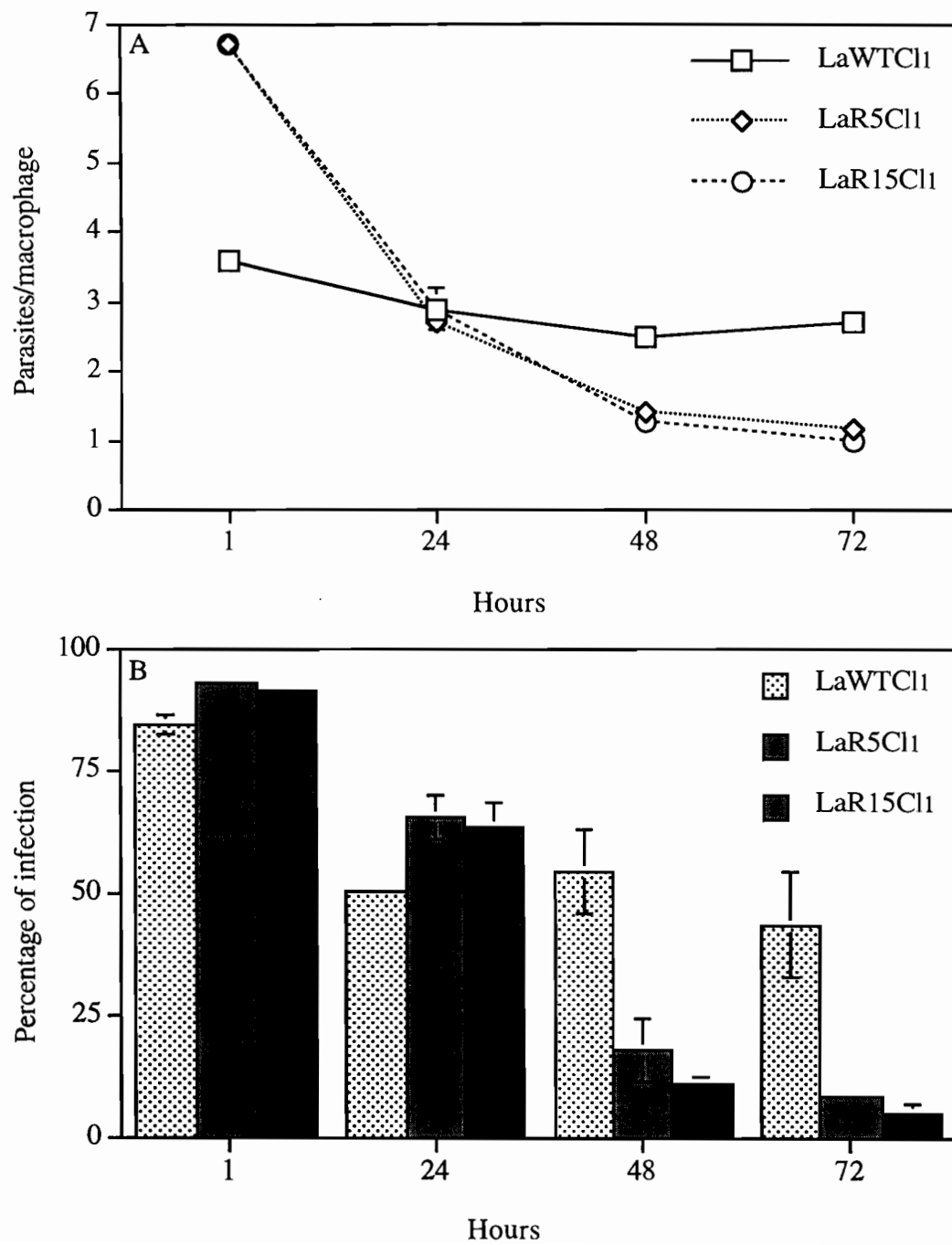


Figure 4

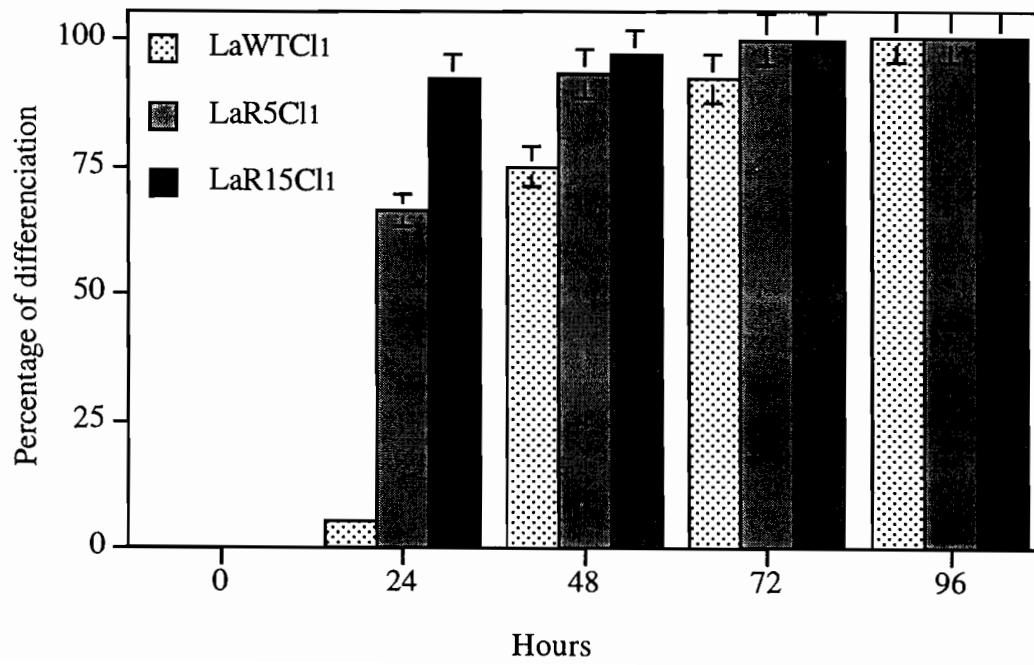


Figure 5

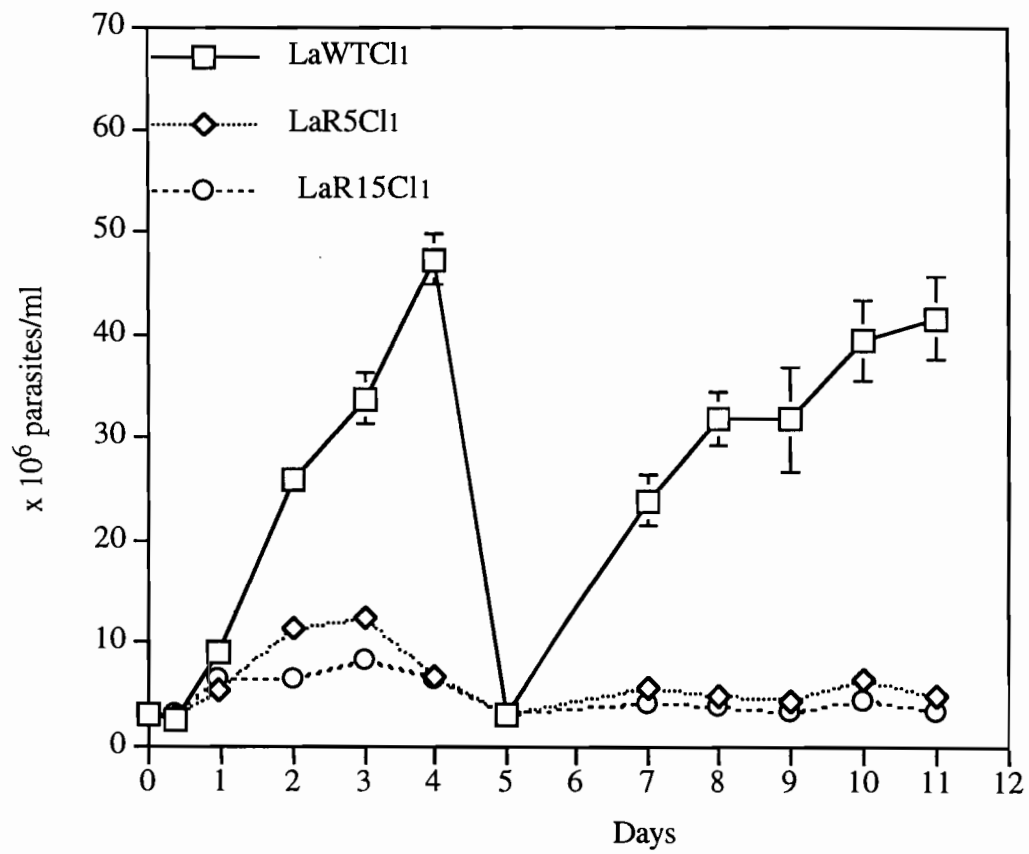


Figure 6

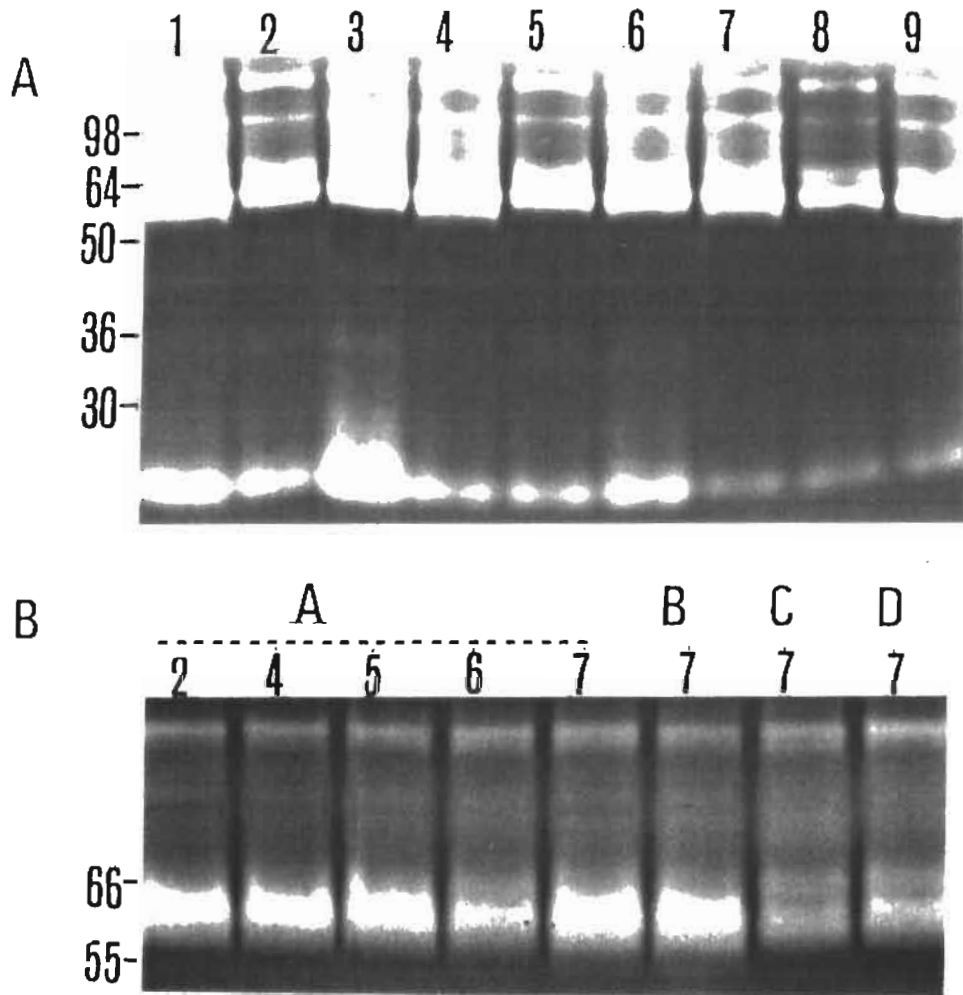
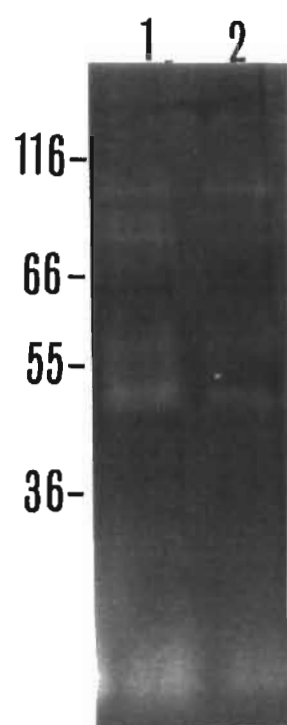


Figure 7



La croissance et la viabilité des formes amastigotes de *L. amazonensis* ne peuvent être correctement évaluées par un test utilisant l'alarmar Bleu.

Ce test à tout d'abord été mis au point pour déterminer la cytotoxicité de certains anti-cancéreux (Pagé *et al.*, 1993). Il est basé sur la détection de l'activité métabolique des cultures en cours de croissance. Les cellules en cours de croissance changent le potentiel d'oxydo-réduction du milieu qui les entoure. Lors de la prolifération cellulaire, le milieu est maintenu sous forme réduite à l'inverse des cultures dont la croissance est inhibée. L'alarmar bleu possède un indicateur coloré sensible à ces variations. Lorsque l'alarmar bleu est sous forme réduite, il présente un pic d'absorbance important à 570 nm. Lorsqu'il est sous forme oxydé, son pic d'absorption est à 600 nm. Il est aussi possible d'utiliser ce test en fluorescence. Nous avons décidé d'effectuer les tests à l'aide de l'alarmar en absorbance. Le principal avantage de celui-ci réside dans le fait que celui-ci est très pratique à utiliser. En effet l'alarmar bleu est soluble dans l'eau, il n'est donc pas nécessaire de lyser les cellules et solubiliser le colorant avant de lire l'absorbance.

Matériel et méthodes

Leishmana species: *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/76/LTB-012). Les formes amastigotes sont cultivées dans un milieu monophasique axénique semi-défini, le MAA 20 % SVF (PCT/ FR N° 94/ 00577). Les formes amastigotes sont cultivées à 32°C, condition de température intracellulaire. Elles sont maintenues par un repiquage hebdomadaire de 5.10^5 formes amastigotes par ml de milieu.

Optimisation du test basé sur l'absorbance.

Effet du temps d'incubation Des parasites de fin de phase exponentielle de culture sont prélevés et lavés dans du PBS 0,01M pH 7,2 et sont répartis en triplicate dans des plaques de 96 puits à une concentration de 15×10^5 parasites par puits. Vingt microlitres d'une solution d'alarmar bleu (filtrée sur 0,22 µm) sont ajoutés, les plaques sont incubées à 32 +/- 1°C. Après différents temps d'incubation la densité optique est lue à 570 nm.

Effet de la quantité d'alarmar bleu: 15×10^5 parasites par puits sont répartis en triplicate dans une plaque de 96 puits. On ajoute alors 5, 10 ou 20 µl d'alarmar bleu dans chaque puits, les plaques sont incubées 4 heures à 32 +/- 1 °C avant de lire la DO.

Courbe étalon et cinétique: Des parasites de fin de phase exponentielle de culture sont prélevés et lavés dans du PBS 0,01M pH 7,2 et sont répartis en triplicate dans des plaques de 96 puits à différentes concentration. 10 µl d'alarmar bleu ou 10 µl d'une solution de MTT (10mg/ml). La densité optique obtenue avec l'alarmar bleu est lue directement, les puits contenant le MTT sont

extraits à l'aide d'un tampon contenant, 50% d'éthanol, 10% de SDS, pH5,5. Les cinétiques de croissance sont effectuées en inoculant en parallèle 1 et 2×10^5 parasites/puits dans des plaques de 96 puits, 10 μ l d'alarmar bleu est alors ajouté. La densité optique est déterminée de façon journalière selon les conditions optimales déterminées précédemment.

Résultats et discussion

L'effet du temps d'incubation, sur le développement de l'absorbance de l'alarmar bleu, est montré par la figure 1 A. Nous observons qu'un temps d'incubation minimum de 4 heures est nécessaire pour le développement de l'absorbance. L'alarmar bleu est commercialisé en solution et l'industriel recommande d'utiliser un volume d'alarmar bleu n'excédant pas 10% du volume final. Dans notre cas, il est donc recommandé d'utiliser 10 μ l d'indicateur. Comme le montre la figure 1B, un volume minimum de 10 μ l est nécessaire pour obtenir un signal, à 20 μ l nous n'obtenons pas d'augmentation significative du signal. Les conditions requises pour l'utilisation de l'alarmar bleu sont donc les suivantes: une incubation de 4 heures au minimum avec une quantité d'alarmar bleu de 10 μ l.

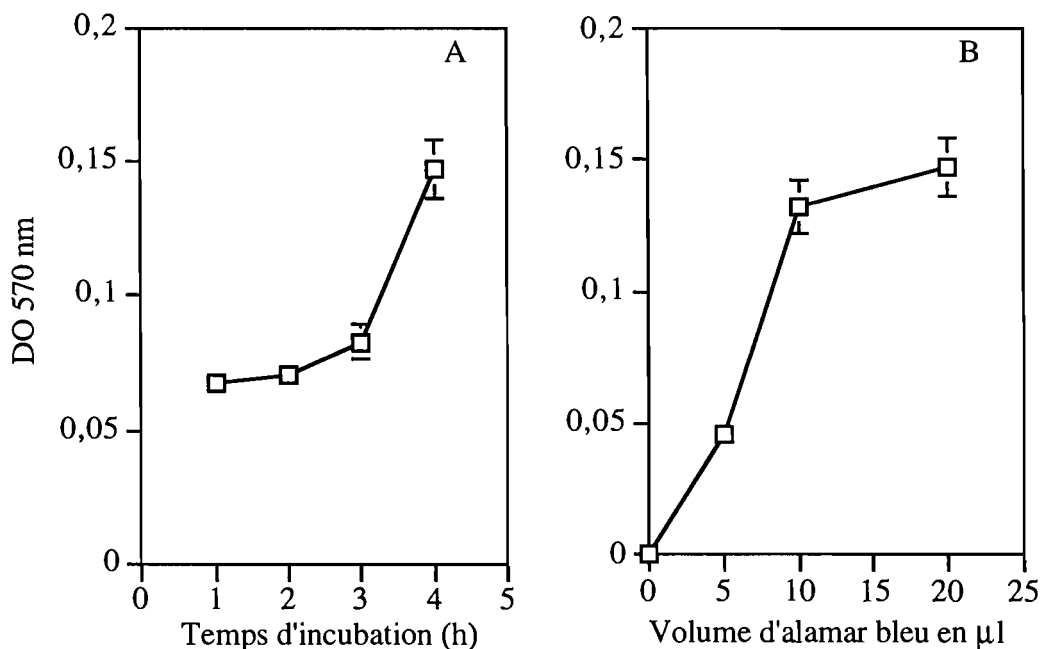


Figure 1: Effet du temps d'incubation (A) et du volume d'alarmar bleu (B) sur le développement de l'absorbance à 570nm.

La figure 2 montre la relation existant entre la DO observée à 570 nm pour l'alarmar bleu, le MTT et le nombre de parasite en culture. Nous observons une corrélation entre DO et nombre de parasites à partir d'une concentration de $1,8 \times 10^6$ parasites/ml. D'autre part, il existe une grande différence dans la densité optique obtenue entre les deux tests. Lorsque l'on utilise l'alarmar bleu, une DO maximum de 0,20 est obtenue pour la plus forte concentration parasitaire testée. Lorsque le test MTT est utilisé une DO maximum de 0,93 est obtenue. Des concentrations inférieures à $1,8 \times 10^6$ parasites/ml ne sont pas détectées par les deux tests. En fait l'alarmar bleu est moins sensible que le test MTT.

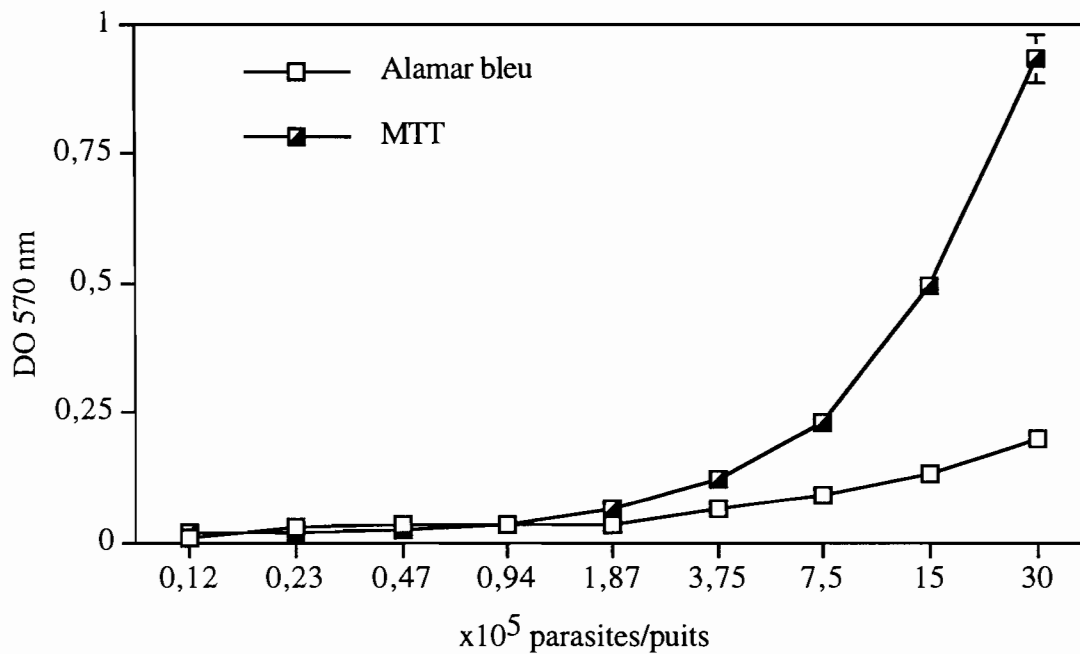


Figure 2: Courbe étalon obtenue avec l'alarmar bleu et le MTT.

L'alarmar bleu est commercialisé comme étant un produit peu ou pas toxique pour différentes lignées cellulaires. L'alarmar Bleu possède un avantage par rapport au test MTT, ce produit est soluble. Il n'est donc pas nécessaire de lyser les cellules pour lire la DO. Nous avons donc voulu savoir s'il était possible de suivre en continu la prolifération des formes amastigotes de culture axénique de *L. amazonensis*. Comme le montre la Figure 3A et B l'alarmar bleu ne reflète pas la croissance parasitaire. Une augmentation de la DO est enregistrée lors des deux premiers jours de culture. En fait, suite à des comptages effectués en présence de 10 μ l, d'alarmar nous nous sommes aperçus que cet indicateur inhibait fortement la prolifération cellulaire.

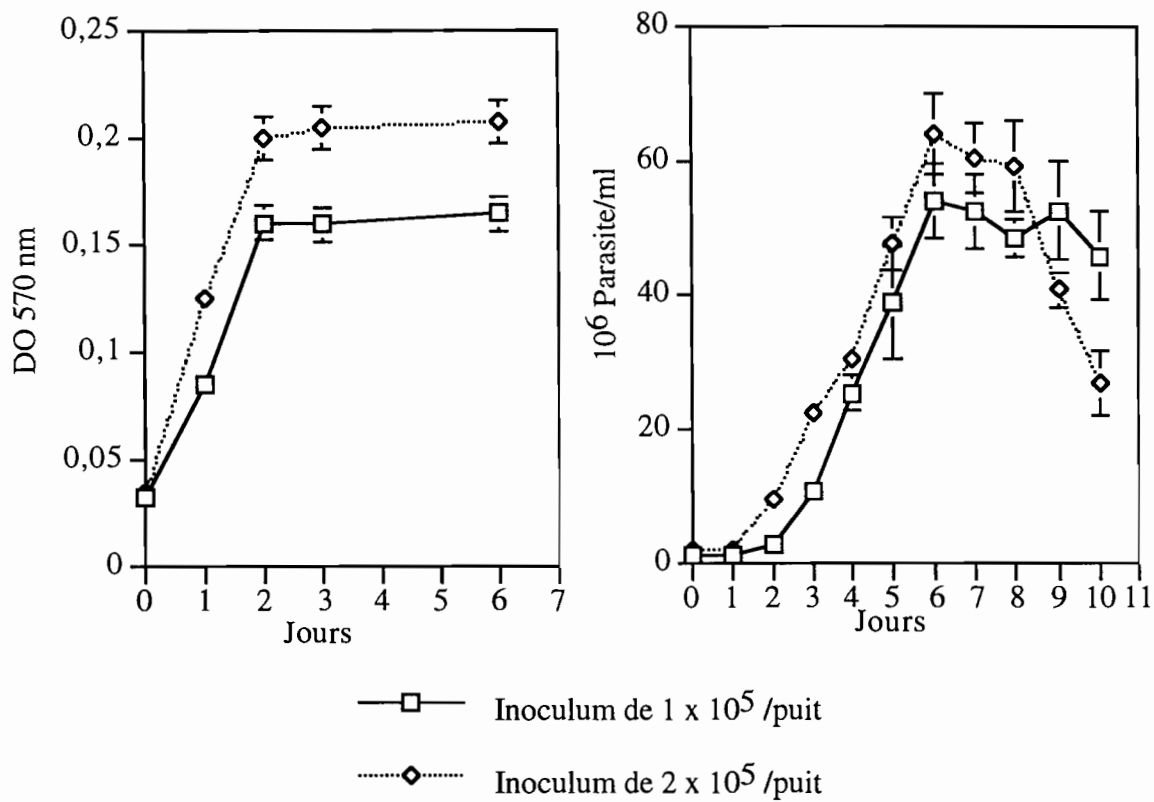


Figure 3: Cinétique de croissance des formes amastigotes de culture axénique obtenues par l'alar blue (A) et par comptage (B).

Ce test utilisé uniquement en détectant les absorbances ne présente donc pas une assez grande sensibilité pour être utilisé dans des tests de viabilité. De part sa toxicité vis à vis des formes amastigotes de culture axéniques de *L. amazonensis*, il ne peut être utilisé en suivi continu de prolifération cellulaire.

CHAPITRE 3: DISCUSSION.

CHAPITRE 3: Discussion.

Les problèmes rencontrés lors des traitements de patients atteints de leishmaniose, nous ont amenés à rechercher les raisons permettant d'expliquer ces cas de non-réponse. L'inefficacité d'un traitement peut être due: soit à une faible sensibilité aux médicaments de la forme parasitaire présente chez l'hôte et/ou à des phénomènes de chimiorésistance de plus en plus décrits dans les maladies infectieuses et parasitaires. Pour cela il était nécessaire d'évaluer la sensibilité de la forme médicalement importante (forme amastigote présente chez l'hôte infecté): (i) aux composés microbicides produits par les macrophages activés, notamment à l'oxyde nitrique (NO) et (ii) aux différents composés utilisés pour traiter la leishmaniose (Pentostam®, Glucantime®, pentamidine, amphotéricine B...). La mise au point, sur le stade parasitaire réellement en contact avec la drogue chez l'hôte, d'un modèle de chimiorésistance *in vitro* nous a conduit: (i) à caractériser les différents phénotypes chimiorésistants obtenus, et (ii) à cerner pour la première fois les modalités de la transmission du caractère chimiorésistant au cours du cycle de développement parasitaire.

Les leishmanies présentent un cycle de développement parasitaire se déroulant successivement chez un hôte vertébré et un hôte invertébré. L'hôte vertébré est contaminé par la forme promastigote, métacyclique, transmise lors de la piqûre du phlébotome femelle infectée. Dès l'inoculation, les promastigotes sont rapidement phagocytés par les macrophages à l'intérieur desquels ils se transforment en amastigotes qui vont se multiplier, faire éclater la cellule et ainsi pouvoir réinfecter d'autres macrophages. La forme amastigote, à situation intracellulaire stricte représente donc la forme médicalement importante. Paradoxalement, la majorité des études portant sur les leishmanioses ont été effectuées sur la forme promastigote, forme de multiplication de l'insecte vecteur et seul modèle expérimental de culture *in vitro* disponible en routine. C'est pourquoi, depuis quelques années, différentes équipes se sont attachées à produire les formes amastigotes en culture axénique et à les caractériser.

La première leishmanie adaptée à des conditions de culture axénique a été *Leishmania pifanoi* (Pan et Mc Mahon-Pratt, 1988). Sur des critères morphologiques d'infectivité *in vitro* et d'antigénicité de surface, les formes amastigotes de culture axénique se sont révélées semblables aux amastigotes de lésion. Plus récemment, la même équipe a montré que ces formes amastigotes diffèrent des formes promastigotes correspondantes pour certaines caractéristiques biochimiques (Rainey *et al.*, 1991). Des tentatives de cultures axéniques de *L. panamensis* et *L. braziliensis* (Eperon et McMahon-Pratt, 1989) ont aussi été réalisées. Enfin le cycle complet de développement parasitaire a été réalisé chez *L. mexicana* (Bates *et al.*, 1992; Bates, 1993). Selon un procédé général de culture *in vitro*, la culture des formes amastigotes des principales espèces de leishmanies et le cycle complet de développement parasitaire ont été réalisés au sein de l'Unité de Biologie Parasitaire du centre ORSTOM de Montpellier (Lemesre *et al.*, 1994; Lemesre

Brevet N° PCT/FR/9400577). Ces formes amastigotes ont été caractérisées selon des critères structuraux, ultrastructuraux, biologiques, biochimiques et immunologiques. Une bonne analogie entre les amastigotes de culture axéniques et les amastigotes issus de lésions a été démontrée (Lemesre *et al.*, 1994; Blanc, 1993; Lemesre Brevet N° PCT/FR/94005777). Le modèle de culture *in vitro* ayant été validé, il nous a été possible d'étudier: (i) les profils de sensibilité au NO et de chimiosensibilité des formes amastigotes d'espèces responsables de leishmanioses viscérales (*L. infantum*, *L. chagasi*) et cutanées (*L. mexicana*, *L. amazonensis*), (ii) la stabilité de la chimiorésistance au cours du cycle de développement parasitaire de *L. mexicana* et *L. amazonensis*, ainsi que (iii) les modalités du caractère avirulent de clones chimiorésistants à la pentamidine de *L. amazonensis*.

Sensibilité au NO et profil de chimiosensibilité des amastigotes de différentes espèces de leishmanies. L'internalisation des parasites par les macrophages est associée, lorsque ces derniers sont activés, à la formation de composés oxygénés et de composés nitrogénés microbicides. Récemment, des activités antimicrobiales synthétisées par des macrophages activés selon une nouvelle voie métabolique conduisant à la synthèse de l'oxyde nitrique et de ces dérivés (NO, NO₂⁻ et NO₃⁻) à partir de la L-Arginine, ont été décrites. Cette molécule effectrice de l'immunité non spécifique est aussi responsable d'activités antiparasitaires: effet trypanostatique chez les trypanosomes africains (Vincendeau *et al.*, 1991, 1992) et chez *Toxoplasma gondii* (Adams *et al.*, 1990) et effet lytique sur *Schistosoma mansoni* (James et Glaven, 1989) et les formes promastigotes de *Leishmania major* (Green *et al.*, 1990; Liew *et al.*, 1990).

Grâce au nouveau modèle expérimental que nous avons développé, nous avons démontré que le NO exerçait un effet lytique et statique sur les deux stades parasitaires de trois espèces de leishmanies. Le NO affecte non seulement la viabilité du stade amastigote des parasites mais aussi leur capacité à proliférer. Il possède une action cytostatique sur les formes amastigotes à des concentrations physiologiques (Laurent *et al.*, 1996). De façon surprenante les formes amastigotes sont moins sensibles à son action microbicide que ne le sont les promastigotes. Les amastigotes se développent dans les phagolysosomes des macrophages et sont donc soumis à de très fortes pressions de sélection. Ils auraient mis en place des mécanismes compensateurs permettant leur développement dans cet environnement hostile. Un contact prolongé entre les amastigotes et le NO serait donc nécessaire pour que celui-ci exerce son effet cytotoxique à l'intérieur des macrophages. Etant donné la demi-vie courte de ce radical libre, une libération lente du NO par l'intermédiaire de la formation de composés nitrosylés lui permettrait de prolonger son effet, expliquant son activité microbicide *in vivo*. Le NO agit non seulement sur la viabilité et la prolifération du stade amastigote, mais aussi sur la différenciation des parasites. En effet, un contact très court entre les parasites et le NO (4 heures) bloque la transformation des parasites sans modification significative de leur viabilité. Le cycle de développement parasitaire est ainsi interrompu; or celui-ci est indispensable à la survie et à la propagation du parasite. Ces

résultats suggèrent que les mécanismes impliqués dans la prolifération et la différenciation des parasites sont probablement différents. Concernant le mode d'action du NO, Hibbs *et al* (1987, 1988) ont montré que l'activité cytotoxique du NO vis à vis de cellules cancéreuses était en partie due à l'interaction du NO avec le groupement prosthétique Fe-S (Fer- soufre) de certaines enzymes clefs du métabolisme. Chez les formes amastigotes de leishmanies, un mécanisme semblable entraînant une inhibition de la Cis-Aconitase (enzyme du cycle de Krebs contenant un groupement Fe-S) conduirait à la lyse des parasites. Ce mécanisme pourrait être responsable de la stérilisation par le NO des monocytes humains infectés par *Leishmania* (Vouldoukis *et al.*, 1995).

Les dérivés pentavalents de l'antimoine (Pentostam[®], Glucantime[®]) sont les molécules les plus utilisées pour traiter les leishmanioses. Ces composés sont généralement considérés comme très peu toxiques pour les formes promastigotes (Neal, 1987). Ce sont deux sels d'un même métal, qui présentent une très grande différence d'activité vis à vis des formes promastigotes. En effet, le Pentostam[®] est connu pour avoir une action cytotoxique à des concentrations de l'ordre de 250 à 500 µg/ml (Grögl *et al.*, 1989; Ullman *et al.*, 1989) alors que le Glucantime[®] serait actif à des concentrations supérieures, environ 2 mg/ml (Moreira *et al.*, 1995). L'activité du Glucantime[®] *in vitro* serait dépendante en grande partie des conditions de culture (Moreira *et al.*, 1995). Il est plutôt inhabituel de trouver de telles différences de toxicité entre deux sels d'un même métal. Les raisons de cette différence ont donc été étudiées et récemment il a été montré que le conservateur présent dans le Pentostam[®], le *m*-chlorocrésol avait une très forte activité leishmanicide. Ainsi les différences de toxicité observées entre ces deux sels d'un même métal seraient donc principalement dues à la présence de ce composé dans les lots commercialisés (Roberts et Rainey, 1993). De plus, lorsque le conservateur est éliminé, le Pentostam[®] présente cette fois une très faible toxicité vis à vis des formes promastigotes (Roberts *et al.*, 1995). Or, celui-ci, comme le Glucantime[®], est pleinement actif *in vitro* sur des macrophages infectés et *in vivo* dans des infections expérimentales ou naturelles.

Deux hypothèses peuvent donc être formulées pour expliquer l'activité des dérivés pentavalents de l'antimoine: (i) bien que peu toxiques vis à vis des formes promastigotes, ils le seraient fortement pour les formes amastigotes, (ii) les dérivés pentavalents pourraient être métabolisés, par l'intermédiaire des macrophages, en dérivés beaucoup plus toxiques et notamment en dérivés trivalents qui ont toujours été montrés comme étant fortement actifs vis à vis des leishmanies *in vitro* et *in vivo* (Goodwin, 1995).

Afin de vérifier la première hypothèse, Mattock et Peters avaient mis en place dès 1975 un système *in vitro* permettant de tester l'activité leishmaniostatique de différentes molécules sur des formes amastigotes en multiplication dans des fibroblastes de chien. Ces auteurs montraient que le Pentostam[®] était peu ou pas actif dans leur modèle, résultats qui s'opposaient à cette première hypothèse. Cependant, *in vivo*, les fibroblastes ne sont pas des cellules naturellement parasitées par les amastigotes. De plus, il était difficile de montrer l'analogie entre ces amastigotes

en multiplication dans des fibroblastes et ceux issus de tissus infectés. En revanche, de façon plus rationnelle, Berman et Wyler (1980) démontraient que le Pentostam® était capable de stériliser des monocytes humains infectés par des leishmanies. Cependant une étude effectuée par Berman en 1987 sur des amastigotes isolées de macrophages démontrait l'absence d'activité leishmanicide marquée sur le stade intracellulaire des leishmanies. Vraisemblablement le Pentostam® nécessitait la présence de macrophages pour exercer ses activités leishmanicides et/ou leishmaniostatiques.

Concernant la seconde hypothèse, après avoir montré que le Pentostam® était très rapidement excrété après son administration par les patients traités (Goodwin et Page, 1943), Goodwin proposait, dès 1945 et encore tout récemment (1996), une conversion *in vivo* des dérivés pentavalents de l'antimoine (SbV) en dérivés trivalents (SbIII) pour expliquer l'activité du Pentostam®. La forte toxicité des dérivés trivalents vis à vis des parasites est connue depuis fort longtemps. En effet le tartar émétique a été utilisé avant le sodium stibogluconate pour le traitement des patients atteints de leishmaniose mais a été abandonné du fait de sa très forte toxicité pour les patients. Cette hypothèse était soutenue par d'autres observations. Tout d'abord l'analyse de l'urine et du sérum de patients traités au Pentostam® montrait que ceux-ci contenaient entre 15 et 25% de dérivés trivalents (Petit de Pena *et al.*, 1990; Burguera *et al.*, 1993). L'hypothèse de Goodwin était donc séduisante. Cependant celle-ci impliquait une forte sensibilité des formes amastigotes vis à vis du composé réduit SbIII. Or en 1993, Roberts et Rainey démontraient que les dérivés SbIII étaient beaucoup moins toxiques pour les formes amastigotes de culture axénique de *L. pifanoi* que pour les formes promastigotes correspondantes (Roberts et Rainey, 1993). Finalement il était difficile de tirer des conclusions définitives quant à la réelle validité de cette hypothèse.

Afin de vérifier ces hypothèses, il nous est avéré nécessaire de maintenir en culture axénique les formes amastigotes de différentes espèces de leishmanies. Ainsi il a été possible de déterminer la réelle chimiosensibilité des formes amastigotes de *L. mexicana*, *L. amazonensis* et *L. infantum* aux dérivés antimoniés pentavalents et trivalents. Ces espèces de leishmanies sont responsables respectivement de la leishmaniose cutanée simple, cutanée-diffuse et cutanéoviscérale. Afin de pouvoir déterminer s'il existait une toxicité différentielle en fonction du stade parasitaire, la même étude a été effectuée sur le stade promastigote.

Nous montrons que le Pentostam® est significativement moins toxique pour les promastigotes des trois espèces de leishmanies étudiées. Les formes amastigotes les plus sensibles sont celles de *L. infantum*. Il est intéressant de noter que le sodium stibogluconate est très efficace pour traiter les leishmanioses viscérales. Ces résultats montrent donc que le stade amastigote est intrinsèquement plus sensible aux dérivés pentavalents que le stade promastigote. Cependant nous savons que le Pentostam® est très actif sur les amastigotes en situation intramacrophagique à des concentrations de 10 à 15 µg/ml (Berman et Wyler, 1980; Neal et Croft, 1984; Gebre Hiwot *et al.*, 1992). Or, des concentrations 10 à 20 fois plus élevées sont

nécessaires pour tuer les amastigotes extracellulaires. La même démonstration n'a pas été possible avec le Glucantime®. En effet, ce composé ou l'un des conservateurs (sulfite disodique ou disulfite de potassium) qu'il contient, interagit avec le test MTT (test de viabilité cellulaire) et notamment de façon significative avec le milieu servant à cultiver les formes promastigotes, rendant impossible toute interprétation du test. Cette réaction non spécifique est minorée avec le milieu de culture des formes amastigotes qui sont faiblement sensibles au Glucantime® à des concentrations de 2 mg/ml. Le macrophage jouerait donc un rôle majeur dans l'effet leishmanicide des dérivés pentavalents. Même si les macrophages sont capables de concentrer les dérivés pentavalents de l'antimoine d'un facteur 3,8, leur concentration ne permet pas d'expliquer leur action *in vivo* (Berman *et al.*, 1987; Roberts *et al.*, 1995). Tout semble indiquer que la conversion des dérivés SbV en SbIII serait à l'origine de l'activité *in vivo* du Pentostam® et du Glucantime®. Nous démontrons qu'un composé trivalent, le potassium antimonyle tartrate, exerce, contrairement aux dérivés pentavalents une forte activité directement sur les deux stades parasites en culture. Si la très forte sensibilité des formes amastigotes de *L. infantum* aux dérivés trivalents de l'antimoine, peut être corrélée avec l'efficacité des dérivés antimoniés pentavalents dans le traitement des patients atteints de leishmaniose viscérale; la relative résistance des formes amastigotes des espèces responsables de leishmanioses cutanées aux dérivés trivalents de l'antimoine peut également être corrélée avec les problèmes rencontrés lors du traitement de ces parasitoses.

En conclusion, l'effet leishmanicide du Pentostam® sur les formes extracellulaires des leishmanies, non retrouvé avec le Glucantime® semble donc être dû à la présence du conservateur *m*-chlorocrésol. Ce dernier est probablement responsable de la majeure partie de l'activité du Pentostam® sur les deux stades parasites. En fait, les dérivés pentavalents de l'antimoine seraient des pro-drogues faiblement toxiques pour l'hôte et les parasites, qui une fois convertis en composés trivalents au niveau de leur site d'action, seraient fortement concentrés par les macrophages (Roberts *et al.*, 1995) et hautement toxiques pour le stade amastigote des leishmanies.

Les études concernant la chimiosensibilité différentielle des deux stades parasites à un autre médicament couramment utilisé en thérapie, la pentamidine, ont montré une moins grande toxicité de ce composé vis à vis du stade amastigote. Cette observation est à corréler avec une étude récemment effectuée par Basselin *et al.* (1996), montrant une diminution de l'entrée de pentamidine chez les formes amastigotes par rapport aux formes promastigotes de *L. amazonensis* et *L. donovani*. En fait, comme pour le cas des dérivés pentavalents de l'antimoine, la toxicité *in vivo* de la pentamidine vis à vis des amastigotes nécessiterait la présence de macrophages. Ceux-ci agiraient en concentrant la drogue (Berman *et al.*, 1987). Il a été montré que la pentamidine pouvait être hydroxylée *in vitro* par des microsomes de lapin ou humains (Berger *et al.*, 1990,1991). La pentamidine N-hydroxylée pourrait être, *in vivo* dégradée en résidus amides ou en urée avec libération simultanée de NO qui est actif sur les formes amastigotes à des concentrations physiologiques de l'ordre de la nanomole (Ignarro, 1989;

Lemesre *et al.*, 1997). Cette transformation non physiologique d'amide est comparable à ce qui se passe lors de la transformation de l'arginine en citrulline via une N-hydroxyarginine, entraînant une libération de NO. Clement et Jung (1994) supposent que cette transformation pourrait augmenter l'efficacité des drogues contenant des groupements amidine ou guanidine.

Chez des patients traités par l'amphotéricine B, la concentration plasmatique se situe aux alentours de 1 μ M (Atkinson et Benett, 1978). Nous montrons qu'à cette concentration l'amphotéricine B est fortement toxique pour les amastigotes de culture axénique quelque soit l'espèce de leishmanies étudiée. Les macrophages ne semblent donc pas jouer un rôle en concentrant ou en métabolisant le composé pour le rendre plus actif. Enfin, il a été démontré que l'amphotéricine B ne nécessitait pas l'activation des macrophages pour exercer son activité leishmanicide (Haidaris et Bonventre, 1983).

Nous montrons qu'il existe de très grandes différences de chimiosensibilité entre les deux stades parasitaires des leishmanies vis à vis du Pentostam®, de la pentamidine et de l'amphotéricine B, qui sont des médicaments couramment utilisés en chimiothérapie. Il en est de même pour d'autres composés à activité leishmanicide connue: la primaquine, le sodium arsénite et le bérénil. D'une manière générale, les tests de criblage d'activité leishmanicide visent à isoler des molécules présentant une forte activité vis à vis de la forme parasitaire réellement en contact avec la drogue *in vivo*. L'étude que nous avons réalisée révèle tout l'intérêt de l'utilisation d'un test de criblage d'activité leishmanicide directement sur le stade parasitaire médicalement important. Ce modèle expérimental offre de multiples avantages par rapport aux méthodes de criblage classiquement utilisées: (i) il est possible de déterminer l'activité antileishmanienne directement sur une population active de formes amastigotes, permettant d'identifier des molécules hautement actives à de très faibles concentrations, (ii) la méthode est rapide, reproductible, facilement interprétable et n'utilise pas de produits radioactifs. Elle est donc aisément transférable vers les pays du sud concernés, (iii) elle rend possible l'analyse des différences de chimiosensibilité entre diverses espèces et souches de leishmanies, (iv) elle permet d'établir facilement le degré de chimiorésistance d'une souche, (v) enfin, couplée à des expériences d'interaction parasite-macrophage, elle permet de déterminer précisément le rôle joué par ces cellules dans l'activité leishmanicide d'un composé. Ce modèle représente donc un excellent outil dans les domaines de la parasitologie et de la pharmacologie.

Chimiorésistance et cycle de développement parasitaire. Les échecs thérapeutiques et les rechutes après chimiothérapie sont les problèmes majeurs rencontrés dans le traitement des parasitoses. Ces problèmes sont à relier avec l'émergence des phénomènes de chimiorésistance. De nombreuses études portant sur la chimiorésistance chez *Leishmania* ont été effectuées sur le stade parasitaire non approprié (stade promastigote), puisque n'étant pas en contact avec la drogue. L'obtention de lignées chimiorésistantes *in vitro* a permis de décrire plusieurs

mécanismes potentiellement impliqués dans ces phénomènes et dont beaucoup conduisent à la caractérisation de phénotypes de multi-résistances (Ouellette et Borst, 1991). Cependant, la sélection de ces mutants a principalement été effectuée avec des molécules qui ne sont pas utilisées en thérapie antileishmanienne, ce qui rend difficile l'extrapolation des résultats avec les mécanismes induits naturellement. En outre, il existe peu d'informations concernant les modalités de transmission d'un caractère résistant induit sur le stade promastigote au cours du cycle de développement parasitaire dont le bon déroulement est indispensable à la propagation du parasite.

De part les nombreuses informations disponibles concernant les mécanismes de chimiorésistance des formes promastigotes de différentes espèces de leishmanies, une première sélection de mutants promastigotes chimiorésistants à la pentamidine a été réalisée par pression médicamenteuse continue. Après avoir caractérisé leurs phénotypes, la stabilité du caractère résistant a été déterminée au cours de plusieurs cycles de développement parasitaire *in vitro* de *L. mexicana* et de *L. amazonensis*.

Nos observations préliminaires montraient qu'une chimiorésistance induite sur la forme promastigote du parasite n'était pas toujours conservée au cours du cycle de développement parasitaire. De plus, seules toutes les séquences du cycle évolutif des clones de *L. mexicana* ont pu être réalisées *in vitro*. Ces résultats préliminaires nous ont amené à effectuer une caractérisation fine des formes promastigotes chimiorésistantes de *L. mexicana* et *L. amazonensis*.

Pour ce faire, nous avons sélectionné des clones à différents degrés de résistance à la pentamidine. Nous démontrons pour la première fois que la transmission de la chimiorésistance est modulée en fonction du degré de résistance induite. Le clone le plus fortement résistant de *L. mexicana* perd très rapidement sa résistance après un cycle de développement parasitaire *in vitro*, alors que le clone faiblement résistant la conserve. Ces résultats sont à mettre en relation avec des observations contradictoires portant sur le devenir du caractère résistant à l'arsénite (Detke *et al.*, 1989), à la tunycamycine (Kink et Chang, 1987) et à la sinéfungine (Phelouzat *et al.*, 1993) de différentes espèces de leishmanies après un cycle de différenciation faisant intervenir soit un modèle d'interaction macrophagique *in vitro*, soit un modèle d'infection expérimentale murin. Il est intéressant de constater que la stabilité de la chimiorésistance au cours d'un cycle évolutif *in vitro* peut être corrélée à celle des parasites cultivés à long terme en l'absence de pentamidine. De plus, la différenciation des formes promastigotes fortement résistantes de *L. mexicana* en formes amastigotes s'accompagne d'une perte significative de la résistance (plus de 50%). Une telle résistance est donc en grande partie perdue dès la première étape du déroulement du cycle de différenciation et n'est pas restaurée, même partiellement, par la suite. Ces phénomènes, s'ils ont lieu *in vivo*, pourraient avoir des répercussions considérables sur la transmission des parasites chimiorésistants par les phlébotomes et donc sur leur propagation naturelle.

Chez *Leishmania*, les mécanismes de chimiorésistance impliqués font souvent appel à des amplifications de gènes entraînant une surexpression de leurs produits. Ces amplifications

qui sont souvent extrachromosomales, portent des gènes codant soit pour l'enzyme cible de la drogue soit pour des protéines faisant partie de la famille des P-glycoprotéines. L'implication des P-glycoprotéines dans l'établissement d'une résistance à l'un des médicaments utilisés pour traiter la leishmaniose n'a jamais été clairement démontrée. De plus, aucune étude ne porte sur la transmission d'un tel mécanisme de chimiorésistance au cours du cycle de développement parasitaire. Les formes promastigotes de *L. mexicana* chimiorésistantes à la pentamidine présentaient apparemment un phénotype de multi-résistance, étant donné les nombreuses résistances croisées mises en évidence et l'action sensibilisatrice du vérapamil sur la chimiorésistance. En fait, l'absence d'immunoréactivité aux anticorps monoclonaux C219 et JSB1, spécifiquement dirigés contre un épitope conservé de la famille des P-glycoprotéines (Grögl *et al.*, 1991; Hijazi *et al.*, 1993), démontre clairement que cette dernière n'est pas impliquée dans le mécanisme de résistance à la pentamidine. La régulation de l'entrée de la pentamidine semble être un des mécanismes impliqués dans la chimiorésistance à la pentamidine des formes promastigotes (Basselin *et al.*, 1996; Basselin *et al.*, 1997, in press).

Même s'il est difficile d'étendre les résultats obtenus sur le stade promastigote à ce qui se produit *in vivo* chez un hôte infecté (stade amastigote), ces résultats mettent cependant l'accent sur l'importance d'évaluer la stabilité de la chimiorésistance au cours du cycle avant d'en étudier le mécanisme proprement dit. En effet de telles études permettraient de mieux appréhender l'implication de tels phénomènes dans l'émergence et l'amplification de la chimiorésistance. En réalité, le seul stade parasitaire réellement en contact avec le médicament chez un patient traité est le stade amastigote. C'est donc tout naturellement que dans un deuxième temps, nous avons cherché à induire *in vitro* une chimiorésistance à la pentamidine sur le stade médicalement important de *L. mexicana*.

Connaissant la concentration sérique de la pentamidine (entre 1 et 2 μM) chez les patients traités selon un protocole classique (Waalkes et Devita, 1970; Bronner *et al.*, 1991) et sachant que les macrophages concentrent la pentamidine d'un facteur 6 (Berman *et al.*, 1987), nous avons sélectionné pour notre étude deux variants résistant respectivement à 5 μM et 20 μM de pentamidine. Ces concentrations peuvent donc être considérées comme physiologiques.

Nous démontrons pour la première fois qu'il est possible d'induire par pression médicamenteuse *in vitro* une chimiorésistance sur la forme amastigote des leishmanies. Les variants chimiorésistants de *L. mexicana* présentent des résistances croisées au bérénil et à la primaquine. De part la plus faible sensibilité du stade amastigote de la souche sauvage, les indices de résistance obtenus après sélection sont inférieurs à ceux obtenus avec les formes promastigotes correspondantes. Le vérapamil est incapable de réverser, même de façon partielle, la chimiorésistance des deux mutants étudiés. Cette observation montre que la famille des P-glycoprotéines n'est probablement pas impliquée dans le mécanisme de chimiorésistance induite chez les formes amastigotes de *L. mexicana*. En l'absence de pression médicamenteuse, les variants amastigotes chimiorésistants présentent naturellement un retard significatif dans leur différenciation par rapport à la souche sauvage. La transformation de cette dernière est aussi

inhibée de manière dose-dépendante en présence de pentamidine dans le milieu de culture. La pentamidine était déjà connue pour avoir une action identique sur la différenciation des formes amastigotes isolées de macrophages (Hart *et al.*, 1981). Le mécanisme impliqué dans la chimiorésistance à la pentamidine le serait aussi dans le processus de différenciation des parasites. Il existe des différences majeures dans les caractéristiques phénotypiques des chimiorésistants obtenus par pression médicamenteuse sur les deux stades parasitaires de *L. mexicana*, suggérant que le mécanisme induit chez les amastigotes diffère de celui impliqué dans la chimiorésistance des formes promastigotes.

Comme chez les formes promastigotes il existe une corrélation entre la stabilité du caractère résistant au cours du cycle et le degré de chimiorésistance induite chez les formes amastigotes de *L. mexicana*. Le phénotype de la lignée résistante à 5 μ M de pentamidine est très rapidement perdu après seulement un cycle complet de différenciation alors que celui du variant le plus résistant (20 μ M de pentamidine) est très stable après un et même plusieurs cycles de développement parasitaire. La durée d'un traitement à la pentamidine varie de 1 à 6 mois (OMS, 1990), celle-ci est donc compatible avec les délais d'obtention *in vitro* des deux phénotypes de chimiorésistance. Le temps de sélection est donc un paramètre important à considérer dans l'éventuelle transmission *in vivo* d'un phénotype chimiorésistant. Ces résultats mettent l'accent sur le problème des thérapies mal conduites, pouvant induire un fort degré de chimiorésistance et donc avoir des répercussions dramatiques sur la propagation de telles souches dans la nature. De plus, la différenciation en formes promastigotes, des formes amastigotes présentant un faible degré de résistance, s'accompagne d'une perte quasi totale du caractère résistant, contrairement à ce qui se passe chez le variant fortement résistant. Un faible degré de chimiorésistance induite *in vivo* pourrait passer inaperçue lors de son isolement chez le patient puisqu'il est nécessaire de différencier les amastigotes intracellulaires avant d'effectuer un test permettant d'établir les profils de chimiosensibilité/résistance des parasites. Par contre, les lignées fortement résistantes seraient probablement diagnostiquées. Ces résultats pourraient expliquer la difficulté de relier les cas de non-réponse aux traitements, à un phénomène de chimiorésistance. En effet, une étude effectuée par l'équipe de Jackson (1990) montrait que seul 73 % des tests déterminant les profils de chimiosensibilité concordaient avec les résultats cliniques. Nos observations suggèrent que ces différences seraient dues à la perte du phénotype résistant lors de la différenciation des parasites. Elles montrent que l'apparition et la propagation de la chimiorésistance peuvent être consécutives à une chimiothérapie inadaptée.

Nous avons montré qu'il existait une différence dans la chimiosensibilité et dans la chimiorésistance entre les deux stades parasitaires de *L. mexicana*. L'objectif principal de cette étude était de connaître la transmission potentielle d'une chimiorésistance au cours du cycle de développement parasitaire. De façon intéressante, le mécanisme de chimiorésistance semble être impliqué dans la régulation de la différenciation des parasites. Ces observations sont à rapprocher

de celles effectuées sur les mutants promastigotes chimiorésistants de *L. amazonensis* présentant les caractéristiques d'une souche atténuée.

La perte de d'infectivité des formes promastigotes de *Leishmania amazonensis* résistantes à la pentamidine est associée à un dysfonctionnement du cycle de développement parasitaire. Lors de la sélection et de l'étude des propriétés biologiques des différents clones résistants à la pentamidine, nous avons isolé deux clones de *L. amazonensis* ayant des caractéristiques surprenantes. En effet, leur infectivité *in vitro* vis à vis de macrophages péritonéaux de souris et *in vivo* dans un modèle d'infection expérimentale murin est fortement diminuée selon le degré de chimiorésistance. Le ou les mécanisme(s) responsables du phénotype d'avirulence ont donc été étudié(s).

Des souches atténuées ou avirulentes de leishmanies ont pu être isolées *in vitro* par différentes procédures. La culture à long terme des formes promastigotes s'accompagne d'une perte significative de leur infectivité (Wilson *et al.*, 1989; Liu et Chang, 1992; Sanyal *et al.*, 1994; Heard *et al.*, 1996). Un traitement des parasites à la tunicamycine (TM), inhibiteur de la N-Acetylglucosamine transférase (NAGT) diminue fortement et de façon dose-dépendante l'infectivité des formes promastigotes (Nolan et Farrel, 1985). D'autre part la sélection *in vitro* de clones de *L. chagasi* chimiorésistants à la TM, a aussi conduit à la sélection de clones avirulents (Wilson et Hardin, 1990). Au cours de la métacyclogénèse il a été montré que les parasites de la phase exponentielle de croissance étaient moins infectants aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* que ceux de la phase stationnaire (Kweider *et al.*, 1987). Enfin différents clones avirulents ont pu être isolés par mutation chimique notamment à l'aide de la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (Mc Gurn *et al.*, 1990). L'infectivité des formes promastigotes de leishmanies et l'établissement durable du parasitisme sont dépendants du bon déroulement des différentes étapes du cycle de développement parasitaire; c'est à dire l'attachement aux macrophages par des interactions spécifiques de type ligands-récepteurs, l'internalisation, la différenciation, la survie et la multiplication des formes amastigotes. La virulence du parasite reflète le bon déroulement de toutes ces étapes

La Gp63, métalloprotéase majeure de surface des formes promastigotes, et le lipophosphoglycane (LPG) sont maintenant reconnus comme étant des facteurs de virulence très importants chez *Leishmania*. En effet, outre leur implication directe dans les mécanismes d'attachement aux macrophages, plusieurs études ont confirmé leur participation dans les étapes ultérieures de l'établissement du parasitisme. La perte d'infectivité des formes promastigotes cultivées à long terme s'accompagne d'une diminution de l'expression de la Gp63 et du LPG à la surface des leishmanies (Chang et Chang, 1986; Mc Gwire et Chang, 1994; Chakrabarty *et al.*, 1996), ce qui perturbe leur capacité à adhérer et à pénétrer dans les macrophage. Il en est de même pour les formes promastigotes de la phase exponentielle de croissance par rapport à celles de la phase stationnaire (Kweider *et al.*, 1987). D'autres part, lorsque l'on transfecte des souches exprimant peu de Gp63 à leur surface avec des plasmides contenant le gène de la Gp63,

l'infectivité de ces souches est restaurée (Liu et Chang, 1992). Il est donc bien établi que le niveau d'expression de la Gp63 est directement impliqué dans la virulence des parasites. Connaissant l'implication de la Gp63 dans l'adhésion du parasite au macrophage, des cinétiques d'infectivité *in vitro* ont été réalisées avec les clones virulents et avirulents de *L. amazonensis*. Ces expériences montrent que les lignées chimiorésistantes sont capables de s'attacher aux macrophages, d'y être internalisées et de s'y différencier en formes amastigotes. Cependant, à la différence de la souche sauvage correspondante, elles sont incapables de survivre à l'intérieur des phagolysosomes.

Ainsi, contrairement à la plupart des travaux reliant l'avirulence des parasites à leur incapacité à s'attacher aux macrophages, nous montrons pour la première fois que la perte d'infectivité est associée à leur impossibilité à survivre à l'intérieur des macrophages. Lorsque les lignées résistantes sont soumises à un cycle de développement parasitaire *in vitro*, les formes promastigotes prolifèrent, se différencient, et bien qu'elles soient viables, les formes amastigotes qui en résultent sont incapables de se multiplier. Tout se passe comme si un dysfonctionnement au niveau du stade promastigote induisait soit un arrêt de la prolifération du stade ultérieur, soit court-circuitait l'étape de multiplication du stade amastigote, en les faisant entrer précocement dans une phase de non-division.

Par son activité protéolytique, la Gp63 jouerait un rôle majeur dans la survie des parasites à l'intérieur de la vésicule parasitophore (Chaudhuri *et al.*, 1989, Seay *et al.*, 1996). Elle protégerait les parasites en dégradant notamment les hydrolases présentes dans les macrophages. Un défaut d'activité protéolytique de la Gp63 peut donc être délétère pour les parasites. Chez les clones avirulents, nous avons pu montrer que l'activité métalloprotéasique de la Gp63 persistait et donc ne semblait pas impliquée dans ce phénomène. Par contre, la comparaison des profils protéasiques des souches virulentes et avirulentes révèle l'absence d'une activité due à une métalloprotéase de 54 kDa chez les phénotypes avirulents. Il est intéressant de noter que la métacyclogénèse, étape de maturation conduisant à la formation de parasites très virulents, s'accompagne aussi de l'expression croissante de cette activité métalloprotéasique.

L'hétérogénéité de la Gp63 peut être due soit à des modifications post-traductionnelles mettant en jeu des mécanismes de N-glycosylation, soit à l'expression différentielle de différents gènes codant pour les différentes isoformes de cette protéine.

La Gp63 présente des sites potentiels de glycosylation (Funk *et al.*, 1994; McGwire et Chang, 1996). Il a été montré par exemple que la Gp63 de *L. major* en possédait 3 (Button et McMaster, 1988; Miller *et al.*, 1990). En effet, lorsque nous traitons les formes promastigotes virulentes avec de la tunicamycine (inhibiteur spécifique de la N-glycosylation des protéines) nous concentrons des activités métalloprotéasiques dans la zone de 48-54 kDa qui s'accompagnent d'une disparition de celles situées dans la zone de 60 à 70 kDa. Cette activité métalloprotéasique de 54 kDa correspond vraisemblablement à une étape intermédiaire de N-glycosylation de la Gp63. De la même manière, le traitement de formes promastigotes de *L. major* avec de la TM provoque la disparition de l'activité métalloprotéasique de 63 kDa

consécutive à une concentration d'activité protéasique comprise entre 57 et 59 kDa (Funk *et al.*, 1994). Par ailleurs, l'immunoprécipitation des formes promastigotes de *L. amazonensis* traitées à la tunicamycine à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-Gp63 (6H12), révèle une seule bande de 54 kDa (Kink et Chang, 1987). Il est connu que l'état de glycosylation des parasites et donc de la Gp63 joue un rôle majeur dans la virulence des leishmanies. En effet, l'inhibition de la N-glycosylation par la TM inhibe fortement l'infectivité (Nolan et Farrel, 1985). En contrepartie, des parasites rendus chimiorésistants à la TM ont une infectivité exacerbée en relation avec une surproduction de la NAGT (Kink et Chang, 1987) accompagnée d'une amplification du gène codant pour cette enzyme (Detke *et al.*, 1988). La glycosylation des protéines jouerait plusieurs rôles, notamment dans la protection contre les attaques d'enzymes protéolytiques (Prives et Olden, 1980), dans la sécrétion ou l'adressage des protéines (Yamaguchi *et al.*, 1991) et dans l'expression de l'activité enzymatique (cas pour la phosphatase acide de la levure) (Riedere et Hinnen, 1991). Certains auteurs ont montré qu'une déglycosylation de la Gp63 par une N-glycanase entraînait une diminution significative de l'activité protéasique (Chaudhuri et Chang, 1988), contrairement aux travaux d'Hernandez et al (1992) qui montraient que des parasites traités à la tunicamycine ne conservaient pas leur activité protéolytique. Finalement, une étude plus récente menée par l'équipe de Funk (1994) montre définitivement que la N-glycosylation de la gp-63 n'est pas indispensable à l'expression de son activité protéasique ni à son adressage cellulaire.

Les différentes isoformes de la Gp63 sont codées par une famille de gènes qui sont exprimés de façon différentielle lors de la métacyclogénèse de *L. mexicana* (Medina-Acosta *et al.*, 1993) et de *L. chagasi*. Chez cette dernière espèce, une protéine de 59 kDa exprimant une activité métalloprotéasique est exprimée uniquement chez les promastigotes métacycliques virulents (Roberts *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1995; Streit *et al.*, 1996).

La protéase de 54 kDa caractéristique des formes promastigotes virulentes de *L. amazonensis* pourrait correspondre soit à:

- une étape de glycosylation de la Gp63,
- une isoforme de la Gp63 comme la protéase de 59 kDa trouvée chez *L.*

chagasi.

Des travaux récents effectués dans le laboratoire laissent penser que l'expression différentielle de l'activité protéasique de 54 kDa correspondrait à une étape précoce de glycosylation de la Gp63 qui disparaîtrait chez les mutants avirulents du fait d'une N-glycosylation plus importante. En effet, les clones de *L. amazonensis* chimiorésistants à la pentamidine présentent une résistance croisée significative à la tunicamycine. De plus, lorsque nous traitons les formes promastigotes virulentes avec de la tunicamycine, un retard significatif dans la différenciation de celle-ci en formes amastigotes, ainsi qu'une inhibition spécifique de la phase proliférative de ces dernières sont observés. Ainsi la NAGT et de façon plus générale les mécanismes de glycosylation pourraient réguler la différenciation des parasites ainsi que la prolifération du stade amastigote.

Une étude récente menée sur l'expression des gènes impliqués dans la voie de synthèse du dolichol de *Saccharomyces cerevisiae* (ALG7, ALG1 et ALG2) a montré que ceux-ci jouaient un rôle capital dans la viabilité et la prolifération cellulaire. La perturbation de leur expression bloque spécifiquement la prolifération de ces cellules en phase G1 (Lennon *et al.*, 1995; Kukuruzinska et Lennon, 1994; Pretel *et al.*, 1995). De plus, une augmentation ou une diminution de l'expression de l'activité de la NAGT entraîne une perturbation dans le déroulement du programme de germination des spores de *Saccharomyces cerevisiae* (Kukuruzinska et Lennon, 1995). D'autre part, il a été montré que l'action de la TM pouvait induire un phénomène d'apoptose (mort cellulaire programmée) dans différentes lignées cellulaires, des fibroblastes transformés par SV40, des lignées cancéreuses, ou des neurones sympathiques (Perez-Sala et Mollinedo, 1995; Carlberg *et al.*, 1996; Chang et Koroley, 1996). Ce phénomène d'apoptose a été montré chez différents *Trypanosomatidae* dont *Leishmania* et *Trypanosoma cruzi* (Moreira *et al.*, 1996; Ameisen *et al.*, 1995; Welburn *et al.*, 1997).

Nous avons montré qu'un traitement avec de la TM entraîne un ralentissement de la différenciation de *L. amazonensis* couplé à un arrêt de la prolifération des parasites une fois différenciés. Cet arrêt de la prolifération est spécifique du stade amastigote. La TM induirait donc une diminution de l'infectivité des formes promastigotes non seulement en modifiant le degré de glycosylation de la Gp63 mais surtout en inhibant de façon spécifique la différenciation et la prolifération des formes amastigotes.

Dans l'optique de vérifier l'implication de l'un de ces mécanisme(s) dans le caractère avirulent des phénotypes chimiorésistants à la pentamidine de *L. amazonensis*, il serait intéressant: (i) d'effectuer un dosage de l'activité de la NAGT chez nos parasites virulents et avirulents, (ii) de déterminer l'action de la pentamidine sur la NAGT, (iii) de déterminer si d'autres inhibiteurs spécifiques de différentes étapes de la glycosylation sont capables de bloquer spécifiquement le cycle *in vitro* de développement parasitaire et (iv) étant donné le phénotype des clones chimiorésistants et des parasites traités à la TM, il serait aussi intéressant de voir si nous n'avons pas induit un phénomène d'apoptose chez ces parasites lors de la différenciation.

L'étude des mutants avirulents nous permet d'envisager une étude des facteurs de virulence couplés à la régulation du cycle cellulaire. Ces études nous permettront d'isoler des cibles thérapeutiques précoces et/ou spécifiques de la prolifération des amastigotes. Par ailleurs, la mise en évidence de gènes codant pour des molécules jouant un rôle dans les processus de division et de différenciation parasitaire peut être une approche originale vers l'obtention de souches atténuées, et par conséquent d'une nouvelle génération de vaccins anti-parasitaires.

CHAPITRE 4: REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

CHAPITRE 4: Références bibliographiques

- ADAMS, L.B., HIBBS, J.B., TAINTOR, R.R., KRAHENBUHL, J. 1990. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*: Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J. Immunol.* 144: 2725-2729.
- ADINOLFI, L.E., BONVENTRE, P.F., VANDER PAS, M., EPPSTEIN, D.A. 1985. Synergistic effect of glucantime and liposome-encapsulated muramyl dipeptide analog in therapy of experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.* 48: 409-416.
- ADLER-MOORE, J.P., PROFFITT, R.T. 1993. Development, characterization, efficacy and mode of action of ambisome, an unilamellar liposomal formulation of amphotericin B. *J. Liposome. Res.* 3: 429-450.
- AHMAD, I., AGARWAL, A., PAL, A., GURU, P.Y., BACHHAWAT, B.K., GUPTA, C.M. 1991. Tissue distribution and antileishmanial activity of liposomised amphotericin B in BALB/c mice. *J. Biosci.* 14: 217-221.
- ALEXANDER, J., RUSSEL, D. 1992. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv. Parasitol.* 31: 175-254.
- ALMQUIST, K.C., LOE, D.W., HIPFNER, D.R., MACKIE, J.E., COLE, S.P.C., DEELEY, R.G. 1995. Characterization of the Mr 190,000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cells. *Canc. Res.* 55: 102-110.
- ALVAR, J. 1994. Leishmaniasis and AIDs Co-infection: the Spanish example. *Parasitol. Today.* 10:160-163.
- ALVING, C.R., STECK, E.A., CHAPMAN, Jr W.L., WAITS, V.B., HENDRICKS, L.D., SWARTZ, G.M., HANSON, L. 1978. Therapy in leishmaniasis superior efficacies of liposome-encapsulated drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 2959-2963.
- AMEISEN, J.C., IDZIORECK, T., BILLAUT-MULOT, O., LOYENS, M., TISSIER, J.P., POTENTIER, A., OUAISSI, A. 1995. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implication for evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation differentiation and survival. *Cell. Death. Differ.* 2: 285-300.
- ANDERSEN, K.A., BRITIGAN, B.E., WILSON, M.E. 1996. Short report: regulation of inducible heat shock protein 70 genes in *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med & Hyg.* 54: 471-474.
- ANEES, M., STEVEN, F.S. 1994. Inhibition of a tumor protease with 3,4-dichloroisocoumarin, pentamidine-isethionate and guanidino derivative. *J. Enzyme. Inhibition.* 8: 213-221.
- ANTOINE, J.C., PRINA, E., JOUANNE, C., BONGRAND, P. 1990. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect. Immun.* 58: 779-787.
- ANTOINE, J.C., JOUANNE, C., RYTER, A., ZILBERFAB, V. 1987. *Leishmania mexicana*: a cytochemical and quantitative study of lysosomal enzymes in rat bone marrow-derived macrophages. *Exp. Parasitol.* 64: 485-498.
- ARREBOLA, R., OLMO, A., RECHE, P., GARVEY, E.P., SANTI, D.V., RUIZ-PEREZ, L.M., GONZALEZ-PACANOWSKA, D. 1994. Isolation and characterization of a mutant

dihydrofolate reductase-thymidilate synthetase from methotrexate-resistant *Leishmania* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **269**: 10590-10596.

ATKINSON, A.J., BENETT, J.E. 1978. Amphotericin B pharmacokinetics in humans. *Antimicrob. Agents & Chemother.* **13**:271-276.

BADARO, R., JOHNSON Jr, W.D.(1993) The role of interferon gamma in the treatment of visceral and difuse cutaneous leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **167** (suppl.): S13-17.

BADARO, R., FALCOFF, E., BADARO, F.S., CAEVALHO, J.S., BARRAL-NETTO, M. 1990. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. *N. Engl. J. Med.* **322**: 16-21.

BAILY, G.G., NANDY, A. 1991. Visceral leishmaniasis: more prevalent and more problematic. *J. Infect.* **29**: 241-247.

BALANA FOUCE, R., ALUNDA, J.M. 1991. The antiproliferative effect of berenil on *Leishmania infantum* promastigotes is not reverted by exogenous polyamines. *Med. Sci. Res.* **19**: 815-816.

BALANA FOUCE, R., GARZON, M.T., GARRIDO, A., ORDONEZ, D. 1986. Inhibition of diamine oxidase and S-adenosyl methionine decarboxylase by diminazene aceturate (berenil). *Biochem. Pharmacol.* **35**: 1597-1600.

BANYAL, H.S., INSELBURG, J. 1986. *Plasmodium falciparum*: induction, selection, and characterization of pyrimethamine-resistant mutants. *Exp. Parasitol.* **62**:61-70.

BARNES, D.A., FOOTE, S.J., GALATIS, D., KEMP, D.J., COWMAN, A.F. 1992. Selection for high level chloroquine resistance results in déamplification of the pfmdr1 gene and increased sensitivity to mefloquine in *Plasmodium falciparum*. *EMBO. J.* **11**: 3067-3075.

BASSELIN, M., LAWRENCE, F., ROBERT-GERO, M. 1996. Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Biochem. J.* **315**: 631-634.

BASSELIN, M., LAWRENCE, F., ROBERT-GERO, M. 1997. Characterization of pentamidine-resistant *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Parasitol. Research.*

BATES, P.A. 1993. Axenic culture of *Leishmania* amastigotes. *Parasitol Today.* **9**: 143-146.

BATES, P.A., ROBERTSON, C.D., TETLEY, L., COOMBS, G.H. 1992. Axenic cultivation and cheracterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitol.* **105**: 193-202.

BELL, C.A., HALL, J.E., KYLE, D.E., GROGL, M., OHMENG, K.A., ALLEN, M.A., TIDWELL, R.R. 1990. Structure-activity relationships of analogs of pentamidine against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania mexicana amazonensis*. *Antimicrob. Agents & Chemother.* **34**: 1381-1386.

BELLO, A.R., BAKELA, NARE, FREEDMAN, D., HARDY, L., BEVERLEY, S.M. 1994. PTR1: A reductase mediating salvage of oxidized pteridines and methotrexate resistance in the protozoan parasite *leishmania major*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 11442-11446.

BENSON, T.J., McKIE, J.H., GARFORTH, J., BORGES, A., FAIRLAMB, A.H., DOUGLAS, K.T. 1992. Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase. *Biochem. J.* **286**: 9-11.

BERENGER, J., MORENO, S., CERCENADO, E., BERNALDO DE QUIROS, J.C.L., DE LA FUENTA, A.G., BOUZA, E. 1989. Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV). *Ann. Int. Med.* **111**: 129-132.

BERGER, B.J., LOMBARDY, R.J., MARBURY, G.D., BELL, C.A., DYKSTRA, C.C., HALL, J.E., TIDWELL, R.R. 1990a. Metabolic N-hydroxylation of pentamidine *in vitro*. *Antimicrob. Agents & Chemother* **34**: 1678-1684.

BERGER, B.J., REDDY, V.V., LE, S.T., LOMBARDY, R.J., HALL, J.E., TIDWELL, R.R. 1990b. Hydroxylation of pentamidine by rat liver microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **256**: 883-889.

BERHE, N., ALI, A., HAILU, A., YENENEH, H. 1994. Relapse in ethiopian visceral leishmaniasis after therapy with pentavalent antimonials: a ten year observation. *Acta. Trop.* **57**: 83-90.

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.

BERMAN, J.D., HANSON, L., CHAPMAN, Jr W.L., ALVING, C.R., LOPEZ-BERENSTEIN, G. 1986. Antileishmanial activity of liposome-encapsulated amphotericin B in hamsters and monkeys. *Antimicrob. Agents & Chemother.* **30**: 847-851.

BERMAN, J.D., GALLALEE, J.V. 1985. Semiautomated assessment of *in vitro* activity of potential antileishmanial drugs. *Antimicrob. Agents & Chemother.* **28**: 723-726.

BERMAN, J.D., WADDEL, D., HANSON, B.D. 1985b. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob. Agents & Chemother.* **27**: 916-920.

BERMAN, J.D., AIKAWA, M. 1984. Activity of immunoglobulin G-coated red cell ghost containing pentamidine against macrophage-contained *Leishmania in vitro*. *Am. J. Trop. Med & Hyg.* **33**: 1112-1118.

BERMAN, J.D., WYLER, D.J. 1980. An *in vitro* model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. *J. Inf. Dis.* **142**: 83-86.

BEVERLEY, S.M. 1991. Gene amplification in *Leishmania*. *Ann. Rev. Microbiol.* **45**: 417-444.

BEVERLEY, S.M., ELLENBERGER, T.E., IOVANNISCI, D.M., KAPLER, G.M., PETRILLO-PEIXOTO, M., SINA, B.J. 1988. Gene amplification in *Leishmania*. *The Biologie of Parasitism*. 431-448.

BEVERLEY, S.M., ELLENBERGER, T.E., CORDINGLEY, J.S. 1986. Primary structure of the gene encoding the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidilate synthetase of *Leishmania major*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 2584-2588.

BEVERLEY, S.M., CODERRE, J.A., SANTI, D.V., SCHIMKE, R.T. 1984. Unstable DNA amplifications in methotrexate-resistant *Leishmania* consist of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization. *Cell*. **38**: 431-439.

BITONTI, A.J., DUMONT, J.A., McCANN, P.P. 1986. Characterization of *Trypanosoma brucei brucei* S-Adenosyl-L-methionine decarboxylase and its inhibition by Berenil, pentamidine and Methylglyoxal bis (guanylhydrazone). *Biochem. J.* **237**: 685-689.

BLACK, C.D.V., WATSON, G.J., WARD, R.J. 1977. The use of Pentostam liposomes in the chemotherapy of experimental leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med & Hyg.* **79**: 606-612.

BLACKWELL, J., McMAHON-PRATT, D., SHAW, J. 1986. Molecular biology of *Leishmania*. *Parasitol. Today*. **2**: 45-53.

BLANC, M.P. 1993. Culture continue des formes amastigotes de *Leishmania amazonensis* en condition axénique: Caractérisation morphologique, biochimique, immunologique et biologique. Mémoire de DEA. Université de Lille.

BOTTASSO, O.A., CABRINI, J.M., FALCOFF, E., FALCOFF, R. 1992. Successful treatment of an antimony resistant american mucocutaneous leishmaniasis: a case report. *Arch. Dermatol.* **128**: 996-997.

BOUVIER, J., ETGES, R., BORDIER, C. 1987. Identification of the promastigote surface protease in seven species of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **24**: 73-79.

BRAJTBURG, J., POWDERLY, W., KOBAYASHI, G.S., MEDOFF, G. 1990. Amphotericin B: Current understanding of action. *Antimicrob. Agents & Chemother.* **34**: 183-188.

BRITTINGHAM, A., MOSSER, D.M. 1996. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol. Today*. **12**: 444-447.

BRODIN, T.N., HEATH, S., SACKS, D.L. 1992. Genes selectively expressed in the infectious (metacyclic) stage of *leishmania major* promastigotes encode a potential basic-zipper structural motif. *Mol. Biochem. Parasitol.* **52**: 241-250.

BRONNER, U., DOUA, F., ERICSSON, O., GUSTAFSSON, L.L., MIEZAN, T.W., RAIS, M., ROMBO, L. 1991. Pentamidine concentrations in plasma, whole blood and cerebrospinal fluid during treatment of *Trypanosoma gambiense* infection in cote d'ivoire. *Trans. Roy. soc. Trop. Med & Hyg.* **85**: 608-611.

BRYCESON, A. 1987. "Therapy in man". in *The leishmaniasis in biology and medicine*. vol 2. Ed, PETERS, W., KILLICK-KENDRICK, R. Chap 18, 847-907.

BURCHMORE, R.J.S., HART, D.T. 1995. Glucose transport in amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **74**: 77-86.

BURGUERA, J.L., BURGUERA, M., PETIT DE PENA, Y., LUGO, A., ANEZ, N. 1993. Selective determination of antimony (III) and antimony (V) in serum and urine and of total antimony in skin biopsies of patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Trace. Elem. Med.* **10**: 66-70.

BUTTON, L.L., McMASTER, W.R. 1988. Molecular cloning of the major surface antigen of *Leishmania*. *J. Exp. Med.* **167**: 724-729.

- CALLAHAN, H.L., ROBERTS, W.L., RAINEY, P.M., BEVERLEY, S.M. 1994. The PgpA gene of *Leishmania major* mediates antimony (SbIII) resistance by decreasing influx and not by increasing efflux. *Mol. Biochem. Parasitol.* **68**: 145-149.
- CALLAHAN, H.L., BEVERLEY, S.M. 1992. A member of the aldehyde reductase family confers methotrexate resistance in *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* **267**: 24165-24168.
- CALLAHAN, H.L., BEVERLEY, S.M. 1991. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* **266**: 18427-18430.
- CARLBERG, M., DRICU, A., BLEGEN, H., KASS, G.E., ORRENIUS, S., LARSSON, O. 1996. Short-exposure to tunicamycin induce apoptosis in SV40-transformed but not in normal human fibroblasts. *Carcinogenesis*. **17**: 2589-2596.
- CAUGHEY, G.H., RAYMOND, W.W., BACCI, E., LOMBARDY, R.J., TIDWELL, R.R. 1993. Bis(5-amidino-2-benzimidazolyl)methane and related amidines are potent, reversible inhibitors of mast cell tryptases. *J. Pharmacol. & Exp. Ther.* **264**: 676-681.
- CHAKRABARTY, R., MURKHERJEE, H.G., MCGWIRE, B.S., CHANG, K.P., BASU, M.K. 1996. Kinetics of entry of virulent and avirulent strains of *Leishmania donovani* into macrophages: a possible role of virulence molecules (Gp63 and LPG). *J. Parasitol.* **82**: 632-635.
- CHAKRABORTY, A.K., MAJUMBER, H.K. 1987. Decatenation of kinetoplast DNA by an ATP-dependent DNA topoisomerase from the kinetoplast hemoflagellate *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **26**: 215-224.
- CHANG, J.Y., KOROLEV, V.V. 1996. Specific toxicity of tunicamycin in induction of programmed cell death of sympathetic neurons. *Exp. Neuro.* **137**: 201-211.
- CHANG, C.S., CHANG, K.P. 1986. Monoclonal antibody affinity purification of a *Leishmania* membrane glycoprotein and its inhibition of *Leishmania*-macrophage binding. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. **83**: 100-104.
- CHANG, K.P., FONG, D., BRAY, R.S. 1985. Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. in leishmaniasis. (Chang, K.P., BRAY, R.S. eds). *Amsterdam, Elsevier Biomedical*. pp 1-27.
- CHATELAIN, R., VARKLA, K., COFFMAN, R.L. 1992. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. *J. Immunol.* **148**: 1182-1187.
- CHAUDURI, G., CHAUDURN, M., PAN, A., CHANG, K.P. 1989. Surface acid proteinase (Gp63) of *Leishmania mexicana*. a metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *J. Biol. Chem.* **264**: 7483-7494.
- CHAUDHURI, G., CHANG, K.P. 1988. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (Gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **27**: 43-52.
- CHEN, G., MUELLER, C., WENDLINGER, M., ZOLG, J.W. 1987. Kinetic and molecular properties of the dihydrofolate reductase from the pyrimethamine-sensitive and pyrimethamine-resistant clones of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Pharmacol.* **31**: 430-437.
- CHOW, L.M.C., WONG, A.K.C., ULLMAN, B., WIRTH, D.F. 1993. Cloning and functional analysis of an extrachromosomally amplified multidrug resistance-like gene in *Leishmania enriettii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **60**: 195-208.

CHULAY, J.D., FLECKENSTEIN, L., SMITH, D.H. 1988. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med & Hyg.* **82**: 69-72.

CHUNGE, C.N., GACHIHI, G., MUIGAI, R., WASUNA, K., RASHID, J.R., CHULAY, J.D., ANABWANI, G., OSTER, C.N., BRYCESON, A.D.M. 1985. Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonials drugs III. Successful treatment using a combination of sodium stibogluconate plus allopurinol. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med & Hyg.* **79**: 715-718.

CLARK, I.A., ROCKETT, K.A. 1996. Nitric oxide and parasitic disease. *Adv. Parasitol.* **37**: 1-56.

CLEMENT, C., JUNG, F. 1994. N-hydroxylation of the antiprotozoal drug pentamidine catalyzed by rabbit liver cytochrome P-450 2C3 or human liver microsomes, microsomal retroreduction, and further oxidative transformation of the formed amidoximes. *Drug. Metab. Dispo* **22**: 486-497.

CODERRE, J., BEVERLEY, S.M., SCHIMKE, R.T., SANTI, D.V. 1983. Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 2132-2136.

COLE, S.P.C., BARDWAJ, G., GERLACH, J.H., MACKIE, J.E., GRANT, C.E., ALMQUIST, K.C., STEWART, A.J., KURZ, E.U., DUNCAN, A.M.V., DEELEY, R.G. 1992. Overexpression of a transporter gene in multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* . **258**: 1650-1654.

COLE, S.P.C., SPARKS, K.E., FRASER, K., LOE, D.W., GRANT, C.E., WILSON, G.M., DEELEY, R.G. 1994. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Canc. Res* . **54**: 5902-5910.

COONS, T., HANSON, S., BITONTI, A.J., Mc CANN, P.P., ULLMAN, B. 1990. Difluoromethyl ornithine resistance in *Leishmania donovani* is associated with increased ornithine decarboxylase activity. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**: 77-90.

CORY, M., TIDWELL, R.R., FAIRLEY, T.A. 1992. Structure and DNA binding activity of analogues of 1,5-bis(4-aminophenoxy)pentane (pentamidine). *J. Med. Chem.* **33**: 1252-1257.

COULSON, R.M.R., CONNOR, V., CHEN, J.C., AJIOKA, J.W. 1996. Differential expression of *Leishmania major* β -tubulin genes during the acquisition of promastigote infectivity. *Mol. Biochem. Parasitol.* **82**: 227-236.

COULSON, R.M., SMITH, D.F. 1990. Isolation of genes showing increased or unique expression in the infective promastigotes of *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **42**: 63-75.

COUVREUR, P. 1993. Liposomes en clinique humaine: le point sur les résultats thérapeutiques. In: Les liposomes. Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques. Delatre J., Couvreur P., Puisieux F., Philippot J.-R et Schuber F. (Eds.) INSERM. Paris. pp 215-224.

COWMAN, A.F. 1991. The P-glycoprotein homologues of *Plasmodium falciparum*: are they involved in chloroquine resistance? *Parasitol. Today.* **7**: 70-75.

- COWMAN, A.F., GALATIS, D., THOMPSON, J.K. 1994. Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 1143-1147.
- CROFT, S.L., DAVIDSON, R.N., THORNTON, E.A. 1991. Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* **28**: 111-118.
- CROFT, S.L., BRAZIL, R.P. 1982. Effect of pentamidine isethionate on the ultrastructure and morphology of *Leishmania mexicana amazonensis* in vitro. *Ann. Trop. Med & Parasitol.* **37**: 43.
- CUBRIA, J.C., BALANA FOUCÉ, R., ALVAREZ-BUJIDOS, M.L., NEGRO, A., ORTIS, A.I., ORDONEZ, D. 1993. Aromatic diamidine are reversible inhibitors of porcine kidney diamine oxydase. *Biochem. Pharmacol.* **45**: 1355-1357.
- DA SILVA, R.P., HALL, P.F., JOINER, K., SACKS, D.L. 1989. CR1, the C3b receptor mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J. Immunol.* **143**: 617-622.
- DAVIDSON, R.N., CROFT, S.L., SCOTT, A.G., MAINI, M., MOODY, A.H., BRYCESON, A.D.M. 1991. Liposomal amphotericin B in drug resistant visceral leishmaniasis. *Lancet.* **337**: 1061-1062.
- DE GORGOLAS, M., MILES, M.A. 1994. Visceral leishmaniasis and AIDS. *Nature.* **372**: 734.
- DE GORGOLAS, M., CASRILLO, J.M., GUERRERO, J.M.F. 1993. visceral leishmaniasis in patients with AIDS: report of three cases treated with pentavalent and INF- γ . *Clin. Inf. Dis.* **17**: 56-59.
- DELLAMONICA, P., QUARANTA, J.F., LE FICHOUX, Y. 1990. Traitement de la leishmaniose viscérale. Chimiothérapie de parasitoses sévères en 1990. Journées de l'hôpital Claude-Bernard, Paris, novembre 1990.
- DESCOTEAUX, A., TURCO, S.J. 1993. The lipophosphoglycan of *leishmania* and macrophage protein kinase C. *Parasitol Today.* **9**: 468-471.
- DETKE, S., KATAKURA, K., CHANG, K.P. 1989. DNA amplification in arsenite-resistant *Leishmania*. *Exp. Cell. Res* **180**: 161-170.
- DETKE, S., CHAUDHURI, G., KINK, J.A., CHANG, K.P. 1988. DNA amplification in tunicamycin-resistant *Leishmania mexicana*. Multipcopies of a single 63-kilobase supercoiled Molecule and their expression. *J. Biol. Chem.* **263**: 3418-3424.
- DEY, S., OUELLETTE, M., LIGHTBODY, J., PAPADOPOULOU, B., ROSEN, B.P. 1996. An ATP-dependent As(III)-glutathione transport system in membrane vesicles of *Leishmania tarentolae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 2192-2197.
- DOCAMPO, R., MORENO, S.N.J. 1996. The role of Ca²⁺ in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasitol. Today.* **12**: 61-65.
- DYKSTRA, C.C., TIDWELL, R.R. 1991. Inhibition of topoisomerase from *Pneumocystis carinii* by aromatic diacationic molecules. *J. Protozool.* **38**: 78S-81S.
- EI-ON, J., JACOBS, G.P., WEINRAUCH, L. 1988. Topical chemotherapy of cutaneous leishmaniasis. *Parasitol. Today.* **4**: 76-81.

- ELLEMBERGER, T.E., BEVERLEY, S.M. 1987. Reductions in methotrexate and folate influx in methotrexate-resistant lines of *Leishmania major* are independent of R or H region amplification. *J. Biol. Chem.* **262**: 13501-13506.
- ELLEMBERGER, T.E., BEVERLEY, S.M. 1989. Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* **264**: 15094-15103.
- ELLIOTSON, J. 1844. The principles and practice of medicine, p276, Carry & Hart.
- ENDICOTT, J.A., LING, V. 1989. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 137-171.
- EPERON, S., McMAHON-PRATT, D. 1989. Extracellular cultivation and morphological characterization of amastigote-like forms of *Leishmania panamensis* and *L. braziliensis*. *J. Protozool.* **36**: 502-510.
- ETGES, R., BOUVIER, J., BERDIER, C. 1986. The major surface protein of *Leishmania* promastigote is a protease. *J. Biol. Chem.* **261**: 9098-9101.
- EUZEBY, J. 1986. Protozoologie médicale comparée. Vol I. col Fondation Marcel Merieux.
- FAIRLAMB, A.H. 1990. Trypanothione metabolism and rational approaches to drug design. *Biochem. Soc. Trans.* **18**: 717-719.
- FALCOFF, E., BERNABO, J., BOTTASSO, O. 1993. L'interferon γ transforme le pronostic des patients atteints de leishmaniose chimiorésistante. *Médecine/Santé.* **9**: 1214-1217.
- FERREIRA-PINTO, K.C., MIRANDA-VILELA, A.L., ANACLETO, C., FERNANDES, A.P.S.M., ABDO, M.C.B., PETRILLO-PEIXOTO, M.L., MOREIRA, E.S.A. 1996. *Leishmania (V.) guyanensis*: isolation and characterization of glucantime-resistant cell lines. *Can. J. Microbiol.* **42**: 944-949.
- FLIN, H.M., SMITH, D.F. 1992. Genomic organisation and expression of a differentially regulated gene family from *Leishmania major*. *Nucl. Acids. Res.* **20**: 755-762.
- FOOTE, S.J., THOMPSON, J.K., COWMAN, A.F., KEMP, D.J. 1989. Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell.* **57**: 921-930.
- FUNK, V.A., JARDIM, A., OLOFSOM, R?W. 1994. An investigation into the significance of the N-linked oligosaccharides of *Leishmania* gp 63. *Mol. Biochem. Parasitol.* **63**: 23-35.
- GAMARRO, F., CHIQUERO, M.J., AMADOR, M.V., LEGARE, D., OUELLETTE, M., CASTANYS, S. 1994. P-glycoproteine overexpression in Methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Biochem. Pharmacol.* **47**: 1939-1947.
- GARFORTH, J., McKIE, J.H., JAOUHARI, R., BENSON, T.J., FAIRLAMB, A.H., DOUGLAS, K.T. 1994. Rational design of peptide-based inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal drugs. *Amino-Acids.* **6**: 295-299.
- GEBRE-HIWOT, A., TADESSE, G., CROFT, S.L., FROMMEL, D. 1992. An *in vitro* model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. *Acta- Trop.* **51**: 237-245.

- GIACCHINO, R., GIAMBARTOLOMEI, G., TASSO, L., CASTAGNOLA, E., BRISIGOTTI, M., MICALIZZI, C. 1993. Treatment with liposomal amphotericin B of a child affected with drug-resistant visceral leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med & Hyg.* **87**: 310.
- GLASER, T.A., BAATZ, J.E., KREISHMAN, G.P., MUKKADA, A.J. 1988. Ph homeostasis in *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 7602-7606.
- GLAUMANN, H., BRONNER, U., ERICSSON, Ö., GUSTAFSSON, L.L., ROMBO, L. 1994. Pentamidine accumulates in rat liver lysosomes and inhibits phospholipid degradation. *Pharmacol. Toxicol.* **74**: 17-22.
- GOAD, L.J., HOLZ, G.G., BEACH, D.H. 1984. Stérols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **10**: 161-170.
- GOODWIN, L.G. 1995. Pentostam® (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. *Trans. roy. Soc. Trop. Med & Hyg.* **89**: 339-341.
- GOODWIN, L.G. 1945. The chemotherapy of experimental leishmaniasis. II. A dose response curve for the activity of sodium stibogluconate. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med & Hyg.* **39**: 133-145.
- GOODWIN, L.G., PAGE, J.E. 1943. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem. J.* **22**: 236-240.
- GOTTESMAN, M.M., PASTAN, I. 1988. The multidrug transporter, a double-edged sword. *J. Biol. Chem.* **263**: 12163-12166.
- GREEN, S.J., SCHELLER, L.F., MARLETTA, M.A., SEGUN, M.C., KLOTZ, F.W., SLAYTER, M., NELSON, B.J., NACY, C. 1990. Nitric oxide: Cytokine-regulation on nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol. Letters.* **43**: 87-94
- GREENIDGE, P.A., JENKINS, T.C., NEIDLE, S. 1993. DNA minor groove recognition properties of pentamidine and its analogs: a molecular modeling study. *Mol. Pharmacol.* **43**: 982-988.
- GROGL, M., MARTIN, R.K., ODUOLA, A.M.J., MILHOUS, W.K., KYLE, D.E. 1991. Characteristics of multidrug resistance in *plasmodium* and *Leishmania*: detection of P-glycoprotein-like components. *Am. J. Trop. Med & Hyg.* **45**: 98-11.
- GROGL, M., ODUOLA, A.M.J., CORDERO, L.D.C., KYLE, D.E. 1989. *Leishmania spp*: Development of Pentostam-resistant clones *in vitro* by discontinuous drug exposure. *Exp. Parasitol.* **69**: 78-90.
- GURU, P.Y., AGRAWAL, A.K., SINGHA, U.K., SINGHAL, A., GUPTA, C.M. 1989. Drug targeting in *Leishmania donovani* infections using tftusin-bearing liposomes as drug vehicles. *FEBS. Lett.* **245**: 204-208.
- GYANG, F.N., PETERSON, D.S., WELLEM, T.E. 1992. *Plasmodium falciparum*: Rapid detection of dihydrofolate reductase mutation that confer resistance to cycloguanil and pyrimethamine. *Exp. Parasitol.* **74**: 470-472.
- HAIDARIS, C.G., BONVENTRE, P.F. 1983. Efficacy of combined immunostimulation and chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop & Hyg.* **32**: 327-340.

- HANDMAN, E., GODWIN, J.W. 1985. The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *EMBO. J.* 4: 329-336.
- HANSON, S., ADEMAN, J., ULLMAN, B. 1992a. Amplification and molecular cloning of the ornithine decarboxylase gene of *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 267: 2350-2359.
- HANSON, S., BEVERLEY, S.M., WAGNER, W., ULLMAN, B. 1992b. Unstable amplification of two extrachromosomal elements in α -difluoromethylornithine-resistant *Leishmania donovani*. *Mol. Cell. Biol.* 12: 5499-5507.
- HART, D.T., VICKERMAN, K., COOMBS, G.H. 1981. Transformation *in vitro* of *Leishmania mexicana* amastigotes to promastigotes: nutritional requirements and the effect of drugs. *Parasitology*. 83: 529-543.
- HEARD, P.L., LEWIS, C.S., CHAUDHURI, B. 1996. *Leishmania mexicana amazonensis*: Differential display analysis and cloning of mRNAs from attenuated and infective forms. *J. Euk. Microbiol.* 43: 409-415.
- HEINZEL, F.P., SADICK, M.D., MUTHA, S.S., LOCKSLEY, R.M. (1991). Production of interferon- γ , interleukine 2, interleukine 4, and interleukine 10 by CD4⁺ lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 7011-7015.
- HELENE, C., SAISON-BEHMOARAS, E. 1994. La stratégie antisens : nouvelles approches thérapeutiques. *Médecine/Santé.* 10: 253-273.
- HENDERSON, D.M., SIFRI, C.D., RODGERS, M., WIRTH, D.F., HENDRICKSON, N., ULLMAN, B. 1992. Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian *mdr 1* gene. *Mol. Cell. Biol.* 12: 2855-2865.
- HENDERSON, G.B., FAIRLAMB, A.H. 1987. Trypanothione metabolism: a chemotherapeutic target in trypanosomatids. *Parasitol. Today.* 3: 312-315.
- HENTZER, B., KOBAYASHI, T. 1977. The ultrastructural changes of *Leishmania tropica* after treatment with pentamidine. *Ann. Trop. Med & Parasitol.* 71: 157-166.
- HERNANDEZ, D., RODRIGUEZ, N., MARTINEZ, C., GARCIA, L., CONVIT, J. 1993. *Leishmania braziliensis* causing visceral leishmaniasis in a patient with human immunodeficiency virus infection, identified with the aid of the polymerase chain reaction. *Trans. Roy. soc. Trop. Med & Hyg.* 87: 627-628.
- HERNANDEZ, C., MANENTI, S., HERNANDEZ, A.G. 1992. The effect of tunicamycin on the protease activity of Gp63 from *Leishmania major*. *Mol. Biol. Reports.* 16: 81-84.
- HERWALDT, B., BERMAN, J.D. 1992. Recommendation for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am. J. Trop. Med & Hyg.* 46: 296-306.
- HIBBS, J. B., TAINTOR, R. R., VAVRIN, Z., RACHLIN, E. M. 1988. Nitric oxide a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 157: 87-94.
- HIBBS, J. B., VAVRIN, Z., AND TAINTOR, R. R. 1987. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition of target cells. *J. Immunol.* 138: 550-565.

- HIGHTOWER, R.C., RUIZ-PEREZ, L.M., WONG, M.L., SANTI, D.V. 1988. Extrachromosomal elements in the lower eukaryote *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* **263**: 16970-16976.
- HIJAZI, Y.M., AXIOTIS, C.A., NAVARRO, S., STEINBERG, S.M., HOROWITZ, M.E., TSOKOS, M. 1993. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in Ewing's Sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors before and after chemotherapy. *Anatomic. pathology.* **102**: 61-67.
- HIPFNER, D.R., GAULDIE, S.D., DEELEY, R.G., COLE, S.P.C. 1994. Detection of the Mr 190,000 multidrug resistance protein, MRP, with monoclonal antibodies. *Canc. Res.* **54**: 5788-5792.
- HO, J.L., BADARO, R., HATZIGEORGIOU, D., REED, S.G., JOHNSON Jr, W.D. 1994. Cytokine in the treatment of leishmaniasis: from studies of immunopathology to patient therapy. *Biotherapy.* **7**: 223-235.
- HOCKERTZ, S., FRANK, G., PAULINI, I., LOHMANN-MATHES, M.L. 1991. Immunotherapy of murine visceral leishmaniasis with recombinant interferon- γ and MTP-PE encapsulated in liposome. *J. Interferon. Res.* **11**: 177-185.
- HSIEH, C.Y., MACATONIA, S.E., TRIPP, C.S., WOLFF, S.F., O'GARA, A., MURPHY, K.M. 1993. Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science.* **260**: 547-549.
- HUNTER, K.W., COOK, C.L., HAYUNGA, E.G. 1984. Leishmanial differentiation *in vitro*: Induction of heat shock proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **125**: 755-760.
- HYDE, J.E. 1989. Point mutations and pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today.* **5**: 252-255.
- IGNARRO, L.J. 1989. Endothelium-derived nitric-oxide: pharmacology and relationship to the action of organic nitrate esters. *Pharm. Res.* **6**: 651-659.
- INSELBURG, J., BZIK, D.J., HORII, T. 1987. Pyrimethamine resistant *Plasmodium falciparum*: overproduction of dihydrofolate reductase by a gene duplication. *Mol. Biochem. Parasitol.* **26**: 121-134.
- International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group.(1991). A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. *N. Engl. J. Med.* **324**: 509-516.
- JACKSON, J.E., TALLY, J.D., ELLIS, W.Y., MEBRAHTU, Y.B., LAWYER, P.G., WERE, J.B., REED, S.G., PANISKO, D.M., LIMMER, B.L. 1990. Quantitative *in vitro* drug potency and drug susceptibility evaluation of *Leishmania spp*: from patients unresponsive to pentavalent antimony therapy. *Am. J. Trop. Med & Hyg.* **43**: 464-480.
- JAMES, S.L., GLAVEN, J. 1989. Macrophages cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J. Immunol.* **143**: 4208-4212.
- JENKINS, T.C., LANE, N., NEIDLE, S., BROWN, D.G. 1993. NMR and molecular studies of the interaction of berenil and pentamidine with d(CGCAAATTTGCG)₂. *J. Biochem.* **213**: 1175-1184.

JONES, H.E., BLUNDELL, G.K., WYATT, I., JOHN, R.A., FARR, S.J., RICHARDS, R.J. 1992. The accumulation of pentamidine into rat lung slices and its interaction with putrescine. *Biochem. Pharmacol.* **43**: 431-437.

KAGER, P.A., REES, P.H., WELLDE, B.T., HOCKMEYER, W.T., LYERLY, W.H. 1981. Allopurinol in the treatment of visceral leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med & Hyg.* **75**: 556-559.

KARVONEN, E., KAUPPINEN, L., PARTANEN, T., PÖSÖ, H. 1985. Irreversible inhibition of putrescine-stimulated S-Adenosyl-L-methionine decarboxylase by berenil and pentamidine. *Parasitol. Res.* **231**: 165-169.

KATAKURA, K., PENG, Y., PITHAWALLA, R., DETKE, S., CHANG, K.P. 1991. Tunicamycin-resistant variants from five species of *Leishmania* contain amplified DNA in extrachromosomal circles of different sizes with a transcriptionally active homologous region. *Mol. Biochem. Parasitol.* **44**: 233-244.

KATAKURA, K., CHANG, K.P. 1989. H DNA amplification in *Leishmania* resistant to both arsenite and methotrexate. *Mol. Biochem. Parasitol.* **34**: 189-192.

KAUR, K., COONS, T., EMMET, K., ULLMAN, B. 1988. Methotrexate resistant *Leishmania donovani* genetically deficient in the folate methotrexate transporter. *J. Biol. Chem.* **263**: 7020-7028.

KINK, J.A., CHANG, K.P. 1987. Biological and Biochemical characterization of tunicamycin-resistant *Leishmania mexicana*: mechanism of drug resistance and virulence. *Infect. Immun.* **55**: 1692-1700.

KINK, J.A., CHANG, K.P. 1987. Tunicamycin-resistant *Leishmania mexicana amazonensis*: Expression of virulence associated with an increased activity of N-acetylglucosaminyltransferase and amplification of its presumptive gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 1253-1257.

KIRK, R., SATI, M.H. 1940. The use of certain aromatic diamidines in the treatment of kala-azar. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **34**: 181-197.

KOBAYASHI, G.S., MEDOFF, G. 1977. Antifungal agents: Recent developments. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**: 291-308.

KRAUSE, G., KROEGER, A. 1994. Topical treatment of american cutaneous leishmaniasis with paromomycin and methylbenzethonium chloride: a clinical study under field conditions in Ecuador. *Trans. Roy. soc. trop. Med & Hyg.* **88**: 92-94.

KURKURUZINSKA, M.A., LENNON, K. 1995. Diminished activity of the first N-glycosylation enzyme, dolichol-P-dependent N-acetylglucosamine-1-P transferase (GPT), gives rise to mutant phenotypes in yeast. *Biochem. Biophys. Acta.* **1247**: 51-59.

KURKURUZINSKA, M.A., LENNON, K. 1994. Growth-related coordinate regulation of the early N-glycosylation genes in yeast. *Glycobiology.* **4**: 437-443.

KWEIDER, M., LEMESRE, J.L., DARCY, F., KUSNIERZ, J.P., CAPRON, A., 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., SHAW, J.J. Evolution classification and geographical distribution. In: the leishmaniasis in Biology and Medicine (Peters, W., Killick-Kendrick, R., eds) *Academic Press, London*, 1987, 1, 1-120.
- LANGRETH, S.G., BERMAN, J.D., RIORDAN, P., LEE, L.S. 1983. Fine structural alterations in *Leishmania tropica* within human macrophage exposed to antileishmanial in vitro. *J. Protozool.* **30**: 555-561.
- LAURENT, M., LEPOIVRE, M., TENU, J.P. 1996. Kinetic modelling of the nitric oxide gradient generated *in vitro* by adherent cells expressing inducible nitric oxide synthase. *Biochem. J.* **314**: 109-113.
- LAWRENCE, F., ROBER-GERO, M. 1985. Induction of heat shock and stress protein in promastigotes of three *Leishmania* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 4414-4417.
- LEGARE, D., HETTEMA, E., OUELLETTE, M. 1994. The P-glycoprotein-related gene family in leishmania. *Mol. Biochem. Parasitol.* **68**: 81-91.
- LEMESRE, J. L., BLANC, M. P., GREBAUT, P., ZILBERFAB, V., et CARRIERE, 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., DAULOUEDE, S., VEYRET, B., BRAJON, N., VINVENDEAU, P. 1997. *Leishmania spp.*: Nitric Oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically-grown amastigote forms. *Exp. Parasitol.* in press.
- LENNON, K., PRETEL, R., KESSELHEIM, J., HEESSEN, S., KURKURUZINSKA, M.A. 1995. Proliferation-dependent differential regulation of the dolichol pathway genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology.* **5**: 633-642.
- LEON, L.L., SOARES, M.J., TEMPORAL, R.M. 1995. Effects of temperature on promastigotes of several species of *Leishmania*. *J. Euk. Microbiol.* **42**: 219-223.
- LIBBY, P.R., PORTER, C.W. 1992. Inhibition of polyamine back-conversion by pentamidine and berenil. *Biochem. J.* **44**: 830-832.
- LIEW, F.Y., MILLOT, S., PARKINSON, C., PALMER, R.M., MONCADA, S. 1990. Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric-oxide from L-arginine. *J. Immunol.* **44**: 4794-4797.
- LIU, X., CHANG, K.P. 1992. Extrachromosomal genetic complementation of surface metalloproteinase (Gp63)-deficient *Leishmania* increases their binding to macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **89**: 4991-4995.
- LOCKSLEY, R.M., SCOTT, P. 1991. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. *Parasitol. Today.* **7**: A58-61.
- LOCKWOOD, D.N., WEBER, J.N. 1989. Parasites infections in AIDS. *Parasitol. today.* **5**: 310-316.
- LONSDALE-ECCLES, J.D., MPIMBAZA, G.W. 1986. Thiol-dependent proteases of African trypanosomes. Analysis by electrophoresis in sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gels copolymerized with fibrinogen. *Eur. J. Biochem.* **155**: 469-473.

- LOURIE, E.M & YORK, W. 1939. Treatment of sleeping sickness in Sierra Leone. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **36**: 113-131.
- MALLINSON, D.J., COOMBS, G.H. 1989. Interaction of *Leishmania* metacyclics with macrophages. *Int. J. Parasitol.* **19**: 647-656.
- MARESCU, B., CARRATU, L. 1992. The biology of heat shock response in parasites. *Parasitol. Today.* **8**: 260-266.
- MARTIN, S.K. 1993. Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* and the MDR phenotype. *Parasitol. Today.* **9**: 278-279.
- MARTINEZ, S., LOOKER, D.L., MARR, J.J. 1988. A tissue culture system for the growth of several species of *Leishmania*: growth kinetics and drug sensitivities. *Am. J. Trop. Med & Hyg.* **38**: 304-307.
- MARTY, P. LE FICHOUX, Y., PRATLONG, F., GARI-TOUSSAINT, M. 1994a. Human visceral leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France: epidemiological characteristics for the period 1985-1992. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med & Hyg.* **88**: 33-34.
- MARTY, P., LEGER, I., ALBERTINI, M., GARI-TOUSSAINT, M., TOMASSI, C., MANASSERO, J., LE FICHOUX, Y., MARIANI, R. 1994b. La leishmaniose viscérale infantile dans les alpes Maritimes de 1985 à 1992. *Bull. Soc. Path. Ex.* **87**: 105-109.
- MATTOCK, N.M., PETERS, W. 1975a. The experimental chemotherapy of leishmaniasis. I. Technique for the study of drug action in tissue culture. *Ann. Trop. Med & Parasitol.* **69**: 359-371.
- MATTOCK, N.M., PETERS, W. 1975b. The experimental chemotherapy of leishmaniasis. II. The activity in tissue culture of some antiparasitic and antimicrobial compounds in clinical use. *Ann. Trop. Med & Parasitol.* **69**: 359-371.
- MAUEL, J. 1996. Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.* **38**: 3-51.
- McGURN, M., BOON, T., LOUIS, J.A., TITUS, R.G. 1990. *Leishmania major*: Nature of immunity induced by immunization with a mutagenized avirulent clone of the parasite in mice. *Exp. Parasitol.* **71**: 81-89.
- McGWIRE, B., CHANG, K.P. 1994. Genetic rescue of surface metalloproteinase (Gp63)-deficiency in *Leishmania amazonensis* variants increases their infection of macrophages at the early phase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **66**: 345-347.
- McNEELY, T.B., ROSEN, G., LONDNER, M.V and TURCO, S.J. 1989. Inhibitory effects on protein kinase C by lipophosphoglycane and glycosyl-phosphatidylinositol antigens of *Leishmania*. *Biochem. J.* **259**: 601-604.
- McNEELY, T.B., TURCO, S.J. 1987. inhibition of protein kinase C by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**: 653-657.
- MEDINA-ACOSTA, E., BEVERLEY, S., RUSSEL, D.G. 1993. Evolution and expression of the *Leishmania* surface proteinase (Gp63) gene locus. *Infect. Agents. Dis.* **2**: 25-34.
- MEDRANO, F.J., HERNANDEZ-QUERO, J., JIMENEZ, E., PINEDA, J.A., RIVERO, A., SANCHEZ-QUIJANO, A., VELEZ, I.D., VICIANA, P., CASTILLO, R., REYES, M.J.,

- CARVAJAL, F., LEAL, M., LISSEN, E. 1992. Visceral leishmaniasis in HIV-1-infected individuals: a common opportunistic infection in Spain? *AIDS*. **6**: 1499-1503.
- MILLER, R.A., REED, S.G., PARSONS, M. 1990. *Leishmania* Gp63 molecule implicated in cellular adhesion lacks an Arg-Gly-Asp sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**: 267-274.
- MIRNA, A., HOFFMAN, K. 1969. The behaviour of nitrite in meat products. *Fleischwirtschaft*. **10**: 1361-1366.
- MOCKENHAUPT, F.P. 1995. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today*. **11**: 248-253.
- MOLYNEUX, D.H., KILLICK-KENDRIX, R. 1987. Morphology, ultrastructure and life cycle. In: W. Peters and Killick-Kendrix (eds), *The leishmaniasis in Biology and Medicine*, vol. I: Clinical aspect and control, *Academic Press, London*, PP. 121-176.
- MONTALBAN, C., CALLEJA, J.L., ERICE, A., LAGUNA, F., CLOTET, B., PODZAMCZER, D., COBO, J., MALLOLAS, J., YEBRA, M., GALLEGU, A. 1990. Visceral leishmaniasis in patients infected with immunodeficiency virus. *J. Infect.* **21**: 261-270.
- MONTALBAN, C., MARTINEZ-FERNANDEZ, R., CALLEJA, GARCIA-DIAZ, J.D., RUBIO, R., DRONDA, F., MORENO, S., YEBRA, M., BARROS, C., COBO, J., MARINEZ, M.C., RUIZ, F., COSTA, J.R. 1989. Visceral leishmaniasis (Kala-Azar) as an opportunistic infection in patients infected with the human immunodeficiency virus in Spain. *Rev. Infect. Dis.* **11**: 655-660.
- MOREAU, S. 1989. La chloroquine: mécanisme d'action antimalarique et résistance. *Med. Sci.* **5**: 729-735.
- MOREIRA, E.S.A., ARAUJO-SOARES, R.M., PETRILLO-PEIXOTO, M.L. 1995. Glucantime susceptibility of *Leishmania* promastigotes under variable growth conditions. *Parasitol. Res.* **81**: 291-295.
- MOREIRA, M.E., DEL PORTILLO, H.A., MILDRE, R.V., BALANCO, J.M., BARCINSKI, M.A. 1996. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J. Cell. Physiol.* **167**: 305-313.
- MORELLO, A. 1988. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxification mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* **90C**: 1-12.
- MORRIS, L., TROUTT, A.B., McLEOD, K.S., KELSO, A., HANDMAN, E., AEBISHER, T. 1993. Interleukine 4 but not interferon production correlates with the severity of murine cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* **61**: 3459-3465.
- MOSS, J.T., WILSON, J.P. 1992. Current treatment recommendations for leishmaniasis. *Ann. Pharmacotherapy*. **26**: 1452-1455.
- MOSSER, D.M., ROSENTHAL, L.A. 1993. *Leishmania*-macrophages interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Seminars in Cell Biology*. **4**: 315-322.
- MOSSER, D.M., VLASSARA, H., EDELSON, P.J., CERAMI, A. 1987. *Leishmania* promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation endproducts. *J. Exp. Med.* **165**: 140-145.

- MOSSER, D.M., EDELSON, P.J. 1987. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature*. **327**: 329-331.
- MOSSER, D.M., EDELSON, P.J. 1985. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J. Immunol.* **135**: 2785-2789.
- MOSSER, D.M., WEDGWOOD, J.F., EDELSON, P.J. 1985. *Leishmania* amastigotes: resistance to complement-mediated lysis is not due to a failure to fix C3. *J. Immunol.* **134**: 4128-4131.
- MOSSER, D.M., EDELSON, P.J. 1984. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *J. Immunol.* **132**: 1501-1505.
- MUKHOPADHYAY, R., DEY, S., XU, N., GAGE, D., LIGHTBODY, J., OUELLETTE, M., ROSEN, B. 1996. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**: 10383-10387.
- MUKKADA, A.J., MAEDE, J.C., GLASER, T., BONVENTRE, P.V. 1985. Enhanced metabolism of *Leishmania donovani* amastigote at acidic pH: an adaptation for intracellular growth. *Science*. **229**: 1099-1101.
- MULLER, M., MEIJER, C., ZAMAN, G.J.R., BORST, P., SCHEIPER, R.J., MULDER, N.H., DE VRIES, E.G.E., JANSEN, P.L.M. 1994. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**: 13033-13037.
- MURGOLO, N.J., CERAMI, A., HENDERSON, G.B. 1990. Trypanothione reductase. *Annals New York Academy of Sciences*. Part II. strategies for drug design: 193-200.
- MURRAY, H.W. 1993. Cytokines as antimicrobial chemotherapy for T-cell-deficient patient: prospects for treatment of nonviral opportunistic infections. *Clin. Inf. Dis.* **17** (suppl. 2): 407-413.
- MURRAY, H.W., RUBIN, B.Y., CARRIERO, S., ACOSTA, A.M. 1984. Reversible defect in antigen-induced lymphokine and γ -interferon generation in cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* **133**: 2250-2254.
- NAPIER, L.E., SEN GUPTA, P.C. 1943. The treatment of kala-azar with diamidino-diphenoxy-pentane. Preliminary observations of the treatment of 32 cases. *Indian. Med. Gaz.* **78**: 177-183.
- NARBORS, G.S., AFONSO, L.C.C., FARRELL, J.P., SCOTT, P. 1995. Switch from a type 2 to a type 1 T helper cell response and cure of established *Leishmania major* infection in mice is induced by combined therapy with interleukin 12 and Pentostam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**: 3142-3146.
- NAVARRO, M., LIU, J., MUTHUI, D., ORTIZ, G., SEGOVIA, M., HAMERS, R. 1994. Inverted repeat structure and homologous sequences in the LD1 amplicon of *Leishmania* spp. *Mol. Biochem. Parasitol.* **68**: 69-80.
- NDIFOR, A.M., WARD, S.A., HOWELLS, R.E. 1990. Cytochrome P-450 activity in malarial parasites and its possible relationship to chloroquine resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* **41**: 251-258.

NEAL, R.A. 1987. Experimental chemotherapy. in the leishmaniasis in biology and medicine. vol II Clinical aspect and control. PETERS, W., KILLICK-KENDRICK, R. eds. *Academic Press, London*. pp:794-845.

NEAL, R.A., CROFT, S.L. 1984. An *in vitro* system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* **14**: 463-475.

NEW, R.R.C., CHANCE, M.L., HEATH, S. 1981. Antileishmanial activity of amphotericin and other antifungal agents entrapped in liposomes. *J. Antimicrob. Chemother.* **8**: 371-381.

NOLAN, T.J., FARREL, J.P. 1985. Inhibition of *in vivo* and *in vitro* infectivity of *Leishmania donovani* by tunicamycin. *Mol. Biochem. Parasitol.* **16**: 127-135.

NUNN, C.M., JENKINS, T.C., NEIDLE, S. 1993. Crystal structure of d(CGCGAATTTCGCG) complexed with propamidine, a short-chain homologue of the drug pentamidine. *Biochem.* **32**: 13838-13843.

OLIVIER, M. 1996. Modulation of host cell intracellular Ca^{2+} . *Parasitol. Today.* **12**: 145-150.

OLLIARO, P.L., BRYCESON, A.D.M. 1993. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitol. Today.* **9**: 323-328.

Organisation Mondiale de la Santé. 1990. Lutte contre les leishmanioses. Series des rapports techniques, 793.

OUAISSI, M.A. 1988. Role of the RGD sequence in parasite attachment to host cells. *Parasitol. Today.* **4**: 169-173.

OUELLETTE, M & PAPADOPOULOU, B. 1993. Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. *Parasitol. Today.* **9**: 150-153.

OUELLETTE, M., HETTEMA, E., WÜST, D., FASE-FOWLER, F., BORST, P. 1991. Direct and inverted repeats associated in drug resistant *Leishmania*. *EMBO. J.* **10**: 1009-1016.

OUELLETTE, M & BORST, P. 1991. Drug resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. *Res. Microbiol.* **142**: 737-746.

OUELLETTE, M., FASE-FAWLER, F., BORST, P. 1990. The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *EMBO. J.* **9**: 1027-1033.

PAGE, B., PAGE, M., NOEL, C. 1993. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. *Int. J. Onc.* **3**: 473-476.

PAN., A.A. 1994. *Leishmania mexicana*: serial cultivation of intracellular stages in a cell-medium free. *Exp. Parasitol.* **58**: 71-80.

PANARO, M.A., PANUNZIO, M., JIRILLO, E., MARANGI, A., BRANDONOSIO, 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., OUELLETTE, M. 1994. Changes in the folate and pterin metabolism after disruption of the *Leishmania* H locus short chain deshydrogenase gene. *J. Biol. Chem.* **269**: 7810-7815.

PAPADOPOULOU, B & OUELLETTE, M. 1992. A novel antifolate gene on the amplified H circle of *Leishmania*. *EMBO. J.* **11**: 3601-3608.

PASCOLO, E., BLONSKI, C., SHIRE, D., TOULME, J.J. 1993. Antisense effect of oligodeoxy-nucleotides complementary to the minixon sequence of the protozoan parasite *Leishmania amazonensis*. *Biochimie.* **75**: 43-47.

PEDERSEN, P.L. 1995. Multidrug resistance a fascinating, clinically relevant problem in bioenergetics. *J. Bioenergetics. Biomemb.* **27**: 3-5.

PELMONT, J. 1989. Enzymes. Col Grenoble Sciences. Presse universitaires de grenoble Ed.

PEREZ-SALA, D., MOLLINEDO, F. 1995. Inhibition of N-linked glycosylation induces early apoptosis in human promyelocytic HL-60 cells. *J. Cell. Physiol.* **163**: 523-531.

PETER, M.J., VENKATARAMAN, G.M., LODES, M.J., STUART, K.D. 1994. A frequently amplified region in *Leishmania* contains gene conserved in prokaryotes and eukaryotes. *Gene.* **148**: 187-193.

PETERSON, D.S., MILHOUS, W.K., WELLEMS, T.E. 1990. Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87** : 3018-3022.

PETERSON, D.S., WALIKER, D., WELLEMS, T.E. 1988. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 9114-9118.

PETIT DE PENA, Y., GALLIGNANI, M., BURGUERA, M., BURGUERA, J.L., ANEZ, N., LUGO, A. 1990. Selective determination of antimony (III) and antimony (V) in blood serum and urine by hydride generation and atomic absorption spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* **1**: 72-75.

PETRILLO-PEIXOTO, M.L., BEVERLEY, S.M. 1989. Amplification of a new region of DNA in an unselected laboratory stock of *L. tarentolae*: the T region. *J. Protozool.* **36**: 257-261.

PHELOUZAT, M.A., LAUWRENCE, F., ROBERT-GERO, M. 1993. Characterization of sinefungin-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasitol. Res.* **79**: 683-689.

PIMENTA, P.F., DA SILVA, R.P., SACKS, D.L., PINTO DA SILVA, P. 1989. Cell surface nanoanatomy of *Leishmania major* as evaluated by fracture-flip. A surface network of 44 nm fusiform filaments identifies infective developmental stage promastigotes. *Eur. J. Cell. Biol.* **48**: 180-189.

PRATLONG, F., REYNES, J., DEREURE, J., BAIXENCH, M.T., MARCHOU, B., LEFEBVRE, M., JANBON, F. 1993. Characterization of *Leishmania* isolates from two AIDS patients originating from Valencia, Spain. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med & Hyg.* **87**: 705-706.

PRETEL, R., LENNON, K., BIRD, A., KURKURUZINSKA, M.A. 1995. Expression of the first N-Glycosylation gene in the Dolichol pathway, ALG7, is regulated at two major control points in the G1 phase of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Exp. Cell. Res.* **219**: 477-486.

- PRINA, E., ANTOINE, J.C., WIEDERANDERS, B., KIRSHKE, H. 1990. Localization and activity of various lysosomal protease in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages. *Infect. Immun.* **58**: 1730-1737.
- PRIVES, J.M., OLDEN, K., 1980. Carbohydrate requirement for expression and stability of acetylcholine receptor on the surface of embryonic muscle cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **77**: 5263-5267.
- RABINOVITCH, M. 1985. The endocytic system of *Leishmania* infected macrophages. In van Firth. (ed.). Mononuclear phagocytes. Characteristics, physiology and function. Martinus Nijhoff, Dordrecht. 611-619.
- RAINEY, P.M., SPITHILL, T.W., McMAHON-PRATT, D., PAN, A. 1991. Biochemical and molecular characterization of *Leishmania pifanoi* amastigote in continuous axenic culture. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**: 111-118.
- RAMAZEILLE, C., MISHRA, R.K., MOREAU, S., PASCOLO, E. 1994. Antisense phosphorothioate oligonucleotides : Selective killing of the intracellular parasite *Leishmania amazonensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 7859-7863.
- RAO, L.S., HARDY, J.G., WILSON, C.G. 1983. Tissue distribution and fate of free and liposome-encapsulated (^{125}Sb) sodium stibogluconate by gamma scintigraphy. *Int. J. Pharm.* **5**: 299-301.
- REED, S.G., BARRAL-NETTO, M., INVERSO, J.A. 1984. Treatment of experimental visceral leishmaniasis with lymphokine encapsulated in liposomes. *J. Immunol.* **132**: 3116-3119.
- REGUERA, R., BALANA FOUCE, R., CUBRIA, J.C., ALVAREZ-BUJIDOS, M.L., ORDONEZ, D. 1994. Putrescine uptake inhibition by aromatic diamidines in *Leishmania infantum* promastigotes. *Biochem. Pharmacol.* **47**: 1859-1866.
- REINER, N.E., WINNIE, N.G., TOSCA, M.A., McMASTER, W.R. 1988. Kinetics of γ -interferon binding and induction of a major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 4330-4334.
- REINER, S.L. 1994. Parasites and T-helper cell development: some insights. *Parasitol. Today.* **10**: 485-488.
- REINER, S.L., WANG, Z.E., HATMAN, F., SCOTT, P., LOCKSLEY, R.M. 1994a. Th1 and Th2 antigen receptors in experimental leishmaniasis. *Science.* **259**: 1457-1460.
- REINER, S.L., ZHENG, S., WANG, Z.E., STOWRING, L., LOCKSLEY, R.M. 1994b. *Leishmania* promastigotes evade interleukine 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *J. Exp. Med.* **179**: 447-456.
- RIEDER, M.A., HINNEN, A. 1991. Removal of N-Glycosylation sites of yeast acid-phosphatase severely affects protein folding. *J. Bacteriol.* **266**: 9778-9785.
- RIZVI, F.S., OUAISSI, M.A., MARTY, B., SANTORO, F., CAPRON, A. 1988. The major surface protein of *Leishmania* promastigote is a fibronectin-like molecule. *Eur. J. Immunol.* **18**: 473-476.

- ROBERTS, L.R., RAINEY, P.M. 1993. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. *Antimicrob. Agents & Chemother.* **37**: 1842-1846.
- 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*. *J. Biol. Chem.* **270**: 8884-8892.
- ROBERTS, W.L., BERMAN, J.D., RAINEY, P.M. 1995. *In vitro* antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparation. *Antimicrob. Agents & Chemother.* **39**: 1234-1239.
- ROCKETT, K.A., COWDEN, W.B., AWBURN, M.M., CLARK, I.A. 1991. Killing of *Plasmodium falciparum* *in vitro* by nitric oxide derivatives. *Infect. Immun.* **59**: 3280-3283.
- RUSSEL, D.G., TALAMAS-ROHANA, P. 1989. *Leishmania* and the macrophages: a marriage of inconvenience. *Immunol. Today.* **10**: 328-333.
- SACKS, D.L., HIENY, S., SHER, A. 1985. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective infective developmental stages of *L. major* promastigotes. *J. Immunol.* **135**: 564-567.
- SAHA, A.K., MUKHERJEE, T., BHADURI, A. 1986. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **19**: 195-200.
- SANCHEZ, A., CASTANYS, S., GAMARRO, F. 1994B. Increased P-type ATPase activity in *Leishmania tropica* resistant to Methotrexate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **199**: 855-861.
- SANDS, M., KRON, M.A., BROWN, R.B. 1985. Pentamidine: a review. *Rev. Infect. Dis.* **7**: 625-634.
- SANTORO, F., KWEIDER, M., LEMESRE, J.L., DARCY, F., RIVZI, F.S. 1987. Infectivity of *Leishmania* promastigotes is dependent on the expression of a 65 000 Dalton surface antigen. Host parasite cellular and molecular interactions in protozoal infections. Vol. H11.
- SANYAL, T., GANGOPADHYAY, P., GHOSH, D.K., SARKAR, D. 1994. Expression of antigens in virulent and avirulent indian strains of *Leishmania donovani*. *J. Biosci.* **19**: 291-299.
- SCOTT, P. 1991. INF- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* **147**: 3149-3155.
- SEARLE, C., CAMPOS, A.J.R., COULSON, R.M.R., SOITHILL, T.W., SMITH, D.F. 1989. A family of heat shock protein 70-related genes are expressed in the promastigotes of *Leishmania major*. *Nucl. Acids. Res.* **17**: 5081-5095.
- SEAY, M.B., HEARD, P.L., CHAUDHURI, G. 1996. Surface Zn-proteinase as a model for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Infect. Immun.* **64**: 5129-5137.
- SEGOVIA, M. 1994. *Leishmania* gene amplification: a mechanism of drug resistance. *Ann. Trop. Med & Parasitol.* **88**: 123-130.
- SERGEANT, E.D., SERGEANT, E.T., LOMBARD, Q. 1912. La leishmaniose à alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. *Bull. Soc. Path. Exot.* **5**: 93-98.

- SHAPIRO, T.A., ENGLUND, P.T. 1990. Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 950-954.
- SHAPIRO, T.A., KLEIN, V.A., ENGLUND, P.T. 1989. Drug-promoted cleavage of kinetoplast DNA minicircles. *J. Biol. Chem.* **264**: 4173-4178.
- SIDGWICK, N.V. 1950. Group V: oxides of nitrogen. In: The chemical elements and their compounds, pp. 681-693. Oxford: Oxford University Press.
- SMITH, D.F., GOKOOL, S., KEEN, J.K., McKEAN, P.G., RANGRAJAN, D. 1994. Structure and function of infective stage proteins of *Leishmania*. *Biochem. Soc. Trans.* **22**: 286-291.
- SOTERIADOU, K.P., RMOUNDOS, M.S., KATSIKAS, M.C., TZINIA, A.K., TSIKARIS, V., SAKARELLOS, C., TZARTOS, S.J. 1992. The Ser-Arg-Tyr-Asp region of the major surface glycoprotein of *Leishmania* mimics the Arg-Gly-Asp-Ser cell attachment region fibronectin. *J. Biol. Chem.* **267**: 13980-13985.
- SOTO, J., BUFFET, P., BERMAN, J. 1994. Successful treatment of colombian cutaneous leishmaniasis with four injection of pentamidine. *Am. J. Trop. Med & Hyg.* **50**: 107-111.
- STAUFFERT, I., PAULINI, H., STEINMANN, H., SIPPEL, H., ELSTER, C.J. 1990. Investigation on mutagenicity and genotoxicity of pentamidine and some related trypanocidal diamidines. *Mutat. Res.* **245**: 93-98.
- STREIT, J.A., DONELSON, J.E., AGEY, M.W., WILSON, M.E. 1996. Developmental changes in the expression of *Leishmania chagasi* Gp63 and heat shock proteins in human macrophages cell line. *Infect. Immun.* **64**: 1810-1818.
- SUNDAR, S., THAKUR, A., MISHRA, A., ROSENKEIMER, F., MURRAY, H. 1993. Immunochemotherapy for visceral leishmaniasis in India. *Clin. Res.* **41**:381.
- SUNDAR, S., THAKUR, A., TANDON, A.K., AGRAWAL, N.R., MISHRA, C.P., MAHAPATRA, T.M., SINGH, V.P. 1994. Clinicoepidemiological study of drug resistance in Indian Kala-azar. *Brit. Med. J.* **4**: 308.
- SUROLIA, N., KARTHIKEYAN, G., PADMANABAN, G. 1993. Involvement of cytochrome P-450 in conferring chloroquine resistance to the malarial Parasite, *Plasmodium falciparum*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **197**: 562-569.
- SYPECK, J.P., CHUNG, C.L., MAYOR, S.E.H., SUBRAMANYAM, J.M., GOLDMAN, S.J., SIEBURTH, D.S., WOLF, S.F., SCHAUB, R.G. 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J. Exp. Med.* **177**: 1797-1805.
- TALAMAS-ROHANA, P., WRIGHT, S.D., LENNARTZ, M.R., RUSSEL D.G. 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.
- TATA, M., KUMAR, A., FEINER, H. 1993. Visceral leishmaniasis in the acquired immunodeficiency syndrome: report of two cases. *Hum. Pathol.* **24**, 1379-1381.
- THAKUR, C.D., KUMAR, M., KUMAR, P., MISHRA, B.N., PANDEY, A.K. 1991a. Rationalisation of regimens of treatment of Kala-azar with sodium stibogluconate in India: a randomized study. *Br. Med. J.* **296**, 1557-1561.

- THAKUR, C.D., KUMAR, M., PANDEY, A.K. 1991b. Comparison of regimes of treatment of antimony-resistant Kala-azar patients: a randomized study. *Am. J. Trop. Med & Hyg.* **45**, 435-441.
- TRIPP, C.A., WIDSOM, W.A., MYLER, P.J., STUART, K.D. 1992. A multicopy, extrachromosomal DNA in *Leishmania infantum* contains two inverted repeats of the 27,5-kilobase LD1 sequence and encodes numerous transcript. *Mol. Biochem. Parasitol.* **55**: 39-50.
- TRIPP, C.A., PETER, J.M., STUART, K. 1991. A DNA sequence (LD1) which occurs in several genomic organizations in *Leishmania*. *Mol. Biochem Parasitol.* **47**: 151-160.
- TURCO, S.J., DESCOTEAUX, A. 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Ann. Rev. Microbiol.* **46**: 65-94.
- ULLMAN, B. 1995. Multidrug resistance and P-glycoproteins in parasitic protozoa. *J. Bioenergetic. Biomembranes.* **27**, 77-84.
- ULLMAN, B., CARRERO-VALENZUELA, E., COONS, T. 1989. *Leishmania donovani*: Isolation and characterization of sodium stibogluconate (Pentostam)-resistant cell lines. *Exp. Parasitol.* **69**: 157-163.
- VAN DJIK, M.R., McCONKEY, G.A., VINKENOOG, R., WATERS, A.P., JANSE, C.J. 1994. Mechanisme of pyrimethamine resistance in two different strains of *Plasmodium berghei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **68**: 167-177.
- VARKLA, K., CHATELAIN, R., LEAL, L.M.C.C., COFFMAN, R.L. 1992. Reconstitution of C.B-17 SCID mice with BALB/c T cells initiates a T-helper type-1 reponse and renders them capable of healing *Leishmania major* infection. *Eur. J. Immunol.* **23**: 262-268.
- VASQUEZ-VIVAR, J., AUGUSTO, O. 1992. Hydroxylated metabolites of the antimalarial drug primaquine. *J. Biol. Chem.* **267**: 6848-6854.
- VERSPIEREN, P., CORNELISSEN, A.W.C.A., THUONG, N.T., HELENE, C., TOULME, J.J. 1987. An acridine-linked oligodeoxynucleotide targeted to the common 5' end of *trypanosome* mRNAs kills cultured parasites. *EMBO. J.* **61**: 307-315.
- VILDE, J.L., RAGUIN, G., FERNANDEZ-MARTIN, J. La place des parasitoses au cours des immunodepressions. Journées de l'hôpital Claude-Bernard, Paris, novembre 1990.
- VINCENDEAU, P., DAULOUEDE, S., VEYRET, B., DARDE, M.L., BOUTEILLE, B., LEMESRE, J.L. 1992. Nitric oxide-mediated cytostatic activity on *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Exp. Parasitol.* **75**, 353-360.
- VINCENDEAU, P., DAULOUEDE, S. 1991. Macrophage cytostatic effect on *Trypanosoma musculi* involves an L-arginine-dependent mechanism. *J. Immunol.* **146**, 4338-4383.
- 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 FcγR2/CD23 surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 7804-7808.
- WAALKES, T.P., DEVITA, V.T. 1970. The determination of pentamidine (4-4'-diaminodiphenoxypentane) in plasma, urine and tissues. *J. Lab. Clin. Med.* **75**: 871-878.

- WAALKES, T.P., MAKULU, D.R. 1976. Pharmacological aspect of pentamidine. *Natl. Cancer. Inst. Monogr.* **43**: 171-176.
- WALI, J.P., AGGARWAL, P., GUPTA, U., SALUJA, SANDEEP, SINGH, S. 1992. Ketoconazole in the treatment of antimony- and pentamidine-resistant Kala-Azar. *J. Infect. Dis.* **166**: 215-216.
- WANG, Z.E., REINER, S.L., ZHENG, S., DALTON, D.K., LOCKSLEY, R.M. 1994. CD4⁺ effector cells default to the Th2 pathway in interferon- γ deficient mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* **179**: 1367-1371.
- WASHTIEN, W.L., GRUMONT, R., SANTI, D.V. 1985. DNA amplification in antifolate resistant *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* **260**: 7809-7812.
- WELBURN, S.C., BARCINSKI, M.A., WILLIAMS, G.T. 1997. Programmed cell death in trypanosomatids. *Parasitol. Res.* **13**: 22-26.
- WELLEMS, T.E., WALKER-JONAH, A., PANTON, L.J. 1991. Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 3382-3386.
- WELLEMS, T.E., PANTON, L.J., GLUZMAN, I.Y., DO ROSARIO, V.E., GWADZ, R.W., WALKER-JONAH, A., KROGSTAD, D.J. 1990. Chloroquine resistance not linked to mdr-genes in a *Plasmodium falciparum* cross. *Nature*. **345**: 253-255.
- WILSON, C.M., SERRONO, A.F., WASLEY, A., BOGENSHUTZ, M.P., SHANKER, A.H., WIRTH, D.F. 1989. Amplification of a gene related to mammalian mdr genes in drug resistant *Plasmodium falciparum*. *Sciences*. **244**: 1184-1186.
- WILSON, K., BEVERLEY, S.M., ULLMAN, B. 1992. Stable amplification of linear extrachromosomal DNA in mycophenolic acid-resistant *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **55**: 197-206.
- WILSON, K., COLLART, F.R., HUBERMAN, E., STRINGER, J.R., ULLMAN, B. 1991. Amplification and molecular cloning of the IMP dehydrogenase gene of *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **266**: 1664-1671.
- WILSON, M.E., HARDIN, K.K. 1990. The major *Leishmania donovani* surface glycoprotein in tunicamycin-resistant promastigotes. *J. Immunol.* **144**: 4825-4834.
- WILSON, M.E., HARDIN, K.K., DONELSON, J.E. 1989. Expression of the major surface glycoprotein of *Leishmania donovani chagasi* in virulent and attenuated promastigotes. *J. Immunol.* **143**: 678-684.
- WILSON, M.E., PEARSON, R.D. 1986. Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. *J. Immunol.* **136**: 4681-4688.
- WINGFIELD, A.L. 1941. A:A'-Diamidino stilbene in the treatment of kala-azar. *Ann. Trop. Med & Parasitol.* **35**, 55-58.
- WOZENCRAFT, A.O., BLACKWELL, J.M. 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**: 559-563.

- YAMAGUCHI, K., AKAI, K., KAWANISHI, G., UEDA, M., MASUDA, S., SASAKI, R. 1991. Effects of site-directed removal of N-glycosylation sites in human erythropoietin on its production and biological properties. *J. Biol. Chem.* **266**: 20434-20439.
- ZALIS, M.G., WILSON, C.G., ZHANG, Y., WIRTH, D.F. 1993. Characterization of the pfmdr2 gene for *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **62**: 83-92.
- ZAMAN, G.J.R., LANKELMA, J., TELLINGENS, O.V., DEKKER, H., PAULUSMA, C., ELFERINK, R.P.J.O., BORST, P. 1995. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:7690-7694.
- ZILBERSTEIN, D., BLUMENFIELD, N., LIVEANU, V., GEPSTEIN, A., JAFFE, C.L. 1991. Growth at acidic pH induces an amastigote stage-specific protein in *Leishmania* promastigote. *Mol. Biochem. Parasitol.* **45**: 175-178.
- ZILBERSTEIN, D., DWYER, D.M. 1988. Identification of a surface membrane proton-translocating ATPase in promastigotes of the parasite protozoan *Leishmania donovani*. *Biochem. J.* **256**: 13-21.
- ZILBERSTEIN, D., DWYER, D.M. 1985. Protonmotive force-driven active transport of D-Glucose and L-proline in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 327-336.
- ZOLG, J.W., CHEN, G.X., PLITT, J.R. 1990. Detection of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* by mutation specific polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* **41**: 257-266.
- ZOLG, W.J., PLITT, J.R., CHEN, G.X., PALMER, S. 1989. Point mutation in the dihydrofolate reductase-thymidilate synthetase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **36**: 253-262.
- ZUMLA, A., CROFT, S.L. 1992. Chemotherapy and immunity in opportunistic infections in AIDS. *J. Parasitol.* **105**: S93-S101.