

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Induction de « Neutrophil Extracellular Traps »
par le promastigote de *Leishmania*
chez le neutrophile humain**

Par
Christelle Gabriel

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (PhD) en Immunologie-Virologie

Jury d'évaluation

Président du jury
et
Examinateur interne Charles Dozois, PhD, INRS-Institut Armand Frappier

Examinateurs externes Martin Olivier, PhD,
Centre d'Etude de la Résistance de l'Hôte
Université McGill

Paul H. Naccache, PhD,
Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie
Université Laval

Directeur de recherche Albert Descoteaux, PhD, INRS-Institut Armand Frappier
droits réservés de *Christelle Gabriel*, 2010

Pour toi, Mamie

Résumé

Le neutrophile est un élément clé de la réponse immunitaire innée. L'un des mécanismes par lesquels il élimine les micro-organismes de l'hôte est la formation de « Neutrophil Extracellular Traps » (NETs).

Une fois inoculé dans l'organisme hôte, le promastigote de *Leishmania* interagit rapidement avec le neutrophile. Les résultats obtenus au cours de nos travaux ont montré que les promastigotes de *L. donovani* et de *L. major* induisent, à partir du neutrophile humain, le relargage de NETs constitués d'ADN et d'élastase. Au cours de nos travaux, nous avons également mis en évidence que cette induction est rapide et dépend à la fois de la quantité de promastigotes et du temps d'incubation. De plus, les NETs forment des structures très filamenteuses qui capturent *Leishmania* sans l'éliminer. En effet, nos résultats suggèrent que le lipophosphoglycan (LPG), abondamment présent à la surface des promastigotes protège *Leishmania* de l'activité microbicide des NETs.

Les résultats obtenus ont également révélé que cette induction nécessite un contact entre le neutrophile et le parasite et qu'elle est indépendante de l'opsonisation de ce dernier. De plus, les deux facteurs de virulence de *Leishmania* les mieux caractérisés, le LPG et la protéine GP63, n'ont pas de rôle prépondérant dans ce phénomène.

Étudiante

Directeur de recherche

Table des matières

Résumé	i
Table des matières	ii
Liste des figures.....	vi
Liste des tables	viii
Liste des abréviations.....	ix
Préface	xiii
INTRODUCTION	a
REVUE DE LITTERATURE	1
1 <i>La leishmaniose et le parasite Leishmania</i>	I
1.1 Généralités sur la leishmaniose	2
1.1.1 Manifestations cliniques de la leishmaniose.....	2
1.1.1.1 Leishmaniose cutanée	2
1.1.1.2 Leishmaniose muco-cutanée	2
1.1.1.3 Leishmaniose viscérale	3
1.1.2 Diagnostique	5
1.1.3 Protection contre la leishmaniose	5
1.1.3.1 Prophylaxie	5
1.1.3.2 Traitements curatifs.....	6
1.1.3.3 Vaccins	7
1.2 <i>Leishmania</i>	8
1.2.1 Cycle de vie	8
1.2.2 Le réservoir.....	12
1.2.3 LPG et GP63, deux glycoconjugués essentiels à la virulence de <i>Leishmania</i>	12

1.2.3.1	Le LPG	13
1.2.3.1.1	Biosynthèse et structure du LPG.....	13
1.2.3.1.2	Interaction LPG/Phlébotome.....	16
1.2.3.1.3	Rôle du LPG lors de l'infection dans le macrophage	16
1.2.3.2	La protéine GP63	18
2	<i>Le neutrophile</i>	20
2.1	Formation.....	20
2.1.1	Hématopoïèse, les différentes étapes de maturation du neutrophile.....	21
2.1.2	Granulopoïèse	23
2.1.2.1	Granules azurophiles	23
2.1.2.2	Granules peroxydase-négatives.....	24
2.1.2.2.1	Granules spécifiques	24
2.1.2.2.2	Granules gélatinases.....	25
2.1.2.3	Vésicules sécrétaires	25
2.2	Rôle du neutrophile dans la réponse immunitaire innée.....	28
2.2.1	Recrutement du neutrophile.....	28
2.2.1.1	Roulement	28
2.2.1.2	Adhésion ferme et diapedèse	29
2.2.2	Elimination des microbes	31
2.2.2.1	La phagocytose.....	31
2.2.2.2	Dégranulation.....	31
2.2.2.2.1	Elimination oxygène-dépendante du micro-organisme pathogène	32
2.2.2.2.2	Elimination oxygène-indépendante du pathogène	33
2.2.2.3	Les NETs.....	36
2.2.2.3.1	Structure	36
2.2.2.3.2	Formation	38
2.2.2.3.3	Implication des NETs dans l'élimination de micro-organismes pathogènes.....	43
2.2.2.4	Mécanismes d'évasion de certains microbes à l'élimination par le neutrophile.....	47

3 Réponse du neutrophile face à <i>Leishmania</i>.....	49
3.1 Recrutement des neutrophiles au site d'infection	50
3.2 Phagocytose de <i>Leishmania</i> par le neutrophile	51
3.3 Les neutrophiles contribuent à l'élimination de <i>Leishmania</i>	51
3.3.1 Régulateur de l'immunité	52
3.3.2 Coopération avec les autres cellules immunitaires.....	52
3.3.3 Production des ROS.....	52
3.4 Contribution des neutrophiles dans l'établissement de l'infection par <i>Leishmania</i>	53
PUBLICATION.....	57
Résumé de la publication	59
Abstract.....	61
Introduction.....	62
Materials and Methods	64
Results	69
Discussion.....	89
Acknowledgements.....	92
Disclosure	93
References	94
RESULTAT SUPPLEMENTAIRE	98
DISCUSSION.....	100
1 Induction des NETs par le promastigote de <i>Leishmania</i>.....	101
1.1 Les récepteurs impliqués	102
1.1.1 PAMPs impliqués dans la NETose induite par le promastigote de <i>Leishmania</i>	102
1.1.1.1 LPG et GP63	103
1.1.1.2 Les GIPLs.....	103
1.1.2 PRRs du neutrophile impliqués dans la NETose induite par le promastigote de <i>Leishmania</i>	105

1.1.2.1	Les «Toll-like receptors»	106
1.1.2.2	Les récepteurs aux protéines du complément	111
1.1.2.3	L'adhésion des neutrophiles et la présence de sérum dans le milieu.....	111
1.1.2.3.1.1	L'adhésion des neutrophiles.....	112
1.1.2.3.1.2	Le sérum.....	112
2	Rôle des NETs dans l'infection par <i>Leishmania</i>	113
2.1	Les NETs limitent l'infection par <i>Leishmania</i>	113
2.2	Les NETs contribuent à l'infection de l'organisme hôte par <i>Leishmania</i>	114
3	Résistance de <i>Leishmania</i> face à l'activité microbicide des NETs.....	115
3.1	Contribution du LPG dans la protection de <i>Leishmania</i>	115
3.2	Implication de la structure du LPG.....	116
3.3	Altération de l'accessibilité des protéines antimicrobiennes au promastigote de <i>Leishmania</i> par le LPG	118
4	Notes expérimentales.....	119
4.1	L'utilisation de neutrophiles murins vs les neutrophiles humains.....	120
4.2	Variation entre les donneurs	116
CONCLUSION	122	
REMERCIEMENTS	124	
BIBLIOGRAPHIE.....	127	
VERSION PDF DE L'ARTICLE	148	

Liste des figures

Revue de Littérature

<i>Figure 1 : Les différentes manifestations cliniques de la leishmaniose.....</i>	4
<i>Figure 2 : Le parasite Leishmania.....</i>	10
<i>Figure 3 : Cycle de vie de Leishmania.....</i>	11
<i>Figure 4 : Le lipophosphoglycan</i>	15
<i>Figure 5 : Les cinq étapes de différenciation du neutrophile.</i>	22
<i>Figure 6 : Etapes de la granulopoïèse.</i>	26
<i>Figure 7 : Contenu des granules du neutrophile (liste non-exhaustive).....</i>	27
<i>Figure 8 : Recrutement du neutrophile au site d'infection et phagocytose du microbe</i>	30
<i>Figure 9 : Les différentes voies d'élimination des micro-organismes par le neutrophile.</i>	35
<i>Figure 10 : Observation par microscopie électronique à transmission de neutrophiles naïfs ou stimulés pour l'émission de NETs.....</i>	41
<i>Figure 11 : NETose : nouveau type de mort cellulaire distinct de l'apoptose et de la nécrose.</i>	42
<i>Figure 12 : Capture de micro-organismes pathogènes par les NETs.....</i>	46
<i>Figure 13 : Modèle du cheval de Troie dans l'infection par L. major.</i>	56

Publication

<i>Figure 1 : Induction of NETs by L. donovani promastigotes.....</i>	71
<i>Figure 2 : Different strains and species of Leishmania induce NET release in a time- and dose-dependent manner</i>	72
<i>Figure 3 : Leishmania promastigotes are trapped by NETs.....</i>	75
<i>Figure 4 : Leishmania promastigotes are internalized by human neutrophils in suspension and induce NET release.....</i>	76
<i>Figure 5 : Induction of NET release is independent of LPG and other Galβ1,4Manα1-PO4-containing L. donovani glycoconjugates</i>	80
<i>Figure 6 : LPG does not interfere with phagocytosis in human neutrophils.....</i>	81
<i>Figure 7 : NET release is not mediated by GP63 or a secreted factor.....</i>	83
<i>Figure 8 : L. donovani promastigotes are resistant to the antimicrobial activity of NET</i>	86
<i>Figure 9 : Induction of NET release by L. donovani promastigotes is independent of the oxidative burst</i>	88

Résultat supplémentaire

<i>Figure S1 : Les promastigotes de L. donovani tués à la formaline ou par la chaleur induisent peu la formation de NETs.....</i>	99
---	----

Discussion

<i>Figure 1: Structure des glycoconjugués présents à la surface des promastigotes de Leishmania</i>	104
<i>Figure 2: Formation de NETs par les neutrophiles circulants induite par les plaquettes TLR4.....</i>	110
<i>Figure 3: Structure du LPG des promastigotes de Leishmania</i>	117

Liste des tables

Revue de Littérature

<i>Table 1 : Eléments constitutifs des Neutrophils Extracellular Traps.....</i>	37
<i>Table 2 : Facteurs induisant la formation des NETs.....</i>	40
<i>Table 3 : Liste des micro-organismes pathogènes capables d'échapper à l'activité microbicide du neutrophile et mode d'action.....</i>	48

Discussion

<i>Table 1 : Localisation des PRRs du neutrophile</i>	105
<i>Table 2 : Liste des PAMPs reconnus par les TLRs.....</i>	109

Liste des abréviations

A

ADN	Acide désoxyribonucléique
AP	Phosphatase alcaline
ARN	Acide ribonucléique

B

BPI	Bacterial Permeability-Increasing Protein
------------	---

C

CD	Cluster of differentiation
CGD	Maladie Granulomateuse Chronique
CRP-R	Récepteurs de la protéine c-réactive
CR1/3	Récepteurs 1/3 des protéines du complément
CSF	Colony-Stimulating Factors
C5a	Protéine C5a du complément

D

DDT	Dichloro-diphenyl-trichloroethane
DNase	Désoxyribonucléase
DPI	Diphenyleneiodonium chloride

F

FcR	Récepteur du fragment Fc des immunoglobulines
FeLV	Virus leucémogène félin
fMLP	formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine

G

Galf	Galactofuranosyl-transférase
GFP	Green Fluorescent Protein
GIPLs	Glycosyl-inositol phospholipides
GO	Glucose oxydase
GPI	Glycosylphosphatidyl-inositol
GP63	Glycoprotéine de surface de 63 kDa

H

HOCl	Acide hypochloreux
H2O2	Peroxyde d'hydrogène

I

IFN-γ	Interféron-gamma
IL	Interleukine
IL-12p40	Sous-unité p40 de l'interleukine 12
Ipa	Invasion Plasmid Antigen

L

LAMP-1/2	Protéine-1/2 membranaire associée aux lysosomes
LCF	<i>Leishmania</i> Chemotactic Factor
LPG	Lipophosphoglycan
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Acide lipotéichoïque
LTB4	Leucotriène B4

M

MAC	Complexe d'attaque membranaire
MBP	Protéine de liaison au mannose
MIP1β	Protéine 1 <i>beta</i> inflammatoire du macrophage
MPT	Mannosylphosphoryltransferase

MPO	Myélopéroxydase
MRP 8/14	Myeloid-Related Protein 8/14 complex
MSP	Protéase majoritaire de surface

N

NADPH oxidase	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NODs	Nucleotide Oligomerization Domain

O

OmpA	Protéine A de la membrane externe
OMS	Organisation mondiale de la santé
O₂-	Ion superoxyde

P

PAMP	Motif moléculaire associé au pathogène
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PGRP	Protéine de reconnaissance du peptidoglycan
Phox	Phagocyte oxidase
PKC	Protéine kinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMN	Leucocyte polymorphonucléaire
PPG	Protéophosphoglycan
PRR	Pattern-Recognition Receptors
PSGL-1	Ligand 1 de la glycoprotéine P-sélectine
PSP	Protéine de surface du promastigote
PTP1B	Protéine tyrosine phosphatase 1 B

R

ROS

Espèces réactives de l'oxygène

S

SHP-1

Src homology phosphatase-1

SIP

Salmonella Invasion Protein

T

TCPTP

T cell protein tyrosine phosphatase

Th1/2

T helper 1/2

TLR

Toll-Like Receptor

TNF_α

Facteur alpha de nécrose tumorale

V

V-ATPase

Pompe à proton vacuolaire ATPase

Y

YOP

Yersinia Outer membrane Protein

Préface

La présente thèse est produite sous la forme d'une revue de littérature et d'un article en cours de parution dans *The Journal of Immunology* :

Gabriel C., W. Robert McMaster, Denis Girard, and Albert Descoteaux (en cours de parution). *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *The Journal of Immunology*, 2010, 185 : 000-000.

Les expériences ont été conçues par C. Gabriel et A. Descoteaux, réalisées par C. Gabriel. L'article a été rédigé par C. Gabriel et A. Descoteaux.

INTRODUCTION

Selon l'OMS, la leishmaniose est la seconde maladie parasitaire la plus importante dans le monde. Bien qu'elle soit endémique dans plus de 88 pays, la leishmaniose appartient au groupe des quatorze maladies tropicales négligées, regroupant les maladies qui touchent principalement les populations les plus pauvres vivant dans les régions tropicales et subtropicales. Plusieurs formes de leishmaniose avec divers degrés de sévérité physiques ou sociaux existent. Les formes les plus relatées dans les articles scientifiques sont les formes cutanée et viscérale. En effet, ces types de leishmaniose sont respectivement la forme la plus répandue et la forme la plus sévère de la maladie.

Leishmania, l'agent responsable de la leishmaniose est un parasite biphasite qui est inoculé dans l'organisme hôte mammifère sous sa forme promastigote et qui y subsiste sous sa forme amastigote. Le macrophage étant sa cellule hôte principale, de nombreuses études ont porté leur intérêt sur la compréhension des étapes menant à l'infection du macrophage et à la subsistance de *Leishmania* dans cette cellule. Cependant, du fait de la forte implication du neutrophile dans les premières étapes de la réponse immunitaire de l'hôte, de plus en plus d'études ont portées leur attention sur le rôle du neutrophile dans la leishmaniose. En effet, des expériences effectuées *in vivo* chez la souris et l'utilisation de techniques de microscopie ont montré que le neutrophile est rapidement recruté au site d'inoculation de *Leishmania* et phagocyte rapidement ce dernier. De plus, malgré l'important arsenal microbicide contenu dans le neutrophile, le promastigote de *Leishmania* parvient à déjouer la machinerie antimicrobienne de la cellule et à survivre dans le phagosome de celle-ci.

Initialement, dans le but de comprendre les mécanismes par lesquels *Leishmania* parvient à survivre dans le neutrophile, nous avions entrepris par microscopie l'étude de l'état d'activation de la NADPH oxydase, acteur important dans l'élimination des micro-organismes pathogènes par le neutrophile. De manière assez inattendue, nous avons observé que suite au contact avec le promastigote, le neutrophile forme des structures très filamenteuses qui nous empêchaient d'effectuer toute analyse et interprétation quant à l'état d'activation de la NADPH oxydase. Etant donné que ces structures formées par le neutrophile ressemblaient à des éléments référencés dans la littérature en tant que NETs,

notre attention s'est orientée sur leur analyse. Au début de nos travaux, peu d'articles se rapportant aux NETs étaient disponibles. Il est vrai que la formation de ces éléments par le neutrophile est un mécanisme qui n'a été que récemment décrit (2004). Au cours des cinq dernières années, la formation des NETs a suscité un vif intérêt parmi les équipes de recherche qui ont mis en évidence leur rôle dans le contrôle des micro-organismes pathogènes.

L'objectif de nos travaux présentés dans cette thèse a donc été de déterminer si les structures observées initialement étaient bel et bien des NETs. Dans ce but, nous avions trois objectifs :

- 1) Déterminer si les promastigotes de *Leishmania* induisent la formation de NETs chez le neutrophile humain,
- 2) Comprendre par quels mécanismes les promastigotes de *Leishmania* initient le relargage de NETs à partir du neutrophile,
- 3) Etudier l'impact de la production de NETs sur la survie des promastigotes de *Leishmania*.

Les résultats obtenus au cours de ce doctorat sont présentés sous la forme d'un article en cours de parution dans *The Journal of Immunology* et de résultats non-inclus dans cet article (Résultat supplémentaire).

Dans le but d'exposer l'état des connaissances actuelles concernant cette étude, une revue de littérature constituée de trois parties débute cette thèse. Les chapitres de cette revue sont les suivants : la leishmaniose et le parasite *Leishmania*, le neutrophile, la réponse du neutrophile face à *Leishmania*.

Note : Afin de rendre la lecture de cette thèse plus facile, certains termes anglais ont été conservés lorsqu'une traduction courante n'était pas disponible.

REVUE DE LITTÉRATURE

1 *La leishmaniose et le parasite Leishmania*

1.1 Généralités sur la leishmaniose

Plus d'un milliard d'individus, soit une personne sur six de la population mondiale est atteinte d'au moins une maladie tropicale négligée dont fait partie la leishmaniose. Décrise pour la première fois en 1882 par le médecin militaire McNaught, la leishmaniose est la seconde maladie parasitaire la plus importante dans le monde. Elle est endémique dans 88 pays (principalement des pays en voie de développement des régions tropicales et sub-tropicales). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 12 millions d'individus à travers le monde en sont atteints et 350 millions encourent le risque de la contracter. Cependant, l'OMS estime que ces chiffres officiels sont sous-estimés notamment en raison d'individus atteints par la maladie et non-diagnostiqués. En effet, la déclaration de leishmaniose n'est obligatoire que dans 33 des 88 pays touchés. De plus la maladie affectant des régions rurales éloignées, il est difficile de recenser les personnes atteintes dans ces zones. Cette maladie représente un véritable problème de santé publique pour certains pays.

La leishmaniose est souvent associée à la pauvreté. En effet, les principales populations touchées ont un faible revenu (inférieur à 1\$ US/jour) ainsi qu'un mode de vie qui favorise le risque de développement de la maladie (Alvar *et al.*, 2006). En plus de concerner les populations démunies, la leishmaniose contribue également à l'appauvrissement des individus du fait du coût onéreux des traitements existants qui constraint les familles de vendre leurs biens. Le nombre d'individus atteints par cette maladie accroît de plus en plus et se déplace vers les villes. Malgré tous les problèmes socio-économiques que suscite cette maladie, la leishmaniose demeure une maladie négligée.

1.1.1 Manifestations cliniques de la leishmaniose

Le terme leishmaniose regroupe trois maladies ayant des manifestations cliniques et des degrés de sévérité distincts : la leishmaniose cutanée, la leishmaniose muco-cutanée et la leishmaniose viscérale (Figure 1).

1.1.1.1 *Leishmaniose cutanée*

Endémique dans 70 pays avec une incidence de 1,5 à 2 millions de nouveaux cas par an, la leishmaniose cutanée (ou bouton d’Orient, Uta) est la forme la plus répandue et la moins grave de la maladie. Déjà connue par les Incas en tant que « maladie des Andes », elle est caractérisée par la formation de lésions ulcérantes au niveau du site de piqûre du Phlébotome (OMS) (Figure 1B). Généralement, les lésions se résorbent d’elles-mêmes et les individus guérissent spontanément en quelques mois, conservant toutefois des cicatrices indélébiles. Les principaux pays concernés sont la Syrie, l’Arabie Saoudite, le Pérou, le Brésil et l’Afghanistan. *L. tropica*, *L. major* et *L. mexicana* sont trois principales espèces de leishmanies responsables de la leishmaniose cutanée.

1.1.1.2 *Leishmaniose muco-cutanée*

Causée par *L. braziliensis*, la leishmaniose muco-cutanée également appelée « Espundia », est une forme mutilante de la leishmaniose cutanée. Comme pour cette dernière, les premiers signes cliniques sont l’apparition de lésions au niveau du site de piqûre du vecteur. En revanche, en raison du fort tropisme de *L. braziliensis* pour les macrophages du pharynx, de la bouche et du nez, les cavités nasales et buccales se nécrosent, menant à la défiguration de l’individu atteint (Figure 1 A, D). D’ailleurs, cette maladie était anciennement appelée « lèpre blanche », en raison de la ressemblance des lésions produites avec celles causées par la lèpre. La leishmaniose muco-cutanée se retrouve essentiellement en Amérique Centrale et du Sud (Mexique, Pérou et Bolivie).

1.1.1.3 Leishmaniose viscérale

Egalement connue sous les termes issus du sanskrit « Kala-azar » (fièvre noire), fièvre « Dum-Dum », la leishmaniose viscérale est la forme la plus grave de la maladie avec une mortalité de 100 % en l'absence de traitement. Elle se caractérise par des poussées de fièvre irrégulières, une importante perte de poids, une hépatosplénomégalie (augmentation du volume de la rate et du foie) et de par une anémie (Figure 1 E). 90% des cas de leishmaniose viscérale se localisent en Inde, Brésil, Bangladesh, Népal et Soudan (Chappuis *et al.*, 2007). *L. donovani*, *L. chagasi* et *L. infantum* en sont les principaux agents responsables.

Cette maladie peut évoluer en une variante dite leishmaniose Post-Kala-Azar caractérisée par l'apparition de lésions cutanées au niveau du visage qui se résorbent d'elles-mêmes (Figure 1 C). 10 % des patients initialement traités pour la leishmaniose viscérale développent la leishmaniose Post-Kala-Azar.



Figure 1 : Les différentes manifestations cliniques de la leishmaniose. A) Statue inca représentant un individu atteint de leishmaniose muco-cutanée. B) Lésion nécrosée caractéristique de la leishmaniose cutanée. C) Eruption maculopapuleuse typique de la leishmaniose post-Kala-Azar. D) Destruction des muqueuses oro-naso-pharyngiennes chez un patient souffrant de leishmaniose muco-cutanée. E) Hépatosplénomégalie caractéristique de la leishmaniose viscérale.

1.1.2 Diagnostique

Le diagnostique de la leishmaniose se fait par microscopie à partir de lésions ou de prélèvements sanguins. Les leishmanies des différentes espèces n'étant pas morphologiquement différenciables, l'amplification génique par PCR est alors utilisée. Ces techniques de détection étant onéreuses, nécessitant du matériel et du personnel, d'autres méthodes ont été conçues : l'utilisation de bandelette réactive K39 dont le principe repose sur la mise en présence du plasma du patient avec une protéine recombinante spécifique de *Leishmania* et ne coutant que (1\$ US) (OMS).

1.1.3 Protection contre la leishmaniose

La lutte contre la leishmaniose représente un véritable enjeu pour des pays tels que l'Inde. Une lutte efficace doit conjuguer à la fois la production de médicaments accessibles et peu coûteux ainsi qu'un dépistage actif de la maladie. Actuellement, des traitements curatifs contre la leishmaniose existent. Malheureusement, la plupart sont très toxiques et restent inaccessibles pour les populations touchées. La leishmaniose touchant principalement les pays en voie de développement, donc des populations peu solvables, les industries ont peu d'attrait à produire et à investir des médicaments pour cette maladie. Selon l'OMS, moins d'un pourcent des médicaments homologués entre 1975 et 1999 étaient destinés au traitement des maladies tropicales dont la leishmaniose.

1.1.3.1 Prophylaxie

La leishmaniose est transmise par le phlébotome (diptère de très petite taille) du genre *Phlebotomus* (Ancien Monde) ou *Lutzomyia* (Nouveau Monde). Le phlébotome étant un insecte nocturne, l'OMS suggère d'éviter de sortir à la tombée du jour. Le port de vêtements recouvrant un maximum de surface corporelle est également recommandé. L'utilisation de l'insecticide DDT ayant prouvé son efficacité dans la lutte contre le moustique responsable du paludisme, a également contribué à l'éradication du

phlébotome, notamment lors d'une campagne menée en Inde dans les années 1950. Malheureusement, certains phlébotomes (ex. *P. argentipes*) ayant développé une résistance au DDT, la campagne a dû être arrêtée (Chappuis *et al.*, 2007).

1.1.3.2 Traitements curatifs

Il est difficile pour les personnes atteintes de leishmaniose de se faire soigner. En effet, le coût élevé de ces traitements ainsi que l'éloignement des centres thérapeutiques rendent les soins inaccessibles.

Pendant longtemps le traitement de la leishmaniose à reposé sur l'utilisation de sels pentavalents d'antimoine (antimoniate de méglumine (Glucantim®) et stibogluconate de sodium (Pentostam®)). Ces traitements sont chers, nécessitent plusieurs injections (intramusculaire ou intraveineuse) ainsi qu'une longue hospitalisation en raison de leur forte toxicité. Malheureusement, 40 à 65% des malades atteints de leishmaniose viscérale en Inde ont développés une résistance à l'antimoine. Ceci est probablement dû à une mauvaise utilisation du traitement. Car, étant trop onéreux, beaucoup de malades ne prennent pas toutes les injections nécessaires (OMS).

L'utilisation de l'amphotericin B conventionnelle (Fungizone®) et de la pentamidine (Pentacarinat®) a été une alternative à la résistance à l'antimoine. Malheureusement ces deux molécules sont très toxiques et le traitement est aussi onéreux que celui à l'antimoine. Une formulation liposomale de l'amphotericin B (AmBisome®) a été développée. Ce traitement est moins毒 que celui à l'amphotericin B conventionnelle (Rosenthal *et al.*, 2009). Bien qu'il nécessite une période d'hospitalisation plus courte que les précédents, il demeure encore trop dispendieux pour les populations concernées.

Initialement développé comme anticancéreux, la miltéfosine (Impavido®) est le seul traitement administrable par voie orale. Ce traitement semble être efficace contre la

leishmaniose viscérale puisque 95% des patients traités lors d'essais cliniques ont guéris (OMS). Il n'est actuellement utilisé qu'en Inde.

1.1.3.3 Vaccins

Actuellement, il n'y a pas de vaccins prophylactiques efficaces contre la leishmaniose qui soient disponibles. Les vaccins de première génération utilisaient le parasite vivant en présence ou non d'adjuvants. Avec les connaissances de plus en plus complètes sur *Leishmania*, des vaccins dits de seconde génération sont testés. Ces vaccins sont basés sur l'utilisation de molécules recombinantes ou d'organismes exprimant des antigènes de *Leishmania*.

Du fait de leur forte implication dans les mécanismes qui permettent au parasite de s'établir dans l'hôte, la protéine GP63 et le glycoconjugué de surface LPG sont deux candidats très intéressants pour la mise au point d'un vaccin. De plus, le génome de *L. major* étant totalement séquencé et celui de *L. infantum* et de *L. braziliensis* étant en voie de l'être, il est fort probable que de nouveaux candidats soient prochainement découverts (Ivens *et al.*, 2005).

En conclusion, il est clair qu'une lutte efficace contre la leishmaniose s'accompagne par la production de nouveaux médicaments moins onéreux et moins nocifs que les précédents. L'usage de ces derniers devra également être simplifié dans le but de limiter les coûts relatifs à l'hospitalisation. La lutte peut également se réaliser par un dépistage actif de la maladie d'autant plus que les coûts associés au diagnostic sont moins onéreux que ceux qui sont associés au traitement. Toutes ces dispositions ne peuvent toutefois être efficaces que dans la mesure où la population est suffisamment éduquée sur les moyens de prévention.

1.2 *Leishmania*

C'est en 1900, lors de la mise au point d'une technique de coloration sanguine effectuée sur un frottis de rate d'un soldat mort de la fièvre Dum-Dum en Inde, que Sir W.B. Leishman a découvert *Leishmania*. Trois ans plus tard le médecin militaire C. Donovan identifie le même agent pathogène lors d'une biopsie de rate d'un patient indien également atteint de Kala-azar. C'est donc en leur honneur que ce parasite fut appelé *Leishmania donovani*.

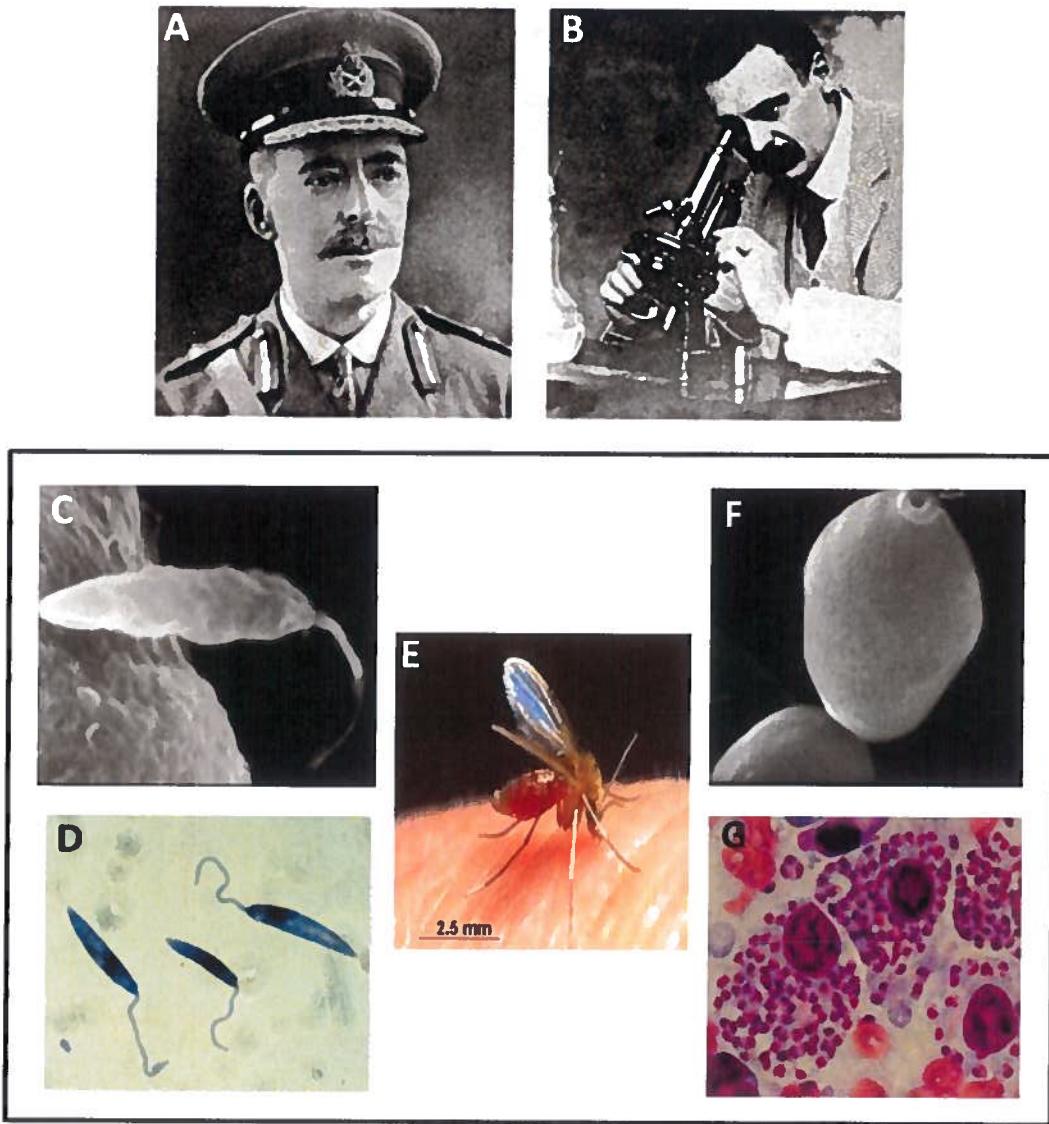
1.2.1 Cycle de vie

Leishmania est un parasite eucaryote protozoaire appartenant à la famille des *Trypanosomatidae*. Durant son cycle de vie, il alterne entre son vecteur invertébré (le phlébotome) et son hôte mammifère (Homme, chien, chat, rongeur). L'Homme représente un hôte important pour *Leishmania* puisque vingt-et-une des trente espèces de leishmanies qui infectent les mammifères infectent l'être humain.

Le phlébotome est un diptère de très petite taille (2 à 3 mm de long), dont seule la femelle est vecteur de la maladie (Figure 2 E). En 1921, les frères Sergent (biologistes), ont pour la première fois mis en évidence la transmission de *Leishmania* par cet insecte en s'appliquant des broyats de phlébotome sur des lésions cutanées. Selon la zone géographique dans laquelle l'insecte se trouve, on parle de phlébotome du genre *Phlebotomus* (Ancien Monde) ou *Lutzomyia* (Nouveau Monde).

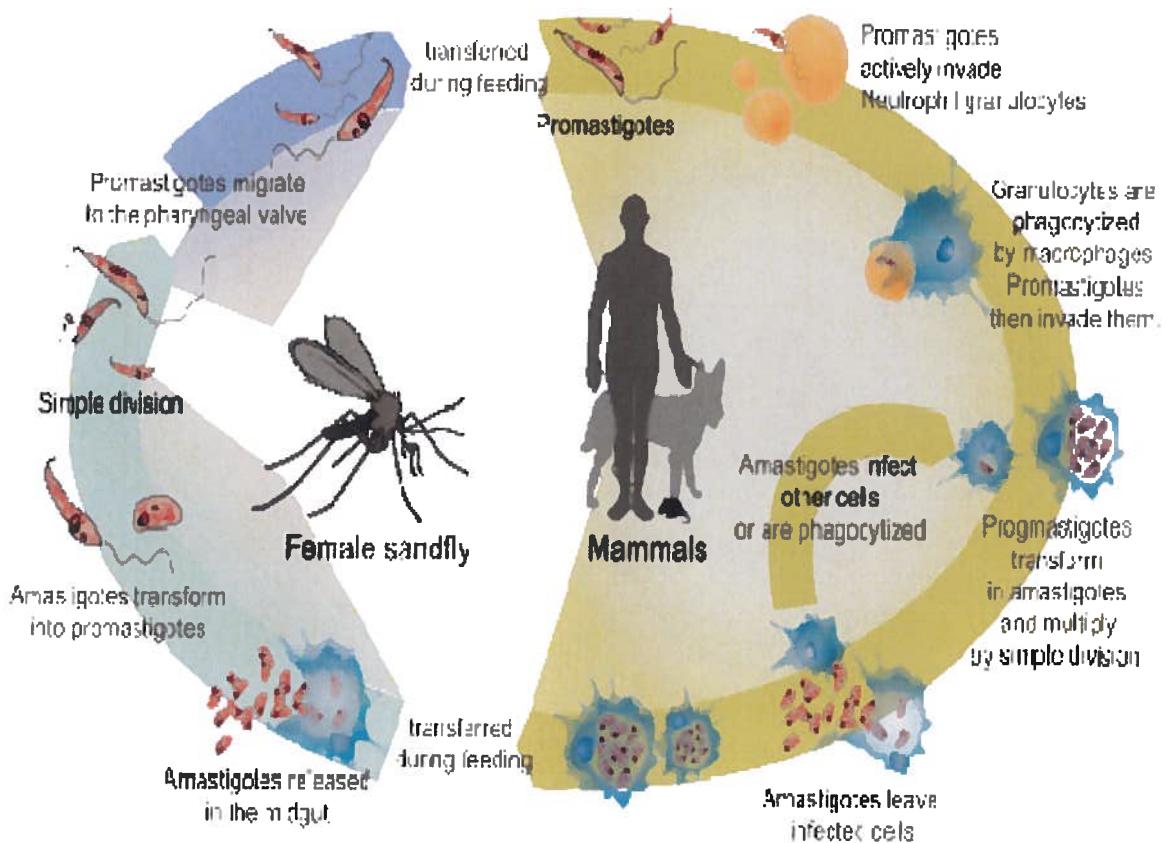
Durant son développement, *Leishmania* alterne entre deux formes : le stade promastigote (15 à 25 µm) allongé et motile grâce à la présence d'un long flagelle (Figure 2 C, D), et la forme amastigote non-motile et de petite taille (2 à 6 µm), anciennement appelée corps de Leishman-Donovan (Figure 2 F, G). Les premières étapes du cycle de vie de *Leishmania* se déroulent dans le phlébotome. Le promastigote procyclique (forme

non-infectieuse et capable de se multiplier) se transforme en promastigote métacyclique (forme infectieuse et incapable de se diviser), durant un processus nommé la métacyclogenèse (Sacks, 1989). Suite à cette transformation, le promastigote métacyclique se détache des cellules du tube digestif pour migrer vers la bouche de l'insecte et ensuite être injecté dans l'organisme hôte mammifère pendant un repas sanguin. Une fois inoculé dans l'hôte mammifère, le promastigote métacyclique est rapidement phagocyté par le macrophage (cellule hôte principale). Récemment, certaines études ont suggérées que le promastigote transite par le neutrophile avant de se retrouver dans le macrophage (John *et al.*, 2008, Peters *et al.*, 2009, Peters *et al.*, 2008). Une fois dans le macrophage, le promastigote se différencie en amastigote qui se multiplie. Cette prolifération entraîne la rupture des cellules ainsi que le relargage de *Leishmania*. Les amastigotes relâchés sont phagocytés par les macrophages environnants ou plus rarement par les cellules dendritiques et fibroblastes. Le cycle s'achève par un repas sanguin sur un hôte infecté durant lequel le phlébotome femelle ingère les macrophages contenant les amastigotes. Ces amastigotes sont relâchés dans la mouche et se redifférencient en promastigotes procycliques (Figure 3).



A), B) (Roberts *et al.*, 2000)

Figure 2 : Le parasite *Leishmania*. A, B) *L. donovani* fut la première espèce de leishmanie à être découverte en 1900 et 1903 respectivement par William Leishman (A) et Charles Donovan (B). C) Image de microscopie électronique d'un promastigote attaché à la surface d'un macrophage. D) Photo de promastigotes libres obtenue suite à une coloration au Giemsa. E) Phlébotome femelle. F) Image de microscopie électronique d'un amastigote hors de la cellule. G) Photo d'amastigotes internalisés par les macrophages obtenue suite à une coloration au Giemsa.



Représentation de Mariana Ruiz Villarreal

Figure 3 : Cycle de vie de *Leishmania*.

1.2.2 Le réservoir

La leishmaniose étant une zoonose, les réservoirs sont des animaux : paresseux, lapins, primates, chauves-souris (Nouveau-Monde) ; petits rongeurs et chiens (Ancien Monde). Toutefois pour certaines espèces de leishmanies, l'Homme peut représenter un réservoir important. C'est le cas dans certaines régions en Inde où la maladie est plutôt une anthroponozonose.

1.2.3 LPG et GP63, deux glycoconjugués essentiels à la virulence de *Leishmania*

Que ce soit dans le phlébotome ou dans l'hôte mammifère, *Leishmania* est continuellement soumis à un environnement qui lui est hostile (système digestif, macrophages, neutrophiles). Afin de survivre et de se développer dans un tel milieu, le parasite a développé des stratégies dont certaines mettent en jeu ses glycoconjugués de surface. Les glycoconjugués sont des molécules constituées de chaînes oligosaccharidiques associées de façon covalente à une protéine ou un lipide. Le glycocalyx de *Leishmania* est formé par le lipophosphoglycan (LPG), la protéine GP63, le glycoinositol phospholipide (GIPL), le protéophosphoglycan (PPG) et la phosphatase alcaline sécrétée (AP) (Figure 4 B).

Parmi toutes ces molécules, ce sont le LPG et la protéine GP63 qui ont suscitées le plus d'intérêt et de ce fait ont été les mieux caractérisées.

1.2.3.1 Le LPG

1.2.3.1.1 Biosynthèse et structure du LPG

Le lipophosphoglycan est un glycoconjugué composé de quatre domaines (Figure 4 A) :

- une ancre lipidique 1-O-alkyl-2-lyso-phosphatidyl inositol grâce à laquelle il s'insère dans la membrane du parasite,
- un long polymère de phosphoglycans composé d'unités répétées $[-_6\text{Gal}\beta_4\text{Man}_\alpha\text{-PO}_4-]_n$ que l'on ne retrouve pas chez les mammifères et pour lequel n varie de 10 à 40,
- une petite coiffe oligosaccharidique,
- un corps glycan.

Le LPG varie selon l'espèce de leishmanie. C'est au niveau des sous-unités répétées contenant la chaîne de phosphoglycans $[-_6\text{Gal}\beta_4\text{Man}_\alpha\text{-PO}_4-]$ que se joue son polymorphisme via l'ajout et la substitution de divers sucres au niveau du galactose et/ou du mannose. Trois classes de LPG sont connues (McConville *et al.*, 1995) :

- LPGs de type 1 qui ne possèdent pas de substitution et concernent le LPG des leishmanies de l'Afrique de l'Est (ex. *L. donovani*),
- LPGs de type 2 qui contiennent une variété de sucres ramifiés au niveau du résidu galactose (ex. *L. mexicana*, *L. major*, *L. tropica*),
- LPGs de type 3 qui présentent des substitutions à la fois au niveau du résidu galactose et du résidu mannose (ex. *L. aethiopica*).

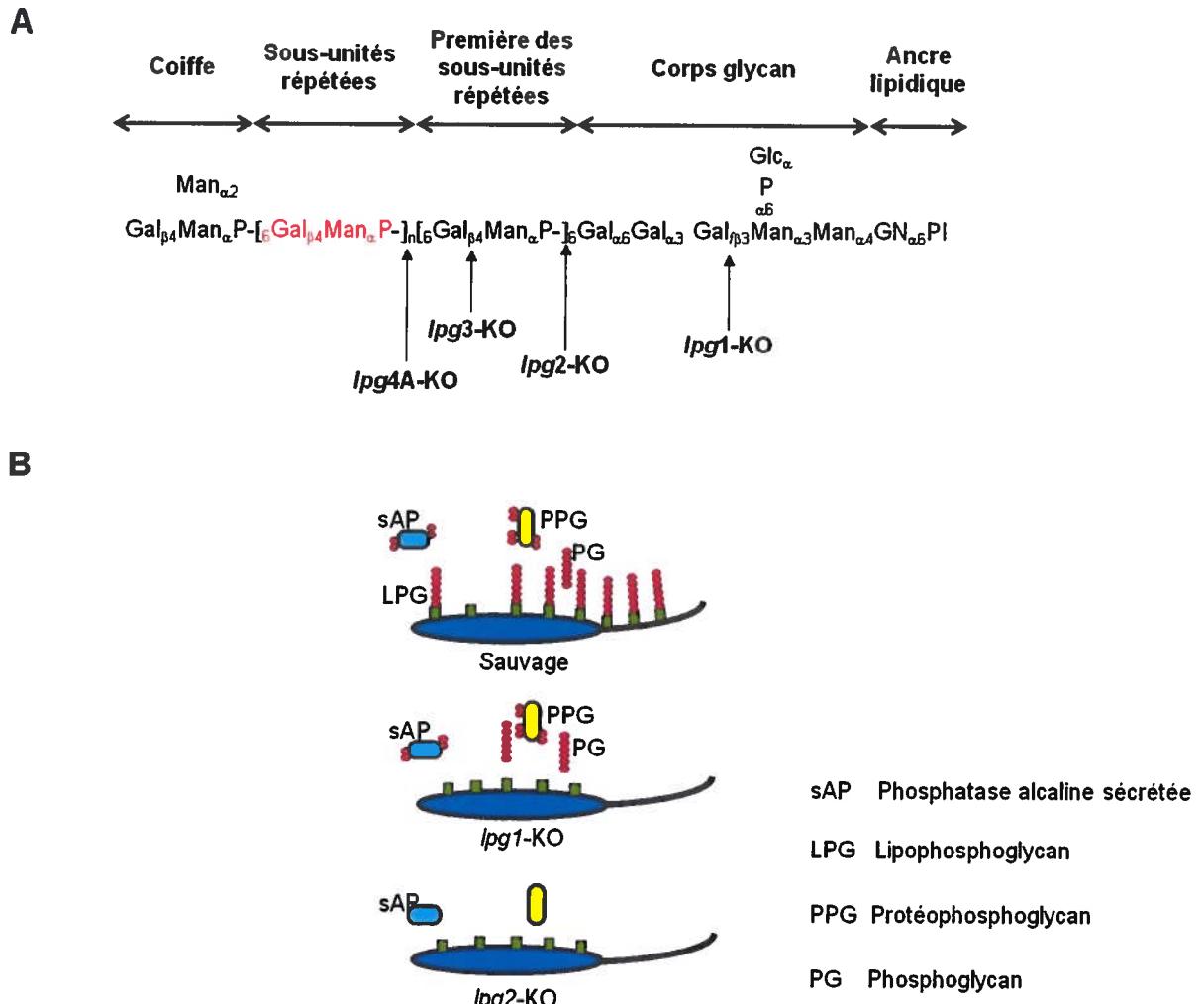
Les études ont montré que le polymorphisme du LPG est directement impliqué dans la spécificité du phlébotome pour les différentes espèces du parasite (Soares *et al.*, 2004, Butcher *et al.*, 1996).

Grâce à l'analyse de promastigotes dépourvus en LPG, de la structure de la molécule, de sa localisation ainsi que de nombreuses études biochimiques, on estime qu'au moins vingt-cinq enzymes sont nécessaires à sa biosynthèse (Beverley *et al.*, 1998,

Carver *et al.*, 1992). A ce jour, cinq mutants du LPG ont été caractérisés et utilisés dans les études :

- *lpg1*-KO déficient en galactofuranosyl-transférase (Galf) (Spath *et al.*, 2000, Huang *et al.*, 1993), ce mutant est le plus spécifique au LPG (Figure 4 A, B).
- *lpg2*-KO muté au niveau d'un transporteur mannose et dépourvu de sous-unités répétées au niveau de tous les glycoconjugués présents à la surface du promastigote (Figure 4 A, B) (Ma *et al.*, 1997, Descoteaux *et al.*, 1995).
- *lpg3*-KO déficient en GRP94, protéine chaperonne impliquée dans l'assemblage des sous-unités répétées. Ce mutant ne synthétise que la première des sous-unités répétées (Descoteaux *et al.*, 2002) (Figure 4 A),
- *lpg4*-KO affecté au niveau d'une glycosyl-transférase, ce mutant ne possède que deux sous-unités répétées (Beverley *et al.*, 1998)
- *lpg5A*-KO et *lpg5B*-KO sont tous deux déficients en transporteurs de galactose (Capul *et al.*, 2007) (Figure 4A).

L'utilisation de ces mutants (notamment de *lpg1*-KO et *lpg2*-KO) a permis d'établir le rôle du LPG dans l'infection par *Leishmania*.



(A) Adapté de (Beverley *et al.*, 1998), (B) (Holm *et al.*, 2001)

Figure 4 : Le lipophosphoglycan. (A) Schéma représentant la structure du LPG et de ses mutants. (B) Schéma illustrant la composition du glycocalyx des promastigotes de type sauvage, *lpg1*-KO et *lpg2*-KO de *Leishmania*.

Le LPG est le glycoconjugué le plus abondamment présent à la surface (corps et flagelle) du promastigote de *Leishmania* (5×10^6 molécules/cellule), et très peu présent voire absent de la surface de l'amastigote (≤ 100 molécules/cellule) (McConville *et al.*, 1991). Bien que les mécanismes par lesquels le parasite régule la présence de LPG à sa surface ne soient pas bien connus, il semblerait qu'une diminution de l'activité de la mannosylphosphoryltransferase (MPT) chez l'amastigote soit impliquée (Mengeling *et al.*, 1997).

1.2.3.1.2 Interaction LPG/Phlébotome

La différenciation du promastigote procyclique (non-infectieux) en promastigote métacyclique (infectieux) se réalise dans l'intestin du phlébotome durant la métacyclogenèse. Pour éviter l'élimination suite à un repas sanguin, le promastigote procyclique se lie aux lectines de la paroi intestinale de la mouche par l'intermédiaire du LPG (Sacks *et al.*, 2000). Une fois différenciés, les promastigotes métacycliques se détachent des lectines et migrent vers la bouche du phlébotome pour être par la suite inoculés à l'organisme hôte. Le doublement du nombre de sous-unités répétées, la modification des chaînes latérales ainsi que des substitutions ou la perte de sucres au niveau de la coiffe du LPG durant la métacyclogenèse sont responsables de ce détachement (Soares *et al.*, 2005, Soares *et al.*, 2002, Mahoney *et al.*, 1999a, Mahoney *et al.*, 1999b, Sacks *et al.*, 1995, McConville *et al.*, 1992). Il a également été montré que le LPG permet à *Leishmania* d'éviter d'être digéré dans l'intestin de la mouche.

1.2.3.1.3 Rôle du LPG lors de l'infection dans le macrophage

Le macrophage est la cellule hôte principale de *Leishmania* et la quasi-totalité des études portant sur le rôle du LPG durant l'infection de l'organisme hôte ont été réalisées chez ce phagocyte.

Le LPG contribue à la liaison du promastigote au macrophage en agissant en tant que motif moléculaire associé au pathogène (PAMP). En effet, il interagit avec les récepteurs aux protéines du compléments CR3, CR1, le récepteur de la protéine c-réactive (CRP-R), la protéine p150,95 et la protéine de liaison au mannose (MBP) qui sont présentes à la surface de la cellule (Culley *et al.*, 1996, Green *et al.*, 1994, Talamas-Rohana *et al.*, 1990). C'est par l'utilisation des mutants déficients en LPG ainsi que de LPG purifié à partir de promastigotes que les chercheurs ont montré que cette molécule est un important facteur de virulence pour toutes les espèces de leishmanies étudiées, excepté pour *L. mexicana* (Ilg, 2000). En son absence le promastigote ne survie pas dans le macrophage. Dès les cinq premières minutes suivant l'infection, le LPG s'insère dans la membrane du phagosome dans un premier temps au niveau du point d'entrée du parasite pour finalement diffuser sur la totalité de la membrane (Tolson *et al.*, 1990). Cette insertion n'est pas aléatoire et s'effectue au niveau des radeaux lipidiques qui sont des micro-domaines membranaires enrichis en certains lipides et fortement impliqués dans la transduction du signal (Winberg *et al.*, 2009, Dermine *et al.*, 2005). En s'insérant dans ces structures, on comprend aisément que le LPG altère certaines voies de signalisation du macrophage. Le LPG retarde également la maturation phagosomale (Lodge *et al.*, 2005b, Dermine *et al.*, 2000, Desjardins *et al.*, 1997) en empêchant le relargage de la F-actine (Holm *et al.*, 2001, Lodge *et al.*, 2005a), en retardant l'acquisition de marqueurs lysosomaux tardifs tels que LAMP-1 et Rab-7 (Scianimanico *et al.*, 1999), et en inhibant le recrutement de la pompe à protons V-ATPase (Vinet *et al.*, 2009).

Le LPG permet également l'établissement de l'infection en régulant à la baisse l'expression de gènes codant des protéines pro-inflammatoires telle que l'IL-1 β (Hatzigeorgiou *et al.*, 1996) et en empêchant l'assemblage de la NADPH oxydase au phagosome (Lodge *et al.*, 2006). Plusieurs études montrent que certains de ces phénomènes sont le résultat d'un ciblage de la protéine kinase C (PKC) par le LPG (Holm *et al.*, 2003, Giorgione *et al.*, 1996, Descoteaux *et al.*, 1991, McNeely *et al.*, 1989). Sa présence en quantité très abondante à la surface du promastigote permet également au parasite de résister à l'action lytique des protéines du complément en empêchant leur insertion dans la membrane (Spath *et al.*, 2003, Puentes *et al.*, 1990).

Aux vues de ces résultats, des équipes ont utilisé des épitopes du LPG purifié ou des promastigotes dépourvus en LPG pour produire des vaccins contre *Leishmania*. A l'issu de ce traitement, les souris ont résisté à l'infection par *L. major*, *L. donovani* et *L. amazonensis* (Pinheiro *et al.*, 2007, Uzonna *et al.*, 2004, Mukhopadhyay *et al.*, 1999).

Il y a peu d'études sur le rôle du LPG dans des cellules autres que le macrophage. Cependant, une récente étude a montré son implication dans l'inhibition de la présentation antigénique ainsi que dans l'orientation de la réponse immunitaire vers une réponse de type Th2 par les cellules dendritiques (Liu *et al.*, 2009).

1.2.3.2 *La protéine GP63*

Découverte dans les années 1980 (Russell *et al.*, 1986), la metalloprotéase GP63 est le second glycoconjugué majoritaire de surface de *Leishmania* (5×10^5 /cellule) et est à la fois présente sur le corps et le flagelle du parasite (Bouvier *et al.*, 1987). Il s'agit d'une glycoprotéine de 63 kDa conservée chez différentes espèces de *Leishmania*. Cette protéine est également connue sous les termes de leishmanolysine, protéine de surface du promastigote (PSP) et protéase majoritaire de surface (MSP). Deux types de GP63 sont synthétisés, une forme membranaire ancrée à la surface de *Leishmania* via une ancre lipidique et une forme sécrétée (moins étudiée) (Jaffe *et al.*, 2003, McGwire *et al.*, 2002). Bien que les études montrent que GP63 est présente sous sa forme membranaire à la fois chez le promastigote et l'amastigote, son rôle chez ce dernier est moins connu (Frommel *et al.*, 1990, Medina-Acosta *et al.*, 1989).

Comme le LPG, GP63 est un important facteur de virulence pour *Leishmania*. En effet, bien que les promastigotes déficients ou atténués en gp63 se développent correctement dans le phlébotome, ils sont moins virulents et l'infection est plus lente à s'établir (Thiakaki *et al.*, 2006, Joshi *et al.*, 2002). De plus, les études révèlent que les promastigotes métacycliques expriment quatorze fois plus de GP63 que les promastigotes procycliques (Yao *et al.*, 2002). La leishmanolysine possède une activité protéase qui lui permet d'altérer les voies de signalisation du macrophage ainsi que celles du fibroblaste

(qui peut être une cellule hôte pour *Leishmania*). En effet, grâce à son activité protéase GP63 dégrade des protéines régulatrices de l'actine dans le fibroblaste et active les protéines tyrosines phosphatases (SHP-1, PTP1B et TCPTP) du macrophage impliquées dans l'inhibition des voies de signalisation menant à l'activation de la cellule (Halle *et al.*, 2009, Gomez *et al.*, 2009). Son activité enzymatique est également responsable de la dégradation des constituants de la matrice extracellulaire telle que la fibronectine (Kulkarni *et al.*, 2008, Etges *et al.*, 1986). Une étude a montré qu'en digérant les éléments de la matrice, GP63 augmente la migration de *Leishmania* et de ce fait favorise l'infection (McGwire *et al.*, 2003). Sa présence est également associée à la résistance du promastigote contre les peptides antimicrobiens et les protéines du complément (Kulkarni *et al.*, 2006, Thiakaki *et al.*, 2006, Joshi *et al.*, 2002). L'un des processus par lesquels la leishmanolysine protège le parasite de la destruction par le complément est la conversion de la protéine C3b en une forme inactive C3b_i (Brittingham *et al.*, 1995). La modification de C3b empêche le recrutement des autres éléments du complément responsables de la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC). C3b_i ainsi formée, va également favoriser l'internalisation de *Leishmania* par le macrophage en se liant à GP63 et en reconnaissant par la suite le récepteur CR3. GP63 favorise également l'internalisation des promastigotes en se liant à C3b (qui va elle-même se fixer au récepteur CR1), en interagissant directement avec le récepteur CR3 ou en reconnaissant le récepteur de la fibronectine (Brittingham *et al.*, 1999, Brittingham *et al.*, 1995, Russell *et al.*, 1988, Russell *et al.*, 1986).

Etant donné sa forte implication dans l'établissement de l'infection, certaines équipes de recherche ont testé la contribution de la protéine GP63 dans la production de vaccins prophylactiques contre *Leishmania*. L'utilisation de GP63 recombinante ou purifiée à partir de promastigotes a permis d'obtenir une protection efficace contre l'infection par *L. donovani* et *L. major* chez la souris (Bhowmick *et al.*, 2008, Jaafari *et al.*, 2006).

2 *Le neutrophile*

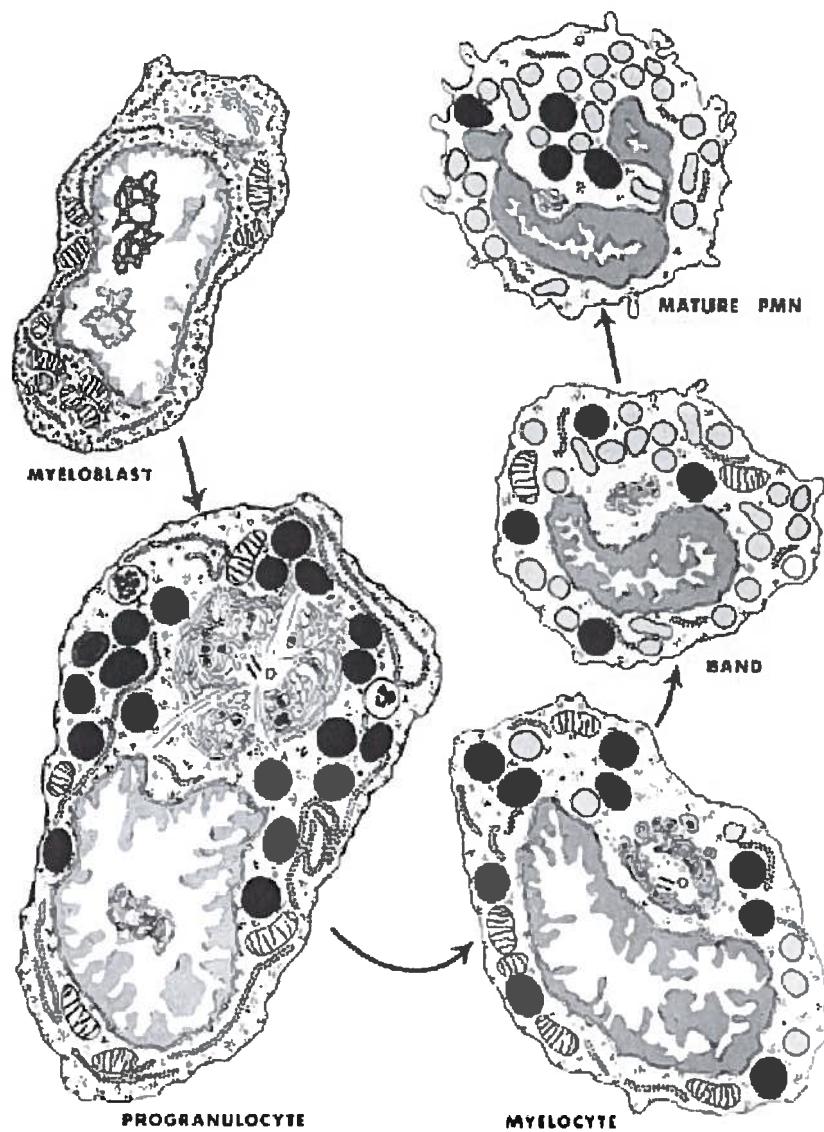
Le neutrophile a été découvert en 1879 par l'histologiste allemand Paul Ehrlich. A cette époque, on parlait de « cellule polynucléaire ». Suite aux résultats qui démontrèrent que cette cellule ne possède bien qu'un seul noyau mais polylobé, l'appellation a été modifiée pour « cellule à noyau polymorphe ». Très vite Metchnikoff, emploi ce terme dans ses travaux et le transforme pour « leucocyte polymorphonucléaire » (PMN). Il a également utilisé le terme de « microphage » en référence à la capacité phagocytique de ces cellules et au fait qu'elles soient plus petites que les macrophages. Le terme définitif de « neutrophile » n'est venu que plus tard suite aux observations de Metchnikoff qui découvrit que ces cellules possèdent de nombreux granules dont certains sont détectables via l'utilisation de marqueurs acides et d'autres via l'usage de marqueurs basiques.

2.1 Formation

Les neutrophiles sont issus de la différenciation des cellules souches pluripotentes de la moelle osseuse, c'est-à-dire de l'hématopoïèse. Ce processus est régulé par la présence de cytokines, les « Colony-Stimulating Factors » (CSFs) qui jouent un rôle de facteurs de croissance (Barreda *et al.*, 2004). Selon le type de CSF auquel la cellule souche est soumise, elle se différencie soit en cellule lymphoïde soit en cellule souche myéloïde précurseur des granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), monocytes, plaquettes et globules rouges. En se basant en grande partie sur des analyses morphologiques, on distingue cinq stades de différenciation cellulaire menant à la formation du neutrophile mature : le stade myéloblaste, promyélocyte, myélocyte, métamyélocyte et enfin neutrophile mature. Ce processus prend environ 14 jours (Cartwright *et al.*, 1964).

2.1.1 Hématopoïèse, les différentes étapes de maturation du neutrophile

Le myéloblaste est le premier stade de différenciation du neutrophile. C'est une cellule unipotente, ronde, de petite taille ($\sim 10\mu\text{m}$) caractérisée par la présence d'un grand noyau ovale (Figure 5). A ce stade, les granules ne sont pas encore formés mais on observe la présence de nombreux polysomes et mitochondries. Le second stade de différenciation est constitué par le promyélocyte (ou progranulocyte). Cette cellule est moins ronde et légèrement plus grande que le myéloblaste ($\sim 15\mu\text{m}$) (Figure 5). En plus d'être caractérisé par l'apparition des granules azurophiles, on observe au stade promyéocytaire un important accroissement du volume du cytoplasme permettant une augmentation de la quantité de réticulum endoplasmique rugueux, ainsi qu'une croissance de l'appareil de Golgi. L'augmentation du Golgi et du réticulum témoigne de la forte production de granules à ce stade. Plus la cellule est dans un état avancé de différenciation promyéocytaire, plus elle contient de granules azurophiles et plus elle grossit. Ensuite vient le stade myéocytaire qui s'accompagne de la formation des granules spécifiques (ou secondaires) qui s'ajoutent aux granules azurophiles précédemment formés. Cellule de petite taille (8 à $12\mu\text{m}$), le myéocyte possède un noyau dentelé et une chromatine très condensée (Figure 5). Puis le myéocyte se transforme en métamyéocyte (dit « band cell »). A cette étape, la cellule possède déjà un noyau segmenté. Dans les métamyéocytes, les granules qui prédominent sont les granules spécifiques (80-90 %). Finalement, cette cellule devient un neutrophile mature de 12 à $14\mu\text{m}$. Le neutrophile mature se différencie des autres stades de maturation par la présence d'un noyau clairement multilobé (2 à 5 lobes) (Bainton *et al.*, 1971, Bainton *et al.*, 1966, Killmann *et al.*, 1962). Le PMN nouvellement formé passe de la moelle osseuse à la circulation sanguine où il a une durée de demi-vie assez brève, de l'ordre de huit heures. Du fait de leur courte durée de demi-vie, la majorité des cellules sanguines produites lors de l'hématopoïèse sont des neutrophiles et le taux de renouvellement de ces derniers est de l'ordre de 10^{11} neutrophiles produits par jour chez un individu adulte (Athens *et al.*, 1961a).



(Bainton *et al.*, 1966)

Figure 5 : Les cinq étapes de différenciation du neutrophile. Les cellules de la moelle osseuse se différencient progressivement en myéloblaste, promyéloblaste (progranulocyte), myélocyte, métamyélocyte (dit « band cell ») et finalement en neutrophile mature. Les cellules ne sont plus capables de se diviser à partir du stade métamyélocyttaire, stade au cours duquel le noyau commence à se lober. La formation des granules se fait de manière séquentielle dès le stade promyélocyte et s'achève au stade « band cell ».

2.1.2 Granulopoïèse

Le neutrophile mature est caractérisé par la présence dans son cytoplasme de nombreuses vésicules, les granules qui se distinguent en quatre catégories : les granules azurophiles (primaires), granules spécifiques (secondaires), granules gélatinases (tertiaires) et les vésicules sécrétoires. Les granules sont les organelles les plus abondants du neutrophile mature et sont formés de manière progressive durant l'hématopoïèse par le processus du nom de granulopoïèse (Kobayashi *et al.*, 2005, Faurschou *et al.*, 2003, Borregaard *et al.*, 1997, Borregaard *et al.*, 1993, Bainton *et al.*, 1966, Athens *et al.*, 1961b). Les premiers granules à être formés sont les granules azurophiles. Du fait de leur haute teneur en myélopéroxidase (MPO), on parle également de granules peroxydase-positifs. Par la suite, la production de MPO cesse et les granules peroxydase-négatifs commencent à se former. Ce second groupe est divisé en deux catégories : les granules secondaires qui se forment dans les myélocytes, et les granules tertiaires produits dans les métamyélocytes (Figure 6). Tous les granules ont une structure commune : une membrane constituée par une bicouche phospholipidique et une matrice intragranulaire contenant des protéines destinées à l'exocytose ou au relargage dans le phagosome contenant un microbe ingéré. Les granules sont classés selon leur taille, leur morphologie ou selon les protéines qu'ils possèdent.

Cette étape de maturation cellulaire est essentielle au bon fonctionnement de la réponse de l'hôte face à l'attaque d'un micro-organisme pathogène puisque la réponse immunitaire impliquant le neutrophile mais en partie en jeu les protéines contenues dans ces granules.

2.1.2.1 *Granules azurophiles*

Pendant longtemps, les granules azurophiles ont été caractérisés comme étant des lysosomes primaires. En effet, ils expriment à leur surface la granulophysine, une protéine similaire à la protéine lysosomale CD63 (Cham *et al.*, 1994). En revanche

contrairement aux lysosomes, les granules azurophiles n'expriment à leur surface ni la protéine LAMP-1, ni la protéine LAMP-2 (Lysosome Associated Membrane Protein – 1/2).

Cette population de granules est très hétérogène car constituée de vésicules de tailles et formes différentes (Egesten *et al.*, 1994, Rice *et al.*, 1987, Bainton *et al.*, 1971, Parmley *et al.*, 1987).

Parmi les protéines présentes dans les granules primaires, on trouve la myélopéroxydase (MPO), l'élastase, les alpha-défensines ainsi que la « Bacterial Permeability-Increasing protein » (BPI), connues pour leur pouvoir microbicide (Faurschou *et al.*, 2003). La MPO est la première protéine de ces granules à être synthétisée. D'ailleurs, c'est par cette dernière que les granules peroxydase-positifs, dont les granules azurophiles sont définis (Figure 7).

2.1.2.2 Granules peroxydase-négatives

Il existe deux types de granules peroxydase-négatifs : les granules spécifiques et les granules gélatinases. Contrairement aux granules azurophiles, les granules peroxydase-négatifs sont de très petite taille.

2.1.2.2.1 Granules spécifiques

Les granules spécifiques contiennent également de nombreuses protéines antimicrobiennes (Figure 7). Ils sont caractérisés par la présence de lactoferrine et par une faible teneur en gélatinase (Faurschou *et al.*, 2003).

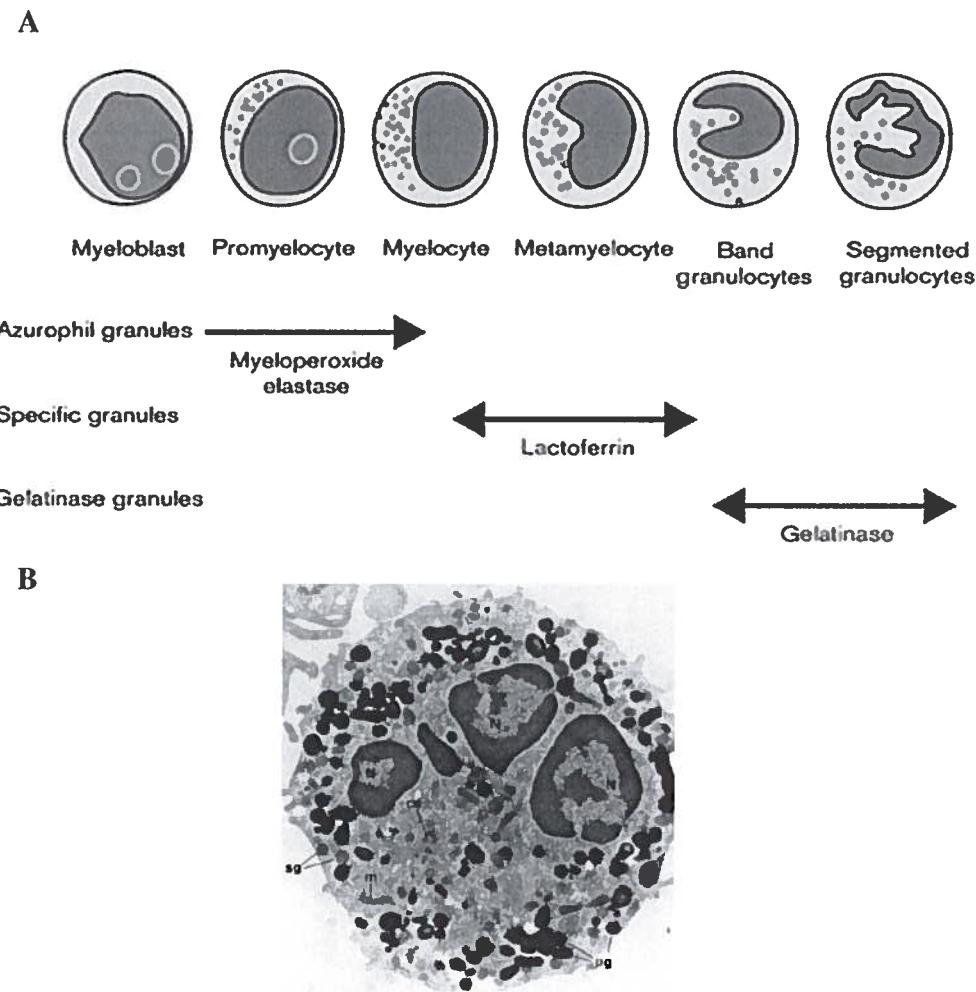
La membrane de ces granules est un important réservoir en protéines impliquées dans l'adhérence du neutrophile. Elle est également enrichie en flavocytochrome b₅₅₈ (composante de la NADPH oxydase), un important effecteur de la réponse du neutrophile dépendante de l'oxygène contre les micro-organismes pathogènes (Gullberg *et al.*, 1997).

2.1.2.2.2 Granules gélatinases

Comme leur nom l'indique, les granules gélatinase ont une forte teneur en gélatinase. Etant donné que cette enzyme permet la dégradation de la matrice extracellulaire, ces granules sont fortement impliqués dans l'extravasation et la diapédèse du neutrophile (Faurschou *et al.*, 2003).

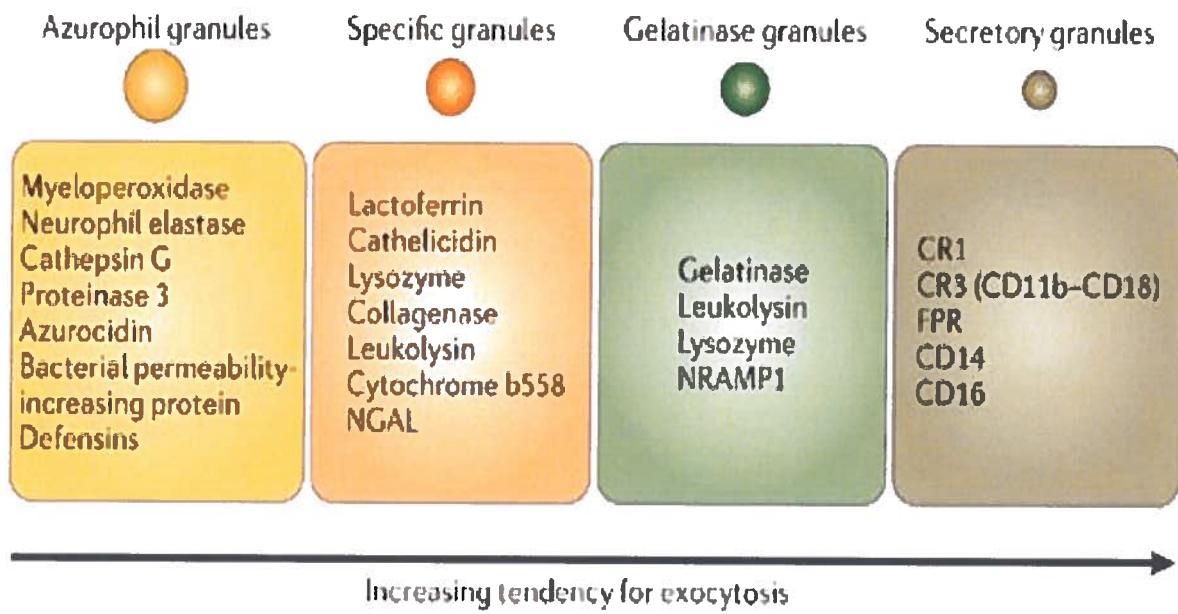
2.1.2.3 Vésicules sécrétoires

Les vésicules sécrétoires sont les derniers granules à être formés. La présence au niveau de leur membrane de récepteurs tels que CR1, Fc γ III, CD14 et la β 2-intégrine, témoigne de leur implication dans les phases précoce de la réponse inflammatoire. En effet, beaucoup de ces récepteurs sont mis en jeu pour les interactions entre le neutrophile et les cellules endothéliales qui ont lieu durant l'étape du roulement (cf. chap. 2.2.1.1) (Borregaard *et al.*, 1997). Le contenu cytosolique des vésicules sécrétoires est uniquement composé de protéines du plasma.



(Witko-Sarsat *et al.*, 2000)

Figure 6 : Etapes de la granulopoïèse. A) La granulopoïèse est un processus progressif par lequel les granules du neutrophiles sont formés. Trois types de granules en plus des vésicules sécrétoires sont synthétisés : les granules azurophiles (du stade myéloblaste au stade myélocyte), les granules spécifiques (du stade myélocyte au stade métamyélocyte) et les granules gélatinase (à la fin de l'hématopoïèse). Les différents granules se distinguent entre-autres par leur contenu protéique. Les granules azurophiles, spécifiques et gélatinases sont respectivement caractérisés par la présence de myélopéroxydase, de lactoferrine et de gélatinase. B) Photo obtenue en microscopie électronique d'un neutrophile mature et de ses granules. Les gros granules qui apparaissent en noir sont les granules azurophiles (pg), les granules spécifiques (sg) sont de plus petite taille et apparaissent en gris. N, Noyau ; ce, centriole ; m, mitochondrie.



(Pham, 2006)

Figure 7 : Contenu des granules du neutrophile (liste non-exhaustive).
 NGAL, “Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin”; NRAMP1, “Natural-Resistance-Associated Macrophage Protein 1”; CR, Récepteur des protéines du Complément ; FPR, “Formyl Peptide Receptor” ; CD, “Cluster of Differentiation”.

2.2 Rôle du neutrophile dans la réponse immunitaire innée

La mise en place de la réponse immunitaire innée est la première étape de la lutte contre l'intrusion d'un microbe. Elle est très rapide et met en jeu des cellules phagocytaires (macrophages, monocytes, neutrophiles), les cellules lymphocytaires « Natural Killer » ainsi que les protéines du complément. Représentant 50 à 70% des leucocytes circulants, le neutrophile en est l'élément majeur. En effet, les individus souffrant de neutropénie, ou atteints de la maladie chronique granulomateuse (CGD) pour laquelle les neutrophiles présentent des mutations au niveau de certains gènes, sont plus susceptibles aux infections bactériennes et fongiques et présentent un taux de mortalité à ces types d'infections plus élevé que les personnes saines (Nauseef, 2007, Lekstrom-Himes *et al.*, 2000, Welte *et al.*, 1997, Welte *et al.*, 1996).

Pour accomplir son rôle, le neutrophile doit rapidement quitter la circulation sanguine et migrer vers le site d'infection. Une fois au site, il reconnaît le microbe puis exerce son activité antimicrobienne grâce à la dégranulation ou via la formation de « Neutrophil Extracellular Traps » (NETs) (Figure 8, Figure 9).

2.2.1 Recrutement du neutrophile

Les étapes menant au recrutement des neutrophiles au site d'infection ont été détaillées pour la première fois en 1935 chez l'amphibien et le lapin. Elles comprennent le roulement, l'adhésion ferme, la diapédèse et la migration du neutrophile vers le site d'infection (Clark *et al.*, 1935).

2.2.1.1 Roulement

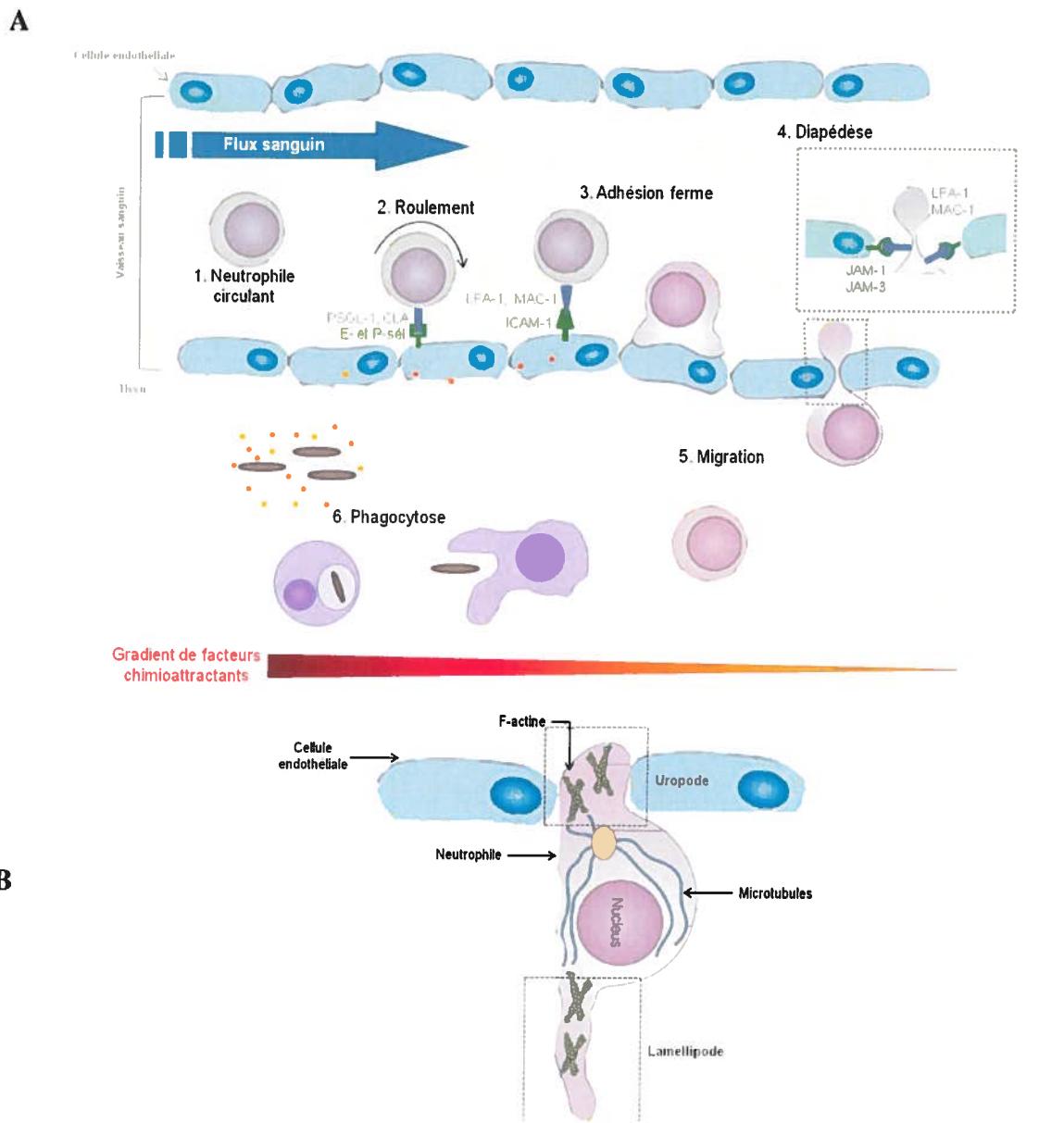
Suite à l'activation par le TNF- α et l'IL-1, les cellules endothéliales expriment les sélectines de type P- et E- (CD62P et CD62E) à leur surface (Mantovani *et al.*, 1992). Ces molécules sont des glycoprotéines membranaires qui interagissent, respectivement avec le

ligand-1 de la glycoprotéine P-sélectine (PSGL-1) et avec l'antigène cutané associé aux lymphocytes (CLA) présents à la surface du neutrophile. Ces interactions réversibles et de faible affinité, ralentissent le neutrophile qui est entraîné par le flux sanguin et lui permettent de rouler le long de l'endothélium vasculaire (Figure 8 A-1,2) (Moore *et al.*, 1995, Garrood *et al.*, 2006).

2.2.1.2 Adhésion ferme et diapedèse

Le roulement des neutrophiles est arrêté suite à l'expression d'ICAM-1(CD50) par les cellules endothéliales et de leurs récepteurs LFA-1 (CD11a/CD18) et Mac-1 (CD11b/CD18) par le neutrophile (Mantovani *et al.*, 1992). Contrairement à l'étape précédente, les interactions entre ces molécules sont fermes et permettent aux leucocytes de résister au flux sanguin en adhérant aux cellules (Figure 8 A-3). Le neutrophile traverse ensuite l'endothélium en passant entre les jonctions cellule/cellule, c'est la diapédèse. Au niveau des jonctions, les cellules expriment les molecules-1 et -3 d'adhésion jonctionnelle (JAM-1 et JAM-3) qui se lient à LFA-1 et Mac-1 (Figure 8 A-4) (Chavakis *et al.*, 2004, Ostermann *et al.*, 2002). Pour migrer vers le site d'infection, le neutrophile réorganise les éléments de son cytosquelette. La modification de la localisation de la F-actine et des microtubules, lui permet de projeter vers l'avant un lamellipode (par lequel il avance) et un uropode vers l'arrière qui se rétracte (Figure 8 B) (Eddy *et al.*, 2002).

La migration s'effectue le long d'un gradient de facteurs chimioattractants qui augmente en direction du site d'infection (Figure 8 A). Ces facteurs sont des molécules solubles qui proviennent des bactéries (peptides formylés (fMLP), lipopolysaccharide (LPS)), ou issus de l'hôte lui-même (protéine C5a du complément, leucotriène B4 (LTB4), cytokines IL-1 et -8) (Witko-Sarsat *et al.*, 2000).



Adapté de (Kinashi, 2005)

Figure 8 : Recrutement du neutrophile au site d'infection et phagocytose du microbe. A. (1) Emporté par le flux sanguin, le neutrophile circule dans le vaisseau. (2) Les cellules endothéliales activées expriment les E- et P-sélectines puis interagissent avec les ligands PSGL-1 et CLA du neutrophile. Ces interactions ralentissent le neutrophile et lui permettent de rouler le long de l'endothélium vasculaire. (3) Le neutrophile adhère fermement aux cellules endothéliales grâce aux liaisons LFA-1/Mac-1 et ICAM-1. (4) En modifiant sa morphologie et en mettant en jeu les interactions entre JAM-1/JAM-3 et LFA-1/MAC-1, le neutrophile passe entre les cellules endothéliales et (5) migre vers le tissu infecté le long d'un gradient de concentration de facteurs chimiotactiques solubles relargués par le microbe ou les cellules adjacentes au site d'infection. (6) Une fois recruté, le neutrophile phagocyte les micro-organismes. B. Le neutrophile traverse l'endothélium en modifiant son cytosquelette d'actine et de microtubules, ce qui lui permet de projeter un lamellipode par lequel il avance et de former un uropode à l'arrière.

2.2.2 Elimination des microbes

2.2.2.1 La phagocytose

Une fois recruté au site d'infection, le neutrophile ingère le microbe par phagocytose. Pour ce faire, il détecte des molécules hautement conservées et présentes à la surface du micro-organisme, les PAMPs, parmi lesquelles on retrouve le LPS, l'acide lipotéichoïque (LTA), le peptidoglycan, la flagelline, le fMLP de certains peptides, les glycans riches en mannose et le lipoarabinomannan (LAM). Ces structures sont reconnues par le neutrophile grâce aux récepteurs membranaires, les PRRs (Pattern-Recognition Receptors) représentés par la protéine CD14, la protéine de reconnaissance du peptidoglycan (PGRP), et les TLRs (Toll-Like Receptors). Les PRRs peuvent également être des récepteurs aux opsonines. En effet, l'opsonisation du microbe par les anticorps ou par les protéines du complément présents dans le sérum de l'hôte augmente la phagocytose. Dans ce cas, les récepteurs aux protéines du complément (CR1, CR3) ainsi que les récepteurs au fragment Fc des anticorps Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIa (CD32) et Fc γ RIIIb (CD16) entrent en jeu (Kobayashi *et al.*, 2005). Une fois phagocyté, le microbe se retrouve dans le phagosome dans lequel il est détruit.

2.2.2.2 Dégranulation

En réponse à l'attaque d'un microbe, le neutrophile mobilise ses granules et entre dans un processus de dégranulation. Les premiers granules à être exocytés sont les vésicules sécrétaires, suivies des granules gélatinases, spécifiques et enfin des granules azurophiles (Faurschou *et al.*, 2003, Sengelov *et al.*, 1995, Sengelov *et al.*, 1993). Grâce à ce processus, le neutrophile va pouvoir être en mesure d'éliminer l'agent pathogène via un mécanisme dépendant ou non de l'oxygène (Figure 9).

2.2.2.2.1 Elimination oxygène-dépendante du micro-organisme pathogène

La NADPH oxydase est l'enzyme responsable de la réponse oxygène-dépendante du neutrophile. Il s'agit d'une enzyme formée par un complexe multiprotéique. A l'état inactif elle est dissociée, une partie de ses composants sont localisés dans le cytoplasme ($p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$, $p40^{\text{phox}}$, Rac1/2) tandis qu'une autre est constitutivement membranaire (flavocytochrome b558, hétérodimère comprenant les protéines $gp91^{\text{phox}}$ et $p22^{\text{phox}}$) (Groemping *et al.*, 2005). Quand l'enzyme est inactive, le flavocytochrome b558 est principalement localisé au niveau de la membrane des granules spécifiques (Borregaard *et al.*, 1984). Durant la dégranulation, les granules migrent vers la membrane plasmique ou phagosomale et fusionnent avec elles pour les enrichir en protéines $gp91^{\text{phox}}$ et $p22^{\text{phox}}$. Les sous-unités cytoplasmiques de la NADPH oxydase transloquent aux membranes pour s'associer au complexe $gp91^{\text{phox}}/p22^{\text{phox}}$. Cette translocation est le résultat d'un changement de conformation des protéines provoqué par la phosphorylation de $p47^{\text{phox}}$ puis de son association à $p67^{\text{phox}}$ (Heyworth *et al.*, 1991, Ago *et al.*, 2003, Allen *et al.*, 1999, Groemping *et al.*, 2005).

L'association des différents éléments de la NADPH oxydase est primordiale à l'activité de l'enzyme. En effet, une fois assemblée, l'enzyme va permettre le transfert d'électrons de la membrane vers une molécule d'oxygène pour générer des espèces réactives oxygénées (ROS) tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'ion superoxyde (O_2^-). Chaque ROS produit à sa propre spécificité quant à son mode d'action et sa propre durée de vie. Certains agissent directement sur le microbe pour le détruire et d'autres activent diverses protéases.

L'importance de la NADPH oxydase et de la production des ROS dans l'élimination d'agents pathogènes par le neutrophile a été démontrée par l'observation de patients souffrant de la maladie granulomateuse chronique. En effet, les individus affectés par cette maladie sont très susceptibles aux infections fongiques et bactériennes. Or, 67% des personnes atteintes de CGD présentent également un défaut dans la protéine $gp91^{\text{phox}}$,

25% sont affectés dans la protéine p47^{phox}, et 5% ont un défaut soit dans p22^{phox} soit dans p67^{phox} (Vignais, 2002, Segal *et al.*, 2009).

L'élimination des microbes par la voie dépendante de l'oxygène peut également mettre en jeu la MPO. Cette enzyme présente dans les granules azurophiles interagit avec l'H₂O₂ formé par la NADPH oxydase et augmente le potentiel oxydatif de celui-ci. Le complexe H₂O₂ – MPO ainsi formé, induit également la formation d'acide hypochloridrique (HOCl) ainsi que d'autres intermédiaires. Tous ces produits peuvent par la suite attaquer la membrane des micro-organismes (Faurschou *et al.*, 2003).

2.2.2.2.2 Elimination oxygène-indépendante du pathogène

Le neutrophile élimine également les micro-organismes pathogènes grâce à l'activité antimicrobienne de nombreuses protéines contenues dans les granules azurophiles et spécifiques.

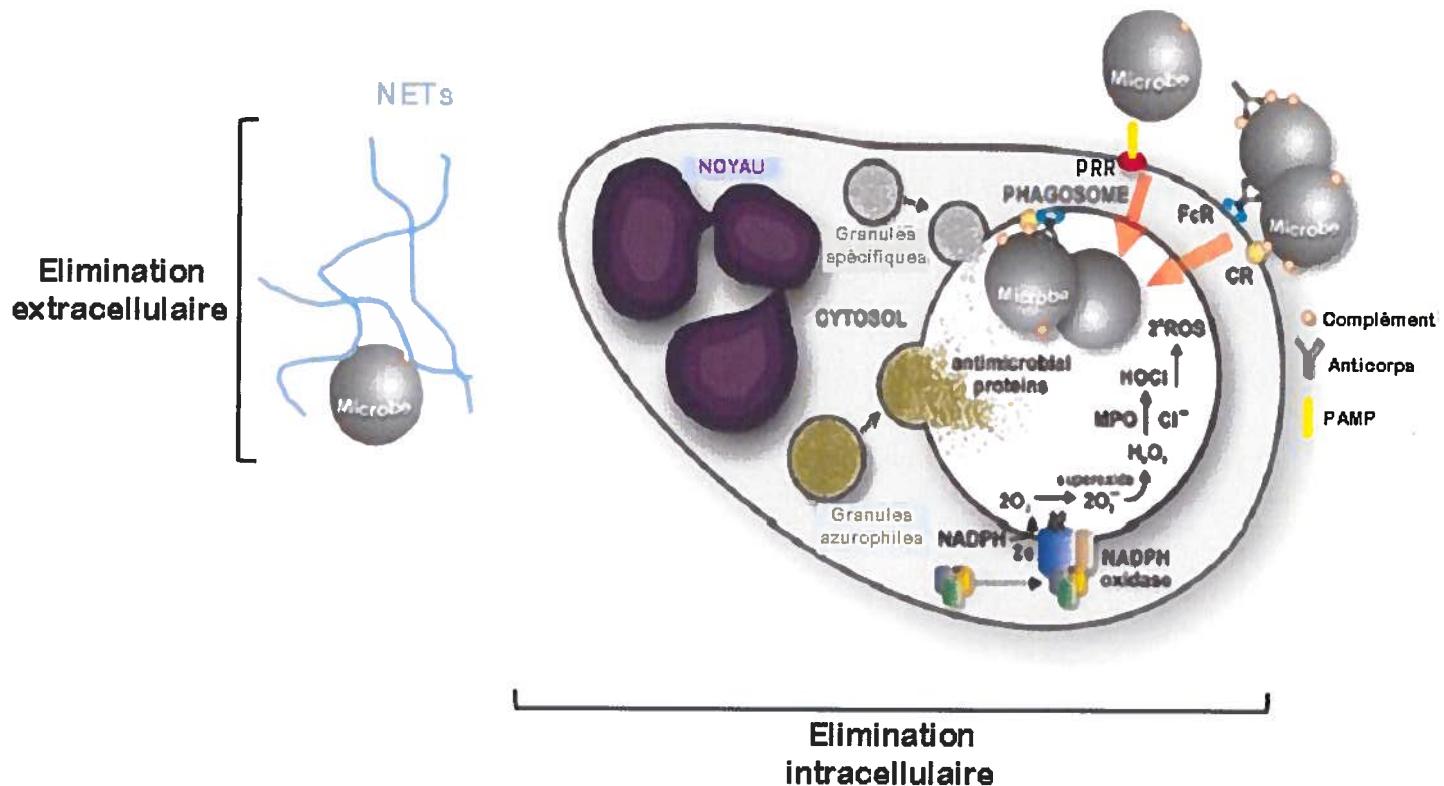
Les alpha-défensines sont de petites protéines (~3,5 kDa) contenues dans les granules primaires qui agissent à la fois sur les bactéries Gram-négatives et Gram-positives en formant des multimères qui forment des pores dans la membrane du microbe (Wimley *et al.*, 1994).

Les serprocidines (proteinase-3, cathepsin G, élastase) sont des serine protéases à activité microbicide. Ces protéines lysent les composants de la matrice extracellulaire telle que l'élastine, la fibronectine, la laminine, le collagène de type IV et la vitronectine (Faurschou *et al.*, 2003).

Présente dans les granules spécifiques, la lactoferrine est une protéine dont l'activité antimicobienne se traduit par son potentiel bactériostatique ainsi que par son aptitude à détruire les micro-organismes pathogènes. En chélant le fer libre, la

lactoferrine prive la bactérie d'un élément indispensable à sa croissance. L'activité bactéricide de cette protéine, dépend quant à elle de la capacité de la lactoferrine à se lier directement aux porines, aux acides lipotéichoïques et aux lipopolysaccharides présents à la surface bactérienne. Cette liaison fragilise la membrane et provoque l'augmentation de la perméabilité de celle-ci, ce qui mène à la lyse de la bactérie (Chapple *et al.*, 1998, Pierce *et al.*, 2009).

D'autres protéines telles que le lysozyme, la protéine BPI sont également relâchées durant la dégranulation et sont impliquées dans l'élimination des micro-organismes pathogènes.



Adapté de (Kobayashi *et al.*, 2005)

Figure 9 : Les différentes voies d'élimination des micro-organismes par le neutrophile. Le neutrophile phagocyte le microbe non-opsonisé via l'interaction PAMP/PRR ainsi que le microbe opsonisé grâce aux récepteurs opsonines-dépendants FcR et CR qui reconnaissent spécifiquement le fragment Fc des anticorps et les protéines du complément présents dans le sérum de l'hôte. Le microbe se retrouve ensuite dans le phagosome dans lequel il est dégradé par les protéines granulaires, les ions superoxydes O_2^- produits par la NADPH oxydase et ses dérivés dont le HOCl formé par la MPO. Le neutrophile peut également détruire le microbe sans le phagocytter via l'induction des NETs.

NETs, « Neutrophil Extracellular Traps » ; PRR, « Pattern-Recognition Receptors » ; PAMP, Motif moléculaire associé au pathogène ; FcR, Récepteur du fragment Fc des anticorps ; CR, Récepteurs des protéines du complément ; MPO, Myélopéroxydase ; H_2O_2 , Peroxyde d'hydrogène ; HOCl, Acide hypochloreux.

2.2.2.3 Les NETs

La contribution du neutrophile dans la réponse immunitaire est souvent associé à sa capacité à phagocytter les microbes. En 2004, un mécanisme d'élimination extracellulaire de micro-organismes pathogènes, connu sous le terme de « Neutrophils Extracellular Traps » (NETs) a été découvert (Brinkmann *et al.*, 2004). Comme le nom l'indique, les NETs sont des structures extracellulaires issues des neutrophiles qui servent à piéger les microbes. Leur formation a largement été conservée au cours de l'évolution puisqu'on les retrouve chez l'Homme, le lapin (Brinkmann *et al.*, 2004), le cheval (Alghamdi *et al.*, 2005), la vache (Grinberg *et al.*, 2008), le poisson (Palic *et al.*, 2007a, Palic *et al.*, 2007b), le chat (Wardini *et al.*, 2009) ainsi que chez la souris (Ermet *et al.*, 2009). La diversité des stimuli responsables de leur formation ainsi que le fait qu'ils aient été conservés au cours de l'évolution témoignent fortement de leur importance dans la réponse immunitaire innée.

2.2.2.3.1 Structure

C'est à la fois grâce aux analyses effectuées par microscopie confocale ainsi que par des études de protéomique que la structure et la composition des NETs ont pu être déterminés (Brinkmann *et al.*, 2004, Urban *et al.*, 2009). Il s'agit de structures très filamenteuses de 15-17 nm de diamètre composées d'ADN et de nombreuses protéines issues des trois types de granules du neutrophile ainsi que du cytoplasme. Contrairement à l'utilisation de protéases, un traitement aux déoxyribonucléases (DNases) suffit à les détruire, ce qui démontre que l'ADN en est l'élément de base. Parmi les protéines majoritairement présentes, on y retrouve les histones, l'élastase, la lactotransférine ainsi que la myélopéroxidase (Table 1) (Urban *et al.*, 2009).

A

Cellular localization	Protein name	Gene name	Swissprot/TREMBL
Granules	Leukocyte elastase	ELA2	P08246
	Lactotransferrin	LTF	P02788
	Azurocidin	AZU1	P20160
	Cathepsin G	C7SG	P08311
	Myeloperoxidase	MPO	P05164
	Leukocyte proteinase 3	PR3	P24158
	Lysozyme C	LYZ	P61626
Nucleus	Neutrophil defensin 1 and 3	DEFB-1 and -3	P59665, P59666
	Histone H2A	H2A	Q9NN63+
	Histone H2B: a) Histone H2B	H2B	Q16786+
	b) Histone H2B-like	H2B	Q3KP43, Q6GMRS
	Histone H3	H3	Q710I3+
Cytoplasm	Histone H4	H4	P62805+
	Myeloid cell nuclear differentiation antigen	MND4	P41218
	S100 calcium-binding protein A8	S100A8	P05109
	S100 calcium binding protein A9	S100A9	P06702
Cytoskeleton	S100 calcium-binding protein A12	S100A12	P80511
	Actin (β) and/or γ	ACTB, ACTG1	P60709, P63261
	Myosin-9	MYH-9	P35579
	Alpha-actinin (1 and/or -4)	ACTN1, ACTN4	P12814, O43707
Peroxisomal	Plastin-2	LCP1	P13796
	Cytookeratin-10	KRT-10	P13645
	Catalase	CAT	P04040
Glycolytic enzymes	Alpha-enolase	ENO1	P06733+
	Transketolase	TKT	P29401

Proteins that localize to NETs. Proteins are organized by their localization in unstimulated neutrophils. Those identified to be NET-associated for the first time in this report are shown in blue. Swissprot/TREMBL accession numbers marked with a "+" denote possible forms of the protein that cannot be discriminated by this analysis. We identified two distanced groups of histone H2B. The larger group of individual histone H2B types we refer to as H2B and the other type that is less well characterized we refer to as "H2B like". All possible accession numbers can be found in the NET Database (<http://web.mpiib-berlin.mpg.de/cgi-bin/pdb/index.cgi>). doi:10.1371/journal.ppat.1000639.t001

B

Protein name	Molecular weight (kDa)	μ moles (per g NET-DNA)	% Molar amount	mg protein (per g NET-DNA)
Histone H2A	16.1	23.60 ± 1.07	26.29	379.3 ± 17.3
Histone H2B	15.3	21.50 ± 0.77	23.95	298.9 ± 10.7
Histone H3	13.9	13.02 ± 1.39	14.50	199.2 ± 21.3
Neutrophil elastase	25.4	5.24 ± 0.85	5.84	133.0 ± 21.5
Histone H4	11.4	3.96 ± 0.39	4.41	45.2 ± 4.5
S100A8	10.8	3.59 ± 0.48	4.00	38.8 ± 5.2
Lactotransferrin	76.0	2.46 ± 0.28	2.74	186.6 ± 21.6
Azurocidin	23.8	2.35 ± 0.44	2.62	55.9 ± 10.6
Cathepsin G	26.6	2.22 ± 0.11	2.47	59.2 ± 2.7
S100A9	13.2	1.77 ± 0.12	1.41	16.7 ± 1.6
Myeloperoxidase	78.4	0.91 ± 0.07	1.01	71.3 ± 5.3
Proteinase 3	24.0	0.64 ± 0.13	0.71	15.5 ± 3.2
Actin	41.8	0.15 ± 0.02	0.17	6.3 ± 0.9
Lysozyme C	14.5	0.12 ± 0.036	0.13	1.8 ± 0.5
Catalase	59.8	0.02 ± 0.001	0.02	1.25 ± 0.07

(Urban et al., 2009)

Table 1 : Eléments constitutifs des Neutrophils Extracellular Traps. A) Liste et origine des protéines présentes sur les NETs. B) Quantification des protéines présentes sur les NETs.

2.2.2.3.2 Formation

Les mécanismes par lesquels le neutrophile forme les NETs ne sont actuellement pas bien connus. Les études montrent qu'ils sont produits par le neutrophile activé soit par des molécules biologiques solubles (PMA, IL-8, LPS), soit par des micro-organismes (bactéries, parasites, champignons) (Table 2). Grâce à la technologie du « live cell imaging » et à la microscopie électronique, il a été montré qu'en réponse à un stimulus, le neutrophile émet des protubérances et s'aplatit (Figure 10). Ensuite le noyau perd ses lobules, la chromatine se décondense menant alors à l'homogénéisation de l'euchromatine et de l'hétérochromatine. Les membranes nucléaire et granulaire se désintègrent, ce qui permet la diffusion de l'ADN dans le cytoplasme ainsi que l'interaction directe entre chromatine et protéines granulaires. Enfin, la membrane cellulaire se rompt, s'ensuit alors le relargage des NETs hors de la cellule (Figure 11A). L'utilisation judicieuse de marqueurs de viabilité cellulaire montre que la genèse des NETs est un processus actif distinct de l'apoptose et de la nécrose qui requiert que le neutrophile demeure vivant jusqu'au moment du relargage (Figure 11) (Fuchs *et al.*, 2007). Le terme de « NETose » a été attribué pour la formation de NETs par le neutrophile et est de plus en plus utilisé dans la littérature (Steinberg *et al.*, 2007).

Du fait d'un manque de modèle animal, les éléments impliqués dans ce processus ne sont pas bien connus. Néanmoins, les études suggèrent que les ROS sont requis. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs des ROS (DPI et catalase) ainsi que l'usage de H₂O₂ respectivement diminuent et induisent la formation de NETs sous l'action du PMA ou de *S. aureus* (Fuchs *et al.*, 2007). L'importance des ROS a également été confirmée par l'utilisation de neutrophiles altérés dans le fonctionnement de la NADPH oxydase issus de patients atteints de CGD et de souris gp91^{phox-/-} (Ermert *et al.*, 2009). Toutefois, la cascade de signalisation des ROS menant à la formation des NETs n'a pas été élucidée.

Les microfilaments d'actine sont également importants dans la formation du réseau de NETs. L'utilisation d'inhibiteurs de la polymérisation des filaments d'actine

(nocodazole et cytochalasine D), diminue la capacité des neutrophiles à former ces structures en réponse au LPS (Neeli *et al.*, 2009).

Les NETs sont essentiellement constitués d'ADN et d'histones, c'est-à-dire de chromatine. Pour obtenir la structure fibreuse qui leur est caractéristique, la chromatine doit se dérouler et les interactions histones/ADN doivent être rompues. Deux équipes ont démontré l'implication de la déaminase peptidylarginine dans ce phénomène (Wang *et al.*, 2009, Neeli *et al.*, 2008). La désamination des L-arginines (chargées positivement) en L-citrullines (chargées négativement) des histones, entraîne une interaction ADN/histones plus faible, ce qui permet le relâchement de la chromatine et de ce fait la formation des NETs.

Les récepteurs présents à la surface du neutrophile impliqués dans ce phénomène n'ont également pas été identifiés. Néanmoins, le fait que la stimulation par des micro-organismes soit plus rapide et génère plus de filaments qu'une stimulation par les agents solubles suggère fortement l'implication de plusieurs récepteurs à la fois au niveau du neutrophile et du microbe (Brinkmann *et al.*, 2004, Fuchs *et al.*, 2007). En effet, trois à quatre heures sont nécessaires pour induire la formation de NETs par une stimulation au PMA. En revanche, seulement cinq à trente minutes de coincubation avec *S. pneumoniae* ou *C. albicans* suffisent.

Molécule soluble	H ₂ O ₂ IFN- γ + C5a IL-8 LPS PMA	(Fuchs <i>et al.</i> , 2007) (Martinelli <i>et al.</i> , 2004) (Brinkmann <i>et al.</i> , 2004) (Brinkmann <i>et al.</i> , 2004) (Brinkmann <i>et al.</i> , 2004)
Bactérie		
Gram positive	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	(Ramos-Kichik <i>et al.</i> , 2009) (Brinkmann <i>et al.</i> , 2004) (Beiter <i>et al.</i> , 2006 ; Wartha <i>et al.</i> , 2007) (Lauth <i>et al.</i> , 2009)
Gram négative	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i>	(Grinberg <i>et al.</i> , 2008) (Brinkmann <i>et al.</i> , 2004) (Brinkmann <i>et al.</i> , 2004)
Mycobactéries	<i>Mycobacterium canettii</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(Ramos-Kichik <i>et al.</i> , 2009) (Ramos-Kichik <i>et al.</i> , 2009)
Champignon	<i>Candida albicans</i>	(Urban <i>et al.</i> , 2006 ; Urban <i>et al.</i> , 2009)
Parasite	<i>Leishmania amazoniensis</i>	(Guimaraes-Costa <i>et al.</i> , 2009)

Adapté de (von Kockritz-Blickwede *et al.*, 2009)**Table 2 : Facteurs induisant la formation des NETs.**

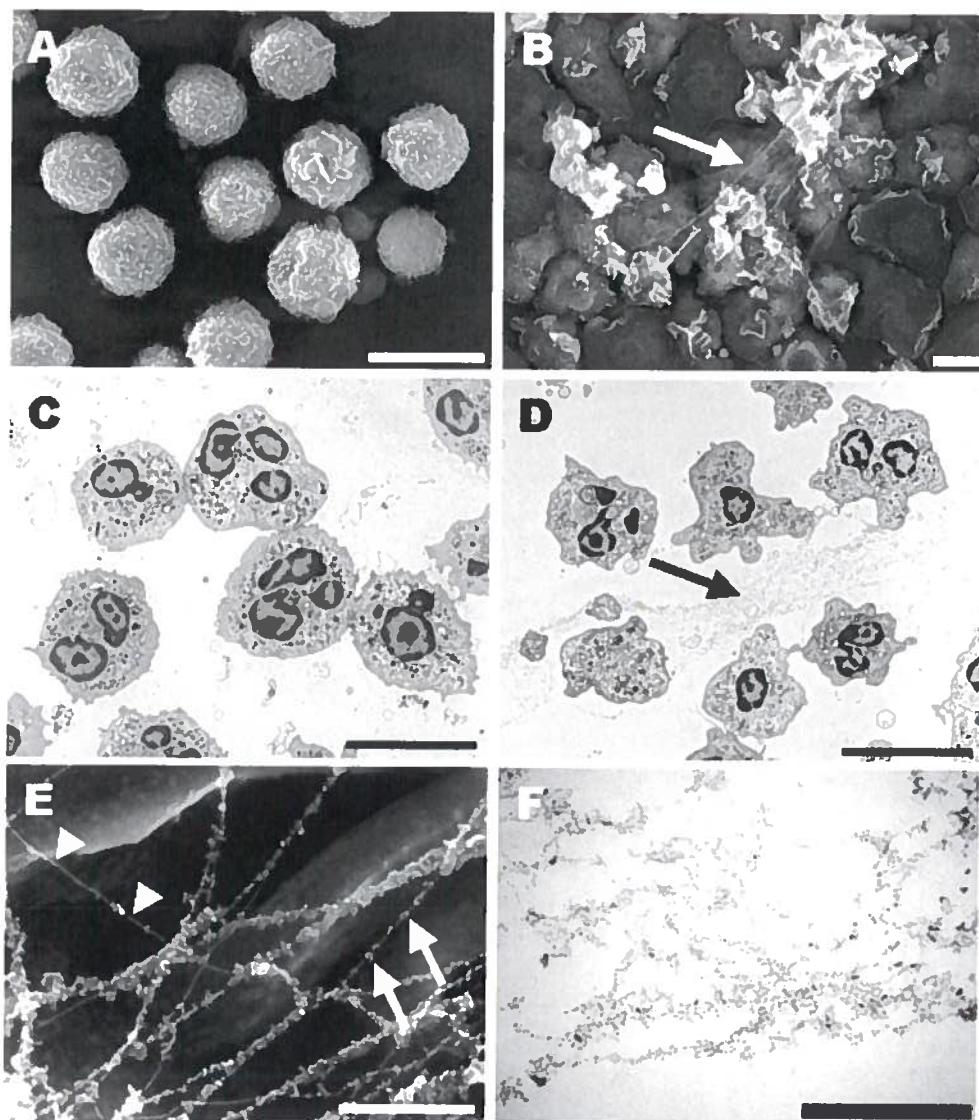
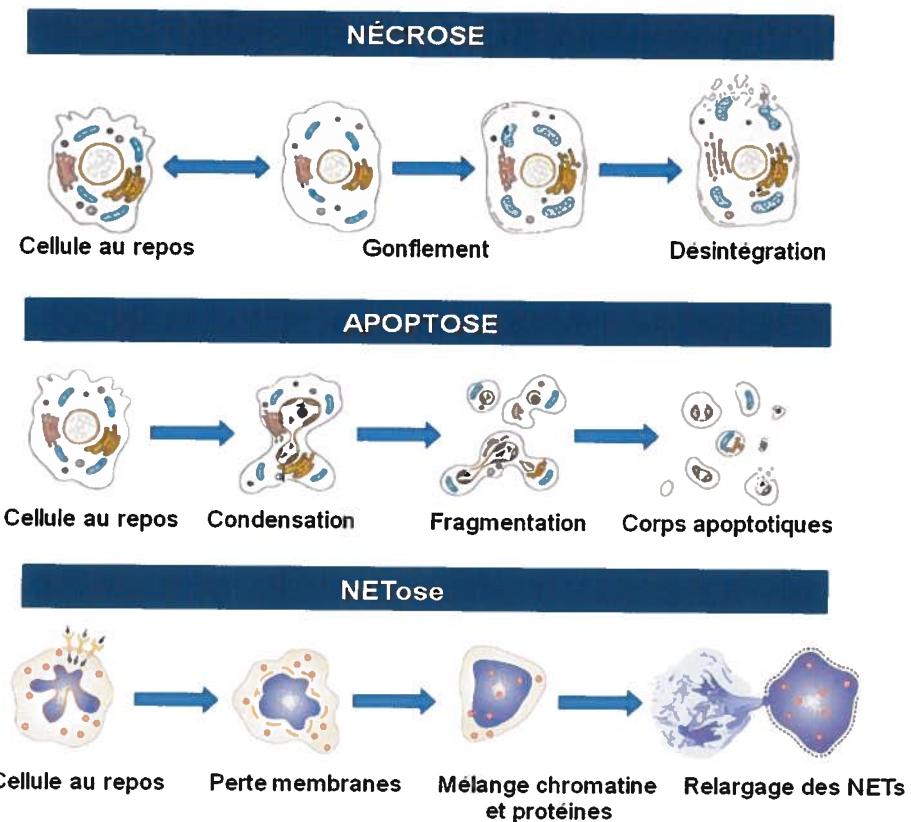
(Brinkmann *et al.*, 2004)

Figure 10 : Observation par microscopie électronique à transmission de neutrophiles naïfs ou stimulés pour l'émission de NETs. (A, C) Les neutrophiles naïfs ont une forme très arrondie et possèdent un noyau polylobé. (B, D) Les neutrophiles respectivement stimulés au PMA ou à l'IL-8 s'aplatissent, perdent leurs lobes nucléaires, forment de nombreuses protubérances ainsi que des structures très fibreuses qui correspondent aux NETs. (E, F) Les NETs sont des fibres de 15 à 17 nm de diamètre (têtes de flèches) sur lesquelles sont présents de nombreux complexes globulaires de 25 nm de diamètre constitués par des protéines du neutrophile (flèches entières).

A)



B)

		Nécrose	Apoptose	NETose
Temps	long (heures) rapide (minutes)	✓ ✗	✓ ✗	✗ ✓
ADN	fragmentation condensation	✗ ✓	✓ ✓	✗ ✗
Fusion des lobules		✓	✗	✓
Mélange matériel nucléaire et cytoplasmique		✗	✗	✓
Activation caspases		✗	✓	✗
Organelles	intacts	✓	✓	✗
Membrane cellulaire	intacte	✗	✓	✗
Déversement du contenu cellulaire		✗	✗	✓

A) Adapté de (<http://lecerveau.mcgill.ca/flash/capsules/outilbleu17.html>) et de (Brinkmann *et al.*, 2007)

Figure 11 : NETose : nouveau type de mort cellulaire distinct de l'apoptose et de la nécrose. A) Schéma explicatif des différentes étapes menant à la formation des NETs comparé aux étapes menant à la nécrose et à l'apoptose. B) Comparaison des modifications physiologiques entre nécrose/apoptose/NETose.

2.2.2.3.3 Implication des NETs dans l'élimination de micro-organismes pathogènes

La formation de NETs par les neutrophiles est fortement associée à une réponse immunitaire de l'hôte. Ils sont abondamment présents au niveau du site d'infection. *C. albicans*, *L. amazonensis* ainsi que plusieurs bactéries sont piégés par ces fibres (Figure 12). Bien qu'il soit possible que les microbes y soient capturés grâce au caractère très visqueux de l'ADN, les auteurs suggèrent plutôt qu'il y a de fortes interactions électrostatiques entre les micro-organismes et les filaments. En effet, l'ADN est fortement négativement chargé, certaines protéines présentes sur les NETs sont positivement ou négativement chargées et les éléments de surface des microbes peuvent également l'être.

En piégeant les microbes, les NETs contribuent à leur élimination de manière extracellulaire. Certaines protéines qui y sont présentes sont des protéases connues pour leur activité microbicide (élastase, histones, cathepsine G, BPI, calprotectine).

Les histones constituent le pool le plus important de protéines constitutives des NETs. Leur capacité à détruire des bactéries a été publiée pour la première fois en 1958 par le Dr. Hirsch (Hirsch, 1958). Durant ses travaux, ce dernier démontre que les histones tuent certaines bactéries (*Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, et *Micrococcus*). Les mécanismes par lesquels ils agissent n'ont pas été déterminés.

Contenue dans les granules azurophiles du neutrophile, l'élastase est la seconde protéine abondamment présente sur les NETs. Il s'agit d'une sérine protéase appartenant à la famille des serprocidines dont l'activité microbicide a été décelée notamment grâce à la génération de souris déficientes en élastase. En effet, ces souris sont devenues très susceptibles à l'infection par *K. pneumoniae* et *E. coli*. Les études ont montré que l'élastase protège l'hôte en dégradant la protéine A de la membrane externe (OmpA) d'*E. coli*, les facteurs de virulence Ipa A-B-C de *S. flexneri*, Sip A-B-C de *S. typhimurium* et Yop B-D-E de *Y. enterocolitica* (Pham, 2006, Belaaouaj *et al.*, 1998, Weinrauch *et al.*, 2002).

La calprotectine est un complexe formé par les protéines S100A8 et S100A9. Egalement connu sous le terme de MRP8/14, ce complexe est présent dans le cytosol du neutrophile.

La calprotectine agit sur *C. albicans* en inhibant sa croissance via la chélation du zinc présent dans le milieu d'incubation (Loomans *et al.*, 1998, Clohessy *et al.*, 1995, Murthy *et al.*, 1993).

L'hypothèse est donc que les NETs éliminaient les micro-organismes pathogènes en les exposant à de fortes concentrations locales de ces protéines. En effet, les histones, l'élastase ainsi que la calprotectine présentes sur les filaments sont fortement impliquées dans l'élimination de *L. amazoniensis*, *S. flexneri*, *S. aureus*, et *C. albicans* (Guimaraes-Costa *et al.*, 2009, Brinkmann *et al.*, 2004). Le fait que les NETs détruisent les microbes de manière localisée et sans phagocytose, constitue une excellente stratégie de défense pour l'organisme hôte car il s'agit d'un mécanisme rapide et direct.

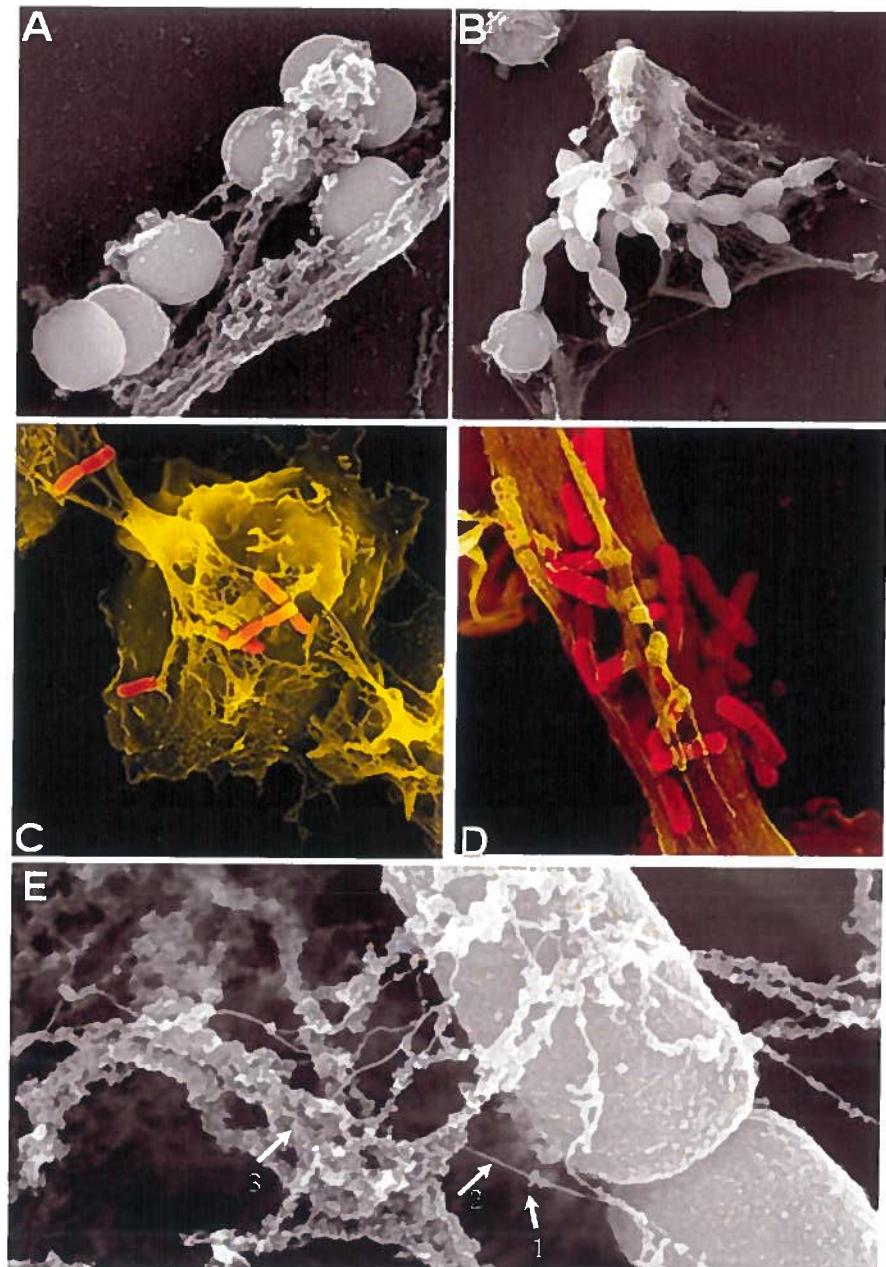
Tous les microbes qui y sont capturés ne seront pas détruits. Certains ont développé des stratégies de défense qui leur permettent de survivre soit en échappant au réseau filamentueux, soit en évitant la destruction. Pour y parvenir, certaines bactéries produisent des DNases qui dégradent les NETs (*Streptococcus* du groupe A) (Sumby *et al.*, 2005, Buchanan *et al.*, 2006, Beiter *et al.*, 2006, Walker *et al.*, 2007) et d'autres s'en protègent grâce à leur capsule de polysaccharide *S. pneumoniae* (Wartha *et al.*, 2007a). Il a également été montré que les bactéries *M. tuberculosis* et *M. canettii* induisent et sont capturés par les NETs s'en être dégradées. En revanche, le mécanisme par lequel ces bactéries y parviennent n'a pas été déterminé (Ramos-Kichik *et al.*, 2009).

Les NETs serviraient également à limiter la dissémination bactérienne. L'équipe du Dr. Nizet a montré que les bactéries *Streptococcus* capables de digérer les NETs se disséminent cent fois plus que celles qui n'en sont pas capable (Buchanan *et al.*, 2006). Cette observation a été confirmée par une autre étude effectuée avec *S. pneumoniae* (Beiter *et al.*, 2006).

La formation des NETs a également été observée *in vivo* dans plusieurs pathologies, ce qui témoigne de sa pertinence dans la réponse immunitaire innée de l'hôte. Ces structures sont présentes chez le lapin atteint de shigellose, le chat

naturellement infecté par le virus leucémogène félin (FeLV), la souris souffrant de pneumonie bactérienne (causée par *S. pneumoniae*) ou de fasciite nécrosante (causée par les streptocoques du groupe A) (Wardini *et al.*, 2009, Wartha *et al.*, 2007a, Beiter *et al.*, 2006, Buchanan *et al.*, 2006, Brinkmann *et al.*, 2004).

Enfin, les NETs ne sont pas toujours associés aux maladies infectieuses puisqu'ils ont été mis en évidence lors de deux études traitant de la pré-éclampsie humaine dans lesquelles les auteurs suggèrent qu'ils réduiraient le transport de globules rouges vers le placenta, ce qui mènerait à l'hypoxie du fœtus (Gupta *et al.*, 2007, Gupta *et al.*, 2006, Gupta *et al.*, 2005). On les retrouve également lors de l'appendicite spontanée humaine, dans des exsudats purulents issus de patients atteints de parodontite chronique et enfin dans le tractus génital de juments inséminées (Vitkov *et al.*, 2009, Brinkmann *et al.*, 2004).



Adapté de (Brinkmann *et al.*, 2007, Medina, 2009)

Figure 12 : Capture de micro-organismes pathogènes par les NETs. Images de microscopie électronique montrant *S. aureus* (A), *C. albicans* (B) capturés dans le réseau de NETs. (C, D) Images de microscopie électronique colorées montrant la bactérie *S. flexneri* (rouge) piégée dans le réseau de filaments. (E) Détail de NETs capturant *S. flexneri*.
1) domaine globulaire, (2) filament, (3) réseau de NETs

2.2.2.4 Mécanismes d'évasion de certains microbes à l'élimination par le neutrophile

Malgré l'important arsenal microbicide du neutrophile, certains micro-organismes parviennent à échapper à leur destruction en développant diverses stratégies (Urban *et al.*, 2006a) (Table 3). En effet, certains microbes (ex. *S. pyogenes*) y parviennent en augmentant la synthèse de protéines qui leur confèrent une résistance contre l'action des ROS. D'autres évitent d'interagir directement avec le neutrophile, soit en se cachant dans d'autres cellules (ex. cellules épithéliales), soit en empêchant le recrutement des neutrophiles au site d'infection. D'autres micro-organismes tel que *S. aureus* interfèrent avec la maturation phagosomale du neutrophile, évitent d'être phagocytés via l'utilisation de leur propre capsule qu'ils emploient comme barrière physique pour empêcher leur opsonisation, ou demeurent dans le cytosol. *S. typhi* lyse le neutrophile via la sécrétion de toxines. Enfin, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *M. tuberculosis* et *M. canetti* élaborent des mécanismes qui leur permettent de résister à l'effet des NETs.

Organisme	Stratégie	Référence
Bactérie Gram-négative		
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	C, D	Permanich et al. (2006)
<i>Bordetella pertussis</i>	C	Steed et al. (1991)
<i>Brucella abortus</i>	C	Elzer et al. (1996)
<i>Burkholderia</i> ssp. (<i>B. pseudomallei</i> , <i>B. cenocepacia</i>)	A, C	Bylund et al. (2006)
<i>Chlamydia</i> ssp. (<i>C. pneumoniae</i> , <i>C. trachomatis</i>)	C	Register et al. (1986)
<i>Ehrlichia</i> ssp. (<i>Anaplasma phagocytophilum</i>)	GR, C	Rikihisa (2006)
<i>Escherichia coli</i>	B	Burns and Hull (1999)
<i>Francisella tularensis</i>	C	Lofgren et al. (1983)
<i>Haemophilus</i> ssp. (<i>H. somnus</i> , <i>H. influenzae</i>)	C	Czuprynski et Hamilton (1985)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	B	Domenico et al. (1994)
<i>Legionella pneumophila</i>	C	Horwitz et Silverstein (1981)
<i>Nesisseria gonorrhoeae</i>	C	Simons et al. (2005)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GR, B, C	Bayer et al. (1991)
<i>Rickettsia tsutsugamushi</i>	C	Rikihisa and Ito (1979)
<i>Salmonella</i> ssp. (<i>S. typhi</i> , <i>S. typhimurium</i>)	D	Chiu and Ou (1999)
<i>Yersinia</i> ssp. (<i>Y. pestis</i> , <i>Y. enterolytica</i>)	B	Viboud and Bliska (2005)
Bactérie Gram-positive		
<i>Bacillus anthracis</i>	A	During et al. (2005)
<i>Clostridium perfringens</i>	A, D	Stevens et al. (1987)
<i>Enterococcus</i> (<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>)	C	Rakita et al. (1999)
<i>Staphylococcus</i> (<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>)	GR, A, B, C, D	Foster (2005)
<i>Streptococcus</i> (<i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i>)	GR, A, B, C, D, E	Voyich et al. (2004)
Mycobactéries		
<i>Mycobacterium</i> ssp. (<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. canetti</i>)	E	Ramos-Kichik et al. (2009)
<i>Mycobacterium</i> ssp. (<i>M. leprae</i> , <i>M. tuberculosis</i>)	C	Holzer et al. (1986)
Champignon		
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	A, C	Schaffner et al. (1986)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	A, B	Diamond et Erickson (1982)
<i>Histoplasma capsulatum</i>	C	Kurita et al. (1991)
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	C	Schaffner et al. (1986)
<i>Sporothrix schenckii</i>	C	Schaffner et al. (1986)
<i>Trichosporon beigelii</i>	B, C	Lyman et al. (1994)

Traduit de (Urban et al., 2006a)

Table 3 : Liste des micro-organismes pathogènes capables d'échapper à l'activité microbicide du neutrophile et mode d'action. GR, surexprime des gènes codant des protéines impliquées dans la résistance contre les ROS ; A, limite le contact avec le neutrophile ; B, évite d'être phagocyté par le neutrophile ; C, survie dans le neutrophile ; D, lyse le neutrophile ; E, échappe à l'activité microbicide des NETs.

3 Réponse du neutrophile face à *Leishmania*

Comment réagit le neutrophile dans le cas d'une infection par les promastigotes de *Leishmania*? Lutte-t'il contre le parasite ou contribue-t'il à la persistance de ce dernier au sein l'organisme hôte? C'est la question que se sont posés John et Hunter via cette phrase très imagée : « le neutrophile agit-il en tant que soldat ou en tant que Cheval de Troie? » (John *et al.*, 2008). Les deux hypothèses ont été validées par diverses études, ce qui en fait un sujet à controverse. Certaines études rapportent que le neutrophile contribue à l'élimination des promastigotes, tandis que d'autres le présentent comme un élément essentiel à l'établissement de l'infection.

Une des méthodes utilisée pour l'étude du rôle du neutrophile dans la leishmaniose est leur déplétion partielle *in vivo* chez la souris. Cette déplétion est obtenue par l'utilisation de l'anticorps RB6-8C5 dont la spécificité est discutée dans les articles de Daley et Ritter (Ritter *et al.*, 2009, Daley *et al.*, 2008). En effet, il semblerait que les cellules ciblées par cet anticorps ne soient pas essentiellement des neutrophiles mais également d'autres populations leucocytaires dont les éosinophiles, ce qui rend l'interprétation des résultats obtenus difficile.

L'hétérogénéité des modèles murins utilisés est une autre explication à cette controverse. En effet, selon l'origine des neutrophiles (issus de souris Balb/c ou C57BL/6), la réponse diffère (Charmoy *et al.*, 2007). Enfin, l'espèce de *Leishmania* utilisée, le mode d'inoculation employé, le fait que l'étude soit réalisée *in vivo* ou *in vitro* influent également sur la réponse obtenue.

3.1 Recrutement des neutrophiles au site d'infection

Que ce soit dans le but de favoriser la maladie ou de l'éviter, le neutrophile est rapidement recruté au site d'inoculation de *Leishmania*. Suite à l'infection par *L. mexicana*, *L. donovani* et *L. chagasi*, 60% des cellules immunitaires infiltrées dans le derme dès les premières heures sont des neutrophiles (Muller *et al.*, 2001, Tacchini-Cottier *et al.*, 2000, Lima *et al.*, 1998, Laurenti *et al.*, 1996, Wilson *et al.*, 1987, Andrade *et al.*, 1984). Ce recrutement massif a pu être observé grâce à l'exploitation de la microscopie par absorption biphotonique qui permet d'obtenir des images *in vivo* en profondeur dans les tissus (Peters *et al.*, 2008).

Concernant les effecteurs de cette accumulation leucocytaire au site d'infection, les travaux montrent que le parasite lui-même en serait responsable en induisant la sécrétion d'interleukine-8 (IL-8) par le neutrophile (van Zandbergen *et al.*, 2002, Laufs *et al.*, 2002), cytokine reconnue pour ses propriétés chemoattractives envers ce dernier.

Le second facteur découvert est le « *Leishmania* Chemotactic Factor » (LCF) (van Zandbergen *et al.*, 2002, Sorensen *et al.*, 1989). Ce facteur n'a pas encore été caractérisé, mais le fait que l'utilisation de surnageants issus de culture de promastigotes de *L. major*, *L. aethiopica* ainsi que de *L. donovani* suffise à concentrer les neutrophiles suggère qu'il s'agit d'un facteur soluble commun aux différentes espèces du parasite. Cependant, il est intéressant de noter que la récente étude menée par l'équipe de Peters (Peters *et al.*, 2008) montre que le recrutement des neutrophiles au site d'inoculation, n'est pas nécessairement dû à la présence de *Leishmania* mais est plutôt une réponse à la morsure du phlébotome. Il est vrai que certains travaux montrent que la salive du phlébotome agit sur le recrutement des cellules. La salive de *Lutzomyia longipalpis* contient un peptide, le maxadilan (Lerner *et al.*, 2007), lequel en plus d'inhiber le recrutement des neutrophiles au site d'infection possède une activité immunomodulatrice (Monteiro *et al.*, 2005). En inhibant le relargage de TNF α et en augmentant la production d'interleukine 6 (IL-6), le maxadilan permet l'exacerbation de l'infection par *Leishmania* (Soares *et al.*, 1998, Morris *et al.*, 2001). Mais encore une fois, le rôle de ce peptide serait directement associé

à l'origine des souris utilisées. En effet, la combinaison de salive de *Lutzomyia* et de *L. chagasi* augmente le recrutement des neutrophiles chez les souris Balb/c mais pas chez les souris C57BL/6 (Teixeira *et al.*, 2005).

3.2 Phagocytose de *Leishmania* par le neutrophile

Une fois recrutés au site d'infection, les neutrophiles phagocytent rapidement le promastigote, généralement en commençant par son flagelle (Pearson *et al.*, 1983). La phagocytose est également augmentée par l'IL-8 produite par le neutrophile lui-même. Les récepteurs CR3 du complément, les protéines de la matrice extracellulaire et la fibronectine sont également des éléments impliqués dans l'attachement ainsi que dans l'internalisation de *Leishmania* (Ritter *et al.*, 2009).

3.3 Les neutrophiles contribuent à l'élimination de *Leishmania*

Vu l'important arsenal microbicide contenu dans les neutrophiles il est légitime de penser que ces cellules contribuent à l'élimination du parasite ou du moins au ralentissement de sa dissémination dans l'organisme hôte. Le fait que la déplétion partielle des neutrophiles avant infection chez les souris Balb/c et C57BL/6 s'accompagne de l'exacerbation des lésions cutanées ainsi que de l'aggravation de la maladie suggère que le neutrophile contribue largement au contrôle de l'infection (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000, Lima *et al.*, 1998, Chen *et al.*, 2005, McFarlane *et al.*, 2008). De plus, le retrait des neutrophiles est également associé à une forte présence de promastigotes libres dans l'espace extracellulaire du derme (Lima *et al.*, 1998).

3.3.1 Régulateur de l'immunité

L'une des voies par lesquelles le neutrophile parvient à contrôler *Leishmania* est par l'orientation de la réponse immunitaire vers une réponse pro-inflammatoire de type Th1.

Suite à l'infection par *L. major*, les neutrophiles issus des souris résistantes C3J/HeJ expriment l'ARN messager de la sous-unité p40 de l'interleukine12 (IL-12p40), de l'interféron-γ (IFN-γ) ainsi que du TNF-α, cytokines effectrices de la réponse Th1. Les souris Balb/c quant à elles susceptibles à *L. major* présentent une réponse anti-inflammatoires de type Th2 (Chen *et al.*, 2005, McFarlane *et al.*, 2008). C'est donc en orientant le type de réponse immune produite par l'hôte que le neutrophile contribue à l'élimination du parasite. Ces observations sont appuyées par le fait que le retrait partiel des neutrophiles chez les souris Balb/c conduit à l'exacerbation des lésions cutanées, à l'augmentation de la charge parasitaire ainsi qu'à un affaiblissement de la réponse de type Th1 (Chen *et al.*, 2005, McFarlane *et al.*, 2008).

3.3.2 Coopération avec les autres cellules immunitaires

La coopération macrophage/neutrophile est une autre stratégie utilisée par le neutrophile pour éliminer *Leishmania* de l'organisme. L'élastase issue du neutrophile ainsi que la myéloperoxidase sont des éléments capables d'activer le macrophage de manière à ce que ce dernier éliminent *L. major* (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2007).

3.3.3 Production des ROS

L'activation de la NADPH oxydase est un des éléments qui contribue à l'élimination des microbes par le neutrophile. Dans le cas d'une infection par *Leishmania*, la formation des ROS s'accompagne de l'élimination du parasite (Lima *et al.*, 1998, Pearson *et al.*, 1981, Chen *et al.*, 2005, Chang, 1981, Beil *et al.*, 1992).

3.4 Contribution des neutrophiles dans l'établissement de l'infection par *Leishmania*

Le second rôle attribué au neutrophile dans la leishmaniose, est celui d'une cellule qui contribue à l'établissement de l'infection et à la survie du parasite dans l'organisme hôte. Cette notion est basée sur les observations selon lesquelles suite à l'infection par *Leishmania*, une plus grande proportion de neutrophiles sont recrutés chez les souris Balb/c (susceptibles à *L. major*) que chez les souris résistantes C57BL/6. Il a également été observé que durant les deux jours suivant l'infection, la quasi-totalité des cellules infiltrées ont phagocytés des promastigotes. De plus, le pourcentage de cellules contenant des parasites vivants chez les Balb/c est deux fois plus élevé que chez les souris C57BL/6 (Beil *et al.*, 1992). Enfin, dans les dix huit heures suivant l'infection, la majorité des cellules contenant le parasite sont des neutrophiles. Il s'avère que ces parasites ont gardé leur capacité infectieuse (Gueirard *et al.*, 2008, Peters *et al.*, 2008). Il a également été montré que le retrait partiel des neutrophiles chez la souris C57BL/6 s'accompagne d'une diminution du nombre de parasites viables, une atténuation de la maladie, ainsi que d'une augmentation de l'expression de molécules pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 α (IL-1 α), l'interleukine-1 β (IL-1 β) (Peters *et al.*, 2008).

L'hypothèse selon laquelle le neutrophile servirait de véhicule au parasite et permettrait l'entrée de ce dernier de manière silencieuse dans le macrophage repose sur le modèle du Cheval de Troie. Selon ce modèle, le neutrophile constitue pour *Leishmania* un abri temporaire dans lequel il se cache de toute attaque et en sort renforcé pour mieux envahir le macrophage. Deux scénarios sont possibles pour expliquer ce modèle (Figure 13) :

-- *Leishmania* est rapidement phagocyté par le neutrophile et utilise ce dernier comme site d'adaptation. Une fois dans la cellule, le promastigote s'adapte à l'environnement hostile du phagolysosome, puis est libéré du neutrophile entré en apoptose. Une fois libre, *Leishmania* est phagocyté par le macrophage et y survit, puisque adapté à son environnement. (Peters

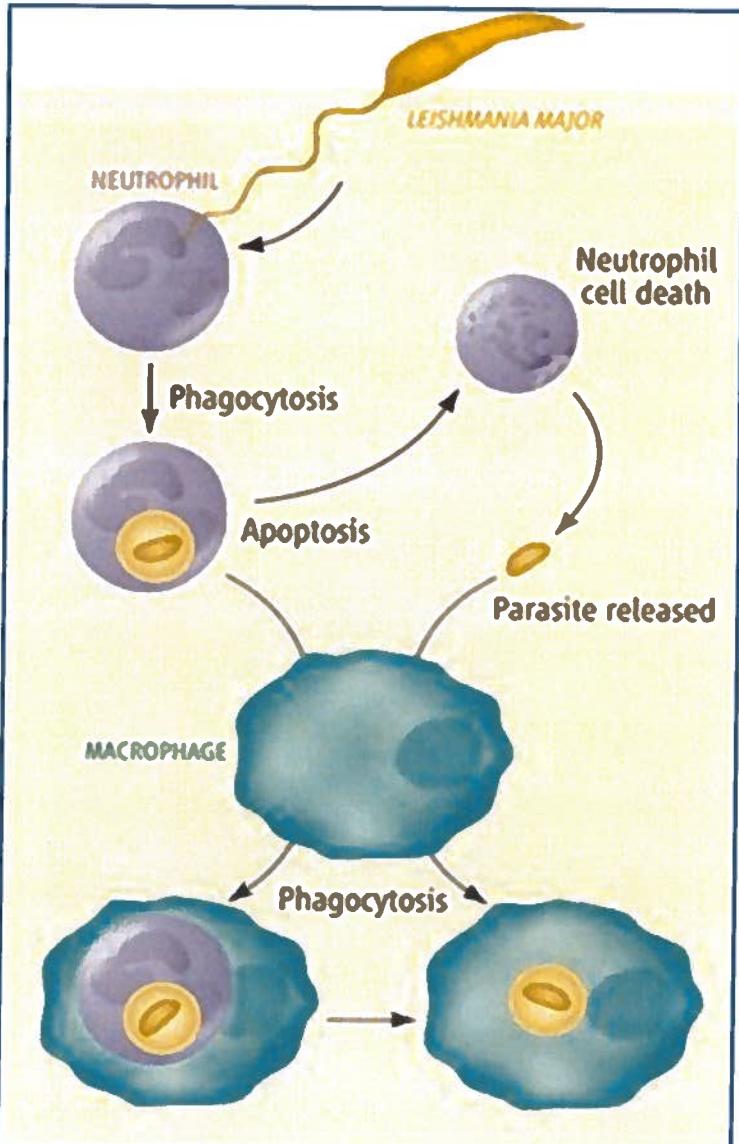
et al., 2009, Peters *et al.*, 2008, John *et al.*, 2008). Cette stratégie porte également le terme de « trojan rabbit ».

-- *Leishmania* se sert du neutrophile comme d'un site refuge temporaire dans lequel il attend à l'abri les macrophages. Comme précédemment, le parasite survit dans le neutrophile et s'y adapte mais cette fois n'est pas relargué. Une fois recruté au site d'infection, le macrophage ingère le neutrophile infecté et apoptotique (Peters *et al.*, 2008). Dans leur article de revue, l'équipe de Laskay suggère que *Leishmania* utilise cette voie d'internalisation par le macrophage dans le but d'y rentrer de manière silencieuse (Laskay *et al.*, 2008). En effet, caché par le neutrophile, le parasite n'interagit pas directement avec les récepteurs de surface du macrophage et de ce fait n'est pas reconnu. De plus, la phagocytose par le macrophage de neutrophiles apoptotiques n'entraîne pas de réponse inflammatoire (Meagher *et al.*, 1992, Fadok *et al.*, 1998a, Fadok *et al.*, 1998b), l'ingestion de neutrophiles apoptotiques s'accompagne d'une inhibition de la production de facteurs pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-8, TNF- α), et d'une augmentation de TGF- β 1 (facteur anti-inflammatoire).

Dans les deux cas, une fois internalisé par le neutrophile, le promastigote ne se différencie pas en amastigote et ne se multiplie pas (van Zandbergen *et al.*, 2004, Aga *et al.*, 2002, Laufs *et al.*, 2002).

Il est intéressant de noter que quelque soit le scénario choisi par *Leishmania*, le neutrophile survit au-delà de sa durée de vie habituelle (Aga *et al.*, 2002, Laufs *et al.*, 2002). Une fois infectée, la cellule survit jusqu'à trois jours, période qui coïncide avec le pic de recrutement des macrophages au site d'infection. D'ailleurs, il semblerait que ce soit *Leishmania* qui initie ce recrutement en induisant le relargage de MIP1- β (CCL4) à partir du neutrophile entré en apoptose, MIP1- β étant une cytokine chimioattractante pour les macrophages (Muller *et al.*, 2001, van Zandbergen *et al.*, 2004). En revanche, les mécanismes par lesquels *Leishmania* régule l'entrée en apoptose des neutrophiles ne sont pas encore élucidés.

Peu d'éléments sont connus sur les mécanismes par lesquels *Leishmania* parvient à se protéger des attaques du neutrophile. Néanmoins, il a été montré que les promastigotes de *L. donovani* évitent leur destruction en se dirigeant préférentiellement vers des phagosomes de petite taille incapables de fusionner avec les lysosomes et de ce fait non-lytiques. Le LPG abondamment présent à la surface du promastigote empêcherait le phagosome de fusionner avec les organelles lysosomales (Gueirard *et al.*, 2008). D'autres équipes ont montré que *L. major* parvient à survivre dans le neutrophile en inhibant le stress oxydatif (Laufs *et al.*, 2002, al Tuwaijri *et al.*, 1990).



(John et al., 2008)

Figure 13 : Modèle du cheval de Troie dans l'infection par *L. major*. Suite à la piqûre du phlébotome, les neutrophiles sont rapidement recrutés au site d'infection. Deux scénarios possibles : (Gauche), *L. major* est phagocyté par le neutrophile et tarde l'entrée en apoptose de ce dernier jusqu'à l'arrivée des macrophages. Le neutrophile infecté est par la suite internalisée par le macrophage. La phagocytose de cellules en apoptose n'entraînant pas de réponse inflammatoire, *Leishmania* occupera sa cellule hôte principale de manière silencieuse. (Droite, également nommée stratégie du « trojan rabbit »), *L. major* utilise le neutrophile comme site d'adaptation transitoire dans lequel il acquiert des propriétés qui lui permettront de survivre dans le macrophage.

PUBLICATION

(Les promastigotes de *Leishmania donovani* esquivent
l'activité antimicrobienne des « neutrophil extracellular traps »)

Résumé de la publication

Christelle Gabriel, W. Robert McMaster, Denis Girard, and Albert Descoteaux.

Leishmania donovani promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. Article accepté. *The Journal of Immunology*, 2010, 185 : 000-000.

Suite à leur recrutement au site d'infection et à leur activation subséquente, les neutrophiles relarguent leur ADN ainsi que le contenu de leurs granules pour former des structures filamenteuses connues sous le terme de « neutrophil extracellular traps » et dont la fonction est de capturer puis éliminer les microorganismes. Nous avons montré dans cette étude que les promastigotes de *Leishmania* induisent à partir des neutrophiles humains, un relargage rapide de « neutrophil extracellular traps » et qu'ils sont capturés par ces structures. L'utilisation de mutants de *Leishmania* défectueux dans la biosynthèse du lipophosphoglycan ou dans celle de la protéine GP63 révèle que ces deux déterminants majeurs de la virulence ne sont pas responsables de l'induction du relargage des « neutrophil extracellular traps ». Nous avons également démontré que cette induction est indépendante aux espèces réactives de l'oxygène produites par les neutrophiles. Enfin, contrairement aux promastigotes sauvages de *L. donovani*, les promastigotes défectueux dans la biosynthèse du lipophosphoglycan sont fortement sensibles à l'activité antimicrobienne des « neutrophil extracellular traps ». L'ensemble de ces résultats suggère que les « neutrophil extracellular traps » pourraient contribuer au confinement des promastigotes de *L. donovani* au site d'inoculation, dans le but de faciliter leur capture par les phagocytes mononucléés.

***Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of
neutrophil extracellular traps¹**

Christelle Gabriel*,†, W. Robert McMaster§, Denis Girard*, and Albert Descoteaux*†²

*INRS- Institut Armand-Frappier and †Center for host-parasite interactions, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7.

§Department of Medical Genetics, University of British Columbia and Immunity and Infection Research Centre, Vancouver Coastal Health Research Institute, Vancouver, BC, Canada V6H 3Z6.

Correspondence to: E-mail: albert.descoteaux@iaf.inrs.ca

Tel. (+1) 450-687-5010 ext. 4465

Fax (+1) 450-686-5501

Abstract

Upon their recruitment to a site of infection and their subsequent activation, neutrophils release DNA and a subset of their granule content to form filamentous structures, known as neutrophil extracellular traps, which capture and kill microorganisms. In this study, we show that *Leishmania* promastigotes induced the rapid release of neutrophil extracellular traps from human neutrophils and were trapped by these structures. The use of *Leishmania* mutants defective in the biosynthesis of either lipophosphoglycan or the surface protease GP63 revealed that these two major surface promastigote virulence determinants were not responsible for inducing the release of neutrophil extracellular traps. We also demonstrate that this induction was independent of superoxide production by neutrophils. Finally, in contrast to wild type *L. donovani* promastigotes, mutants defective in lipophosphoglycan biosynthesis were highly susceptible to the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. Altogether, our data suggest that neutrophil extracellular traps may contribute to the containment of *L. donovani* promastigotes at the site of inoculation, thereby facilitating their uptake by mononuclear phagocytes.

Introduction

Protozoan parasites of the genus *Leishmania* infect millions of people worldwide causing leishmaniasis, a spectrum of clinical manifestations that range from self-healing ulcers to potentially fatal visceral leishmaniasis. Transmission of the parasite is mediated by the blood-sucking sand fly, of either the genus *Phlebotomus* or the genus *Lutzomyia*. Upon feeding, infected sand flies inoculate infective promastigote forms into the mammalian host, where they evade and resist non-specific defense mechanisms such as complement-mediated lysis, to ultimately enter mononuclear phagocytes by a receptor-mediated process. Following their uptake by macrophages, promastigotes of *L. donovani* and *L. major* inhibit phagolysosome biogenesis to evade the microbicidal phagolysosomal environment (1-5). This inhibition is mediated by lipophosphoglycan (LPG³), an abundant surface virulence glycolipid consisting in a polymer of Galβ1,4Manα1-PO₄ units anchored into the promastigote membrane via an unusual glycosyl phosphatidylinositol (1, 6).

Because neutrophils are rapidly recruited to infection sites, there has been growing evidence for the potential role of these immune cells during the early stages of *Leishmania* promastigotes infection. However, data obtained in various experimental models led to conflictual conclusions regarding the role of neutrophils in experimental leishmaniasis (7). Hence, although several studies indicated that neutrophils contribute to a protective response against *Leishmania* (8, 9), others provided evidence that internalization of *Leishmania* promastigotes by neutrophils may favor the establishment

of infection (10-12). The later observations lent weight to the concept that apoptotic neutrophils harboring *Leishmania* promastigotes may act as “Trojan horses” since they are internalized by macrophages (7, 13).

Phagocytosis is the best characterized killing mechanism in neutrophils, whereby microorganisms are efficiently internalized in phagosomes where large amounts of toxic reactive oxygen species are generated (14, 15). Furthermore, fusion with various intracellular granules results in the rapid delivery of proteases, antimicrobial peptides, and myeloperoxidase, culminating in the formation of a highly microbicidal phagolysosome (16, 17). The mechanisms by which *Leishmania* promastigotes evade killing by neutrophils may be related to their ability to block the oxidative burst (18) and to enter a non-lytic compartment unable to fuse with lysosomes and displaying endoplasmic reticulum features (10).

Recently, evidence was provided that neutrophils use an additional microbicidal mechanism that consists in the release of structures composed of chromatin and specific granule proteins in response to various stimuli, including IL-8, LPS, bacteria, and fungi (19, 20). These structures, called neutrophil extracellular traps (NET), form extracellular fibers able to ensnare and kill extracellularly various microorganisms (19, 21-25), possibly through the action of one or several microbicidal proteins associated to these structures in high concentration (19, 23). Additionally, NET may also prevent the spread of pathogens by confining microorganisms to the site of infection (26). In this study, we show that whereas *L. donovani* promastigotes are trapped by NET released by human neutrophils, they resist their microbicidal activity.

Materials and Methods

Human neutrophils

Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll–Hypaque (Pharmacia Biotech, Inc., QC, Canada). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to institutionally approved procedures. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion, and the purity (>98%) was verified by cytology from cytocentrifuged preparations stained by Diff-Quick staining (Fisher Scientific, Ottawa, Canada) (27).

Parasites

Promastigotes of the *L. donovani* strains 1S and LV9, and the *L. major* strains LV39 and NIH S clone A2 were cultured at 26°C in M199 supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100µM adenine, Hepes , 5µM hemin, 3µM bipterin, 1µM biotin and antibiotics. The *L. donovani* 1S isogenic mutants *lpg1*-KO and *lpg2*-KO were described previously (28). The *lpg1*-KO mutant secretes repeating Galβ1,4Manα1-PO₄-containing molecules, but lacks the ability to assemble a functional LPG glycan core (29), precluding synthesis of LPG. The rescued *lpg1*-KO add-back was generated by transfection of the pLeishZeo-*LPG1* expression vector. The *lpg2*-KO mutant expresses the truncated LPG Gal(α1,6)Gal(α1,3)Gal(β1,3)[Glc(α1-P)]Man(α1,3)Man(α1,4)GN(α1,6)-PI, and does not synthesize repeating Galβ1,4Manα1-PO₄ units (30). The *L. major* NIH S clone A2 isogenic *gp63*-KO mutant and *gp63*-KO add-back were previously described (31). *L. donovani* 1S and *L. major* NIH S clone A2 promastigotes expressing luciferase (32) and

L. donovani 1S promastigotes expressing GFP (3) were grown in the presence of 50 µg/ml G418 (Life Technologies). The *L. donovani* *lpg1*-KO add-back was grown in the presence of 100 µg/ml Zeocin (Invitrogen). Promastigotes were used in the late stationary phase of growth. Unless otherwise stated, promastigotes were opsonized by a 30 min incubation at 37°C in the presence of 10% human C8-deficient serum (Sigma).

Confocal immunofluorescence microscopy for the detection and quantification of NET
Human neutrophils (10^6 /well) were seeded on poly-L-lysine-coated glass coverslips (BD Biosciences) in RPMI 1640 supplemented with 10 mM Hepes, penicillin/streptomycin and 2% heat-inactivated human serum, and were allowed to adhere for 30 min at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. Adherent neutrophils were incubated in the absence or presence of either *Leishmania* promastigotes, zymosan, or LPG-coated zymosan during 10 min, 30 min, or 60 min at 37°C. They were then fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma), blocked overnight in blocking solution [PBS with 10% normal goat serum (Jackson Immunoresearch Lab), 5% cold fish gelatin (Sigma), 1% bovine serum albumin (Sigma), 0.05% Tween 20 (Sigma)], and incubated with primary antibodies either directed against human neutrophil-elastase (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) or against repeated subunits of LPG (CA7AE antibody). Secondary antibodies coupled to Alexa 568 or 488 (Invitrogen / Molecular Probes) were used to detect primary antibodies and DRAQ5 (Biostatus Limited, Shepshed, Leicestershire, UK) was used for DNA labeling. Coverslips were mounted on slides with Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates). Specimens were analyzed with an oil immersion Nikon Plan Apo 100 (N.A. 1.4) objective mounted on a Nikon Eclipse E800 microscope equipped with a Bio-Rad Radiance 2000 confocal imaging system (Bio-Rad). Percentages of cells

producing NET were determined by counting at least 100 cells per condition. Neutrophils which release DNA and elastase to form filamentous structures were considered as producing NET.

Quantification of DNA released from neutrophils

Human neutrophils adhered to poly-L-lysine-coated glass coverslips were incubated with either *Leishmania* promastigotes or zymosan at a MOI of 10:1 for 30 min in RPMI 1640 supplemented with 10mM Hepes, penicillin/streptomycin and 2% heat-inactivated human serum, at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. For neutrophils in suspension, cells were distributed in a 48-well plates in the same culture medium (detailed above) and were incubated with either zymosan or *L. donovani* LV9 promastigotes at a MOI of 10:1 for 120 min at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. Neutrophils in suspension were gently resuspended every 10 min. After incubation, 1 U/ml of Micrococcal Nuclease (MNase; Worthington Biochemical Corporation; Lakewood, New Jersey, USA) in presence of 1mM Ca²⁺ was added for 1 h at 37°C. The nuclease activity was stopped with 5 mM EDTA and samples were collected. Released DNA was quantified using the Quant-it Picogreen dsDNA assay kit (Invitrogen / Molecular Probes). Samples were distributed into 96-well plates and were read in a spectrofluorometer reader (SpectraMax M5, Molecular Devices) with a filter setting of 480nm (excitation)/520nm (emission).

Phagocytosis assay in suspension

Human neutrophils (4×10^6 /well) were incubated with serum-opsonized zymosan or with serum-opsonized *L. donovani* LV9 promastigotes at a MOI of 3:1, in a 48-wells plate in RPMI 1640 supplemented with 10 mM Hepes, penicillin/streptomycin and 2% heat-inactivated human serum, at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. Cells were gently resuspended every 10 min. After 30 min of incubation, cells were washed with PBS and cytopspined. Cytocentrifuged slides were stained with Diff-Quick (Fisher) and phagocytosed particles were counted by light microscopy. Each condition was analyzed in triplicate, and at least 100 cells were scored per sample. Results were expressed as the number of ingested particles per 100 neutrophils.

Effect of NET on Leishmania promastigotes survival

Human neutrophils were adhered to poly-L-lysine-coated coverslips (BD Biosciences) in RPMI penicillin/streptomycin medium complemented with 10mM Hepes and 2% heat-inactivated human serum. Cells pretreated or not with DNase-1 (100 units/ml; Worthington Biochemical Corporation) were incubated with luciferase-expressing *L. donovani* 1S or *L. major* NIH S clone A2 promastigotes during 6 h in an incubator at 37°C with 5% CO₂. Controls consisted of promastigotes without neutrophils incubated in the absence or presence of DNase-1. Luciferase activity was measured using a luciferase assay system (Promega, Madison, WI). Briefly, after 6 h of incubation, cells were lysed with 1X Cell Culture Lysis Reagent containing 2X proteases inhibitor. Luciferase activity was quantified using a Lumat LB 9507 luminometer (EG&G Berthold, Nashua, NH). *Leishmania* promastigotes survival in the presence of human neutrophils was

determined as the percentage of control values (luciferase-expressing *Leishmania* promastigotes incubated without neutrophils in presence or not of DNase-1).

Influence of ROS on the induction of NET by Leishmania promastigotes

Human neutrophils adhered to poly-L-lysine-coated were incubated with the NADPH oxidase inhibitor DPI (5 or 10 μ M) or catalase (1000 or 2000 units) during 30 min. *Leishmania* promastigotes were then added and after 30 min DNA release was quantified.

Incubation of neutrophils with Leishmania promastigotes supernatant

Human neutrophils adhered to poly-L-lysine-coated coverslips were incubated in the absence or presence of supernatants from *L. donovani* promastigotes in stationary phase of growth and after 30 min DNA release was quantified.

Statistical analyses

Each experiment was performed at least with three different blood donors. Comparisons of the means within and between groups were tested with Student's t tests to determine statistical significance. A P-value of ≤ 0.05 or less was considered significant.

Results

Leishmania promastigotes induce the formation of NET

To study one aspect of the interaction between *Leishmania* promastigotes and human neutrophils, we assessed the potential of these parasites to induce the formation of NET. Human neutrophils were incubated for various time points with serum-opsonized *L. donovani*-GFP promastigotes (strain 1S) and the presence of NET was determined by confocal immunofluorescence microscopy. As early as 10 min following the addition of *L. donovani*-GFP promastigotes, neutrophils lost their typical rounded morphology and released NET which appear as filamentous structures identified by the presence of DNA and elastase (Fig. 1A). NET release appears to be contact-dependent, as we observed these structures only where neutrophils were associated to *L. donovani*-GFP promastigotes (Fig. 1A). In contrast, the levels of NET induced by serum-opsonized zymosan (Fig. 1B) was similar to the spontaneous baseline of NET release observed with resting neutrophils. We observed no differences between serum-opsonized and unopsonized promastigotes for their ability to induce the formation of NET, as assessed by quantification of DNA released by neutrophils (Fig. 1C). NET formation was time-dependent, with over 80% of neutrophils having released DNA and elastase after 1 h of contact with *L. donovani*-GFP promastigotes (Fig. 2A). We also assessed the ability of other *Leishmania* strains and species to induce the formation of NET by quantifying the amount of DNA released by neutrophils 30 min after the initial contact with the parasites. As shown in Figures 2B and 2C, promastigotes from two strains of *L. donovani* (Sudanese 1S and Ethiopian LV9) and the *L. major* strain LV39 induced comparable levels of DNA release. Confocal immunofluorescence microscopy confirmed that these

Leishmania strains and species induced the formation of NET (data not shown). Using various ratios of *L. donovani* LV9 promastigotes per neutrophil, we observed that the release of neutrophil DNA was dose-dependent, with a four-fold increase above baseline levels for a MOI of 5:1 and a ten-fold increase above baseline levels at a MOI of 20:1 (Fig 2D). Similar results were obtained with promastigotes of *L. donovani* 1S and *L. major* LV39 (data not shown).

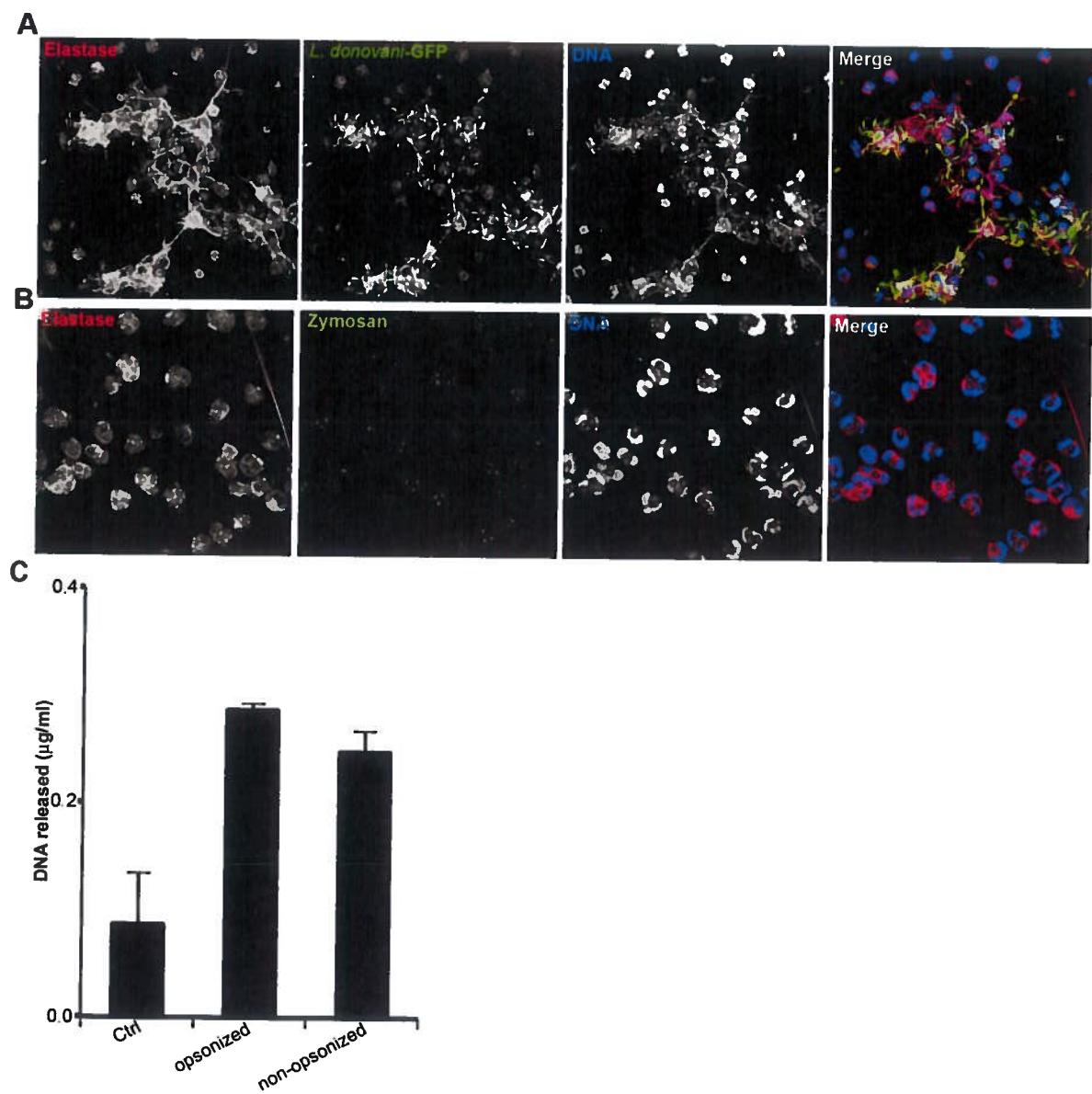


Figure 1. Induction of NET by *L. donovani* promastigotes. Freshly isolated human neutrophils were adhered on poly-L-lysine coverslips and incubated for 10 or 30 min with either serum-opsonized *L. donovani*-GFP promastigotes (A) or serum-opsonized zymosan (B). Samples were fixed and stained for neutrophil-elastase (red) and DNA (blue). C. Human neutrophils adhered on poly-L-lysine coverslips were incubated with either serum-opsonized or unopsonized *L. donovani* promastigotes at a MOI parasite-to-cell

ratio of 10:1. DNA release was quantified after 30 min incubation. One representative experiment out of three performed in triplicates is presented as mean \pm SD. * $p\leq 0.01$ compared with control neutrophils.

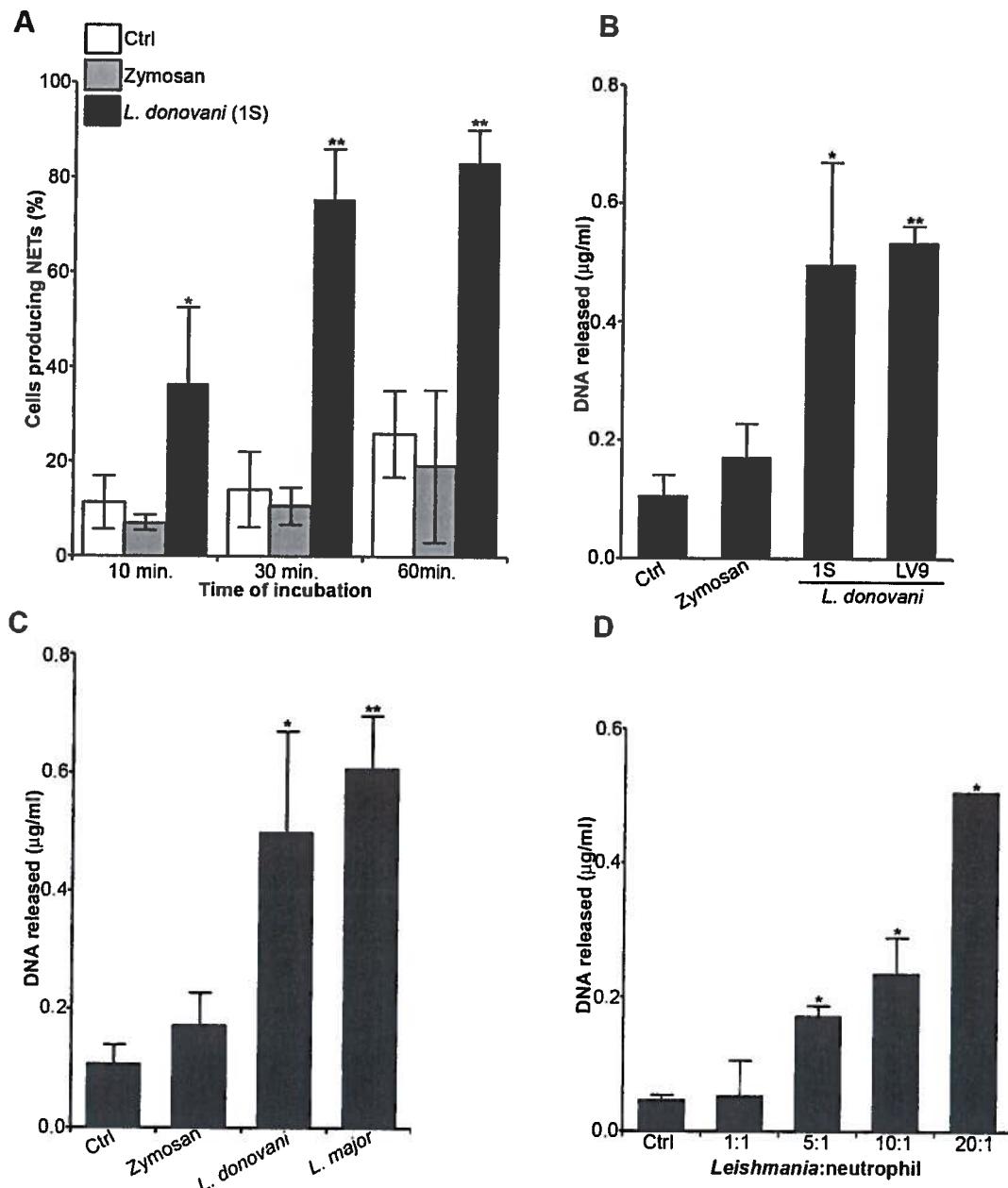


Figure 2. Different strains and species of *Leishmania* induce NET release in a time- and dose-dependent manner. Human neutrophils adhered on poly-L-lysine coverslips were incubated with either zymosan, *L. donovani* (strains 1S and LV9), or *L. major* (strain LV39) promastigotes at a MOI of 10:1 for A, B, and C, or various ratios for D, for the indicated time points. A. The percentage of neutrophils producing NET was quantified for each time point. B, C, and D. Release of DNA was quantified after 30 min. One representative experiment out of three to five performed in triplicates is presented as mean \pm SD in each figure. * $p<0.05$, ** $p\leq0.005$ compared with control neutrophils and neutrophils incubated with zymosan.

Leishmania promastigotes are trapped by NET

As we observed rapid and massive formation of NET in response to *Leishmania* promastigotes, we sought to determine the extent of parasite internalization by human neutrophils. Neutrophils adhered to poly-L-lysine-coated coverslips were incubated with either serum-opsonized promastigotes or serum-opsonized zymosan and internalization was assessed by confocal immunofluorescence microscopy at 10 and 30 min after addition of the particles. As expected, 8.5% and 50.5% of neutrophils had phagocytosed zymosan at 10 and 30 min, respectively (Figure 3A and 3B). In contrast, very low levels of *L. donovani* (both 1S and LV9 strains) or *L. major* promastigotes were found to be internalized by human neutrophils (1%). Phagocytosis of *Leishmania* promastigotes by human neutrophils thus appears to be a rare event in our experimental system. Instead, as shown in Figure 3C for *L. donovani*, promastigotes were found entrapped in NET fibers containing DNA and elastase. As promastigote-induced NET formation occurred rapidly, it is possible that promastigotes get trapped before neutrophils can internalize them. Since previous studies revealed that *Leishmania* promastigotes are internalized by neutrophils in suspension (10, 18, 33, 34), it was important to assess the extent of *Leishmania* promastigotes internalization and NET formation by human neutrophils in suspension. As shown in Figure 4 (A and B), we observed significant internalization of *L. donovani* promastigotes by human neutrophils in suspension, although to a lesser extent than zymosan. Importantly, we also found that *L. donovani* promastigotes induced DNA release from human neutrophils in suspension, indicating that NET are produced under those conditions.

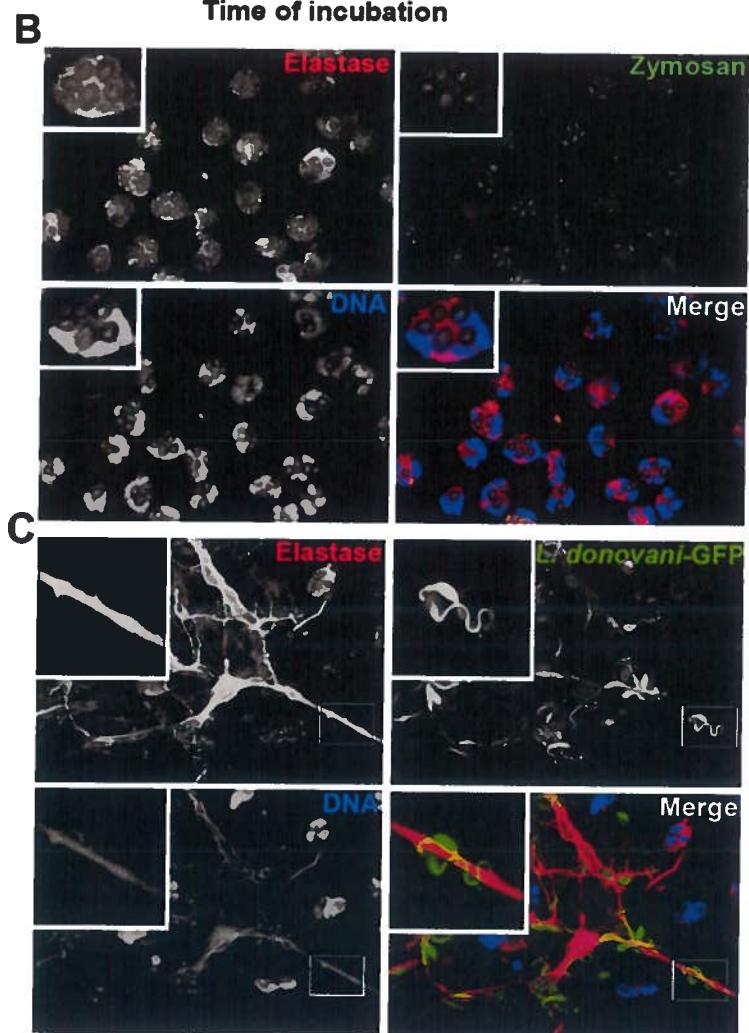
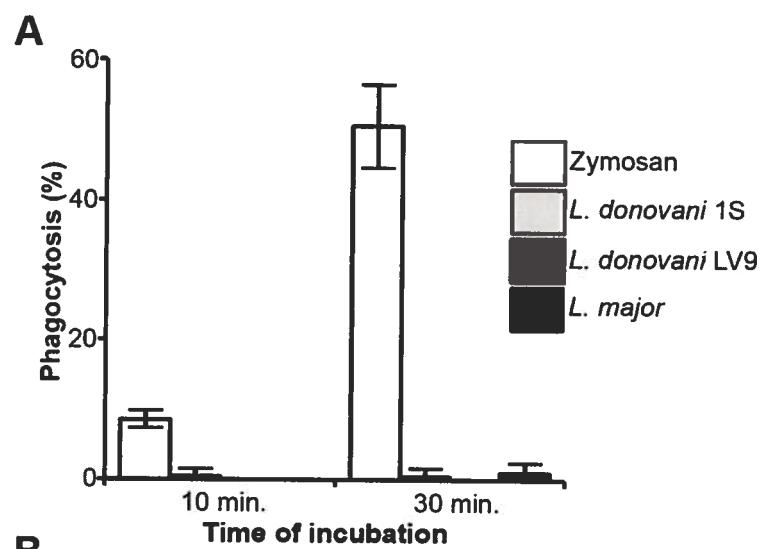


Figure 3. *Leishmania* promastigotes are trapped by NET. Human neutrophils adhered on poly-L-lysine coverslips were incubated with *L. donovani* (1S and LV9 strains), *L. major*, or zymosan for 10 and 30 min at a particle-to-cell ratio of 10:1. A. Internalization of *Leishmania* promastigotes or zymosan was determined on at least 100 neutrophils for each condition. The data are the average of two independent experiments performed in triplicates presented as mean \pm SD.B and C. Samples were fixed after 30 min and were stained for the neutrophil-elastase (red) and DNA (blue). *L. donovani*-GFP promastigotes are in green.

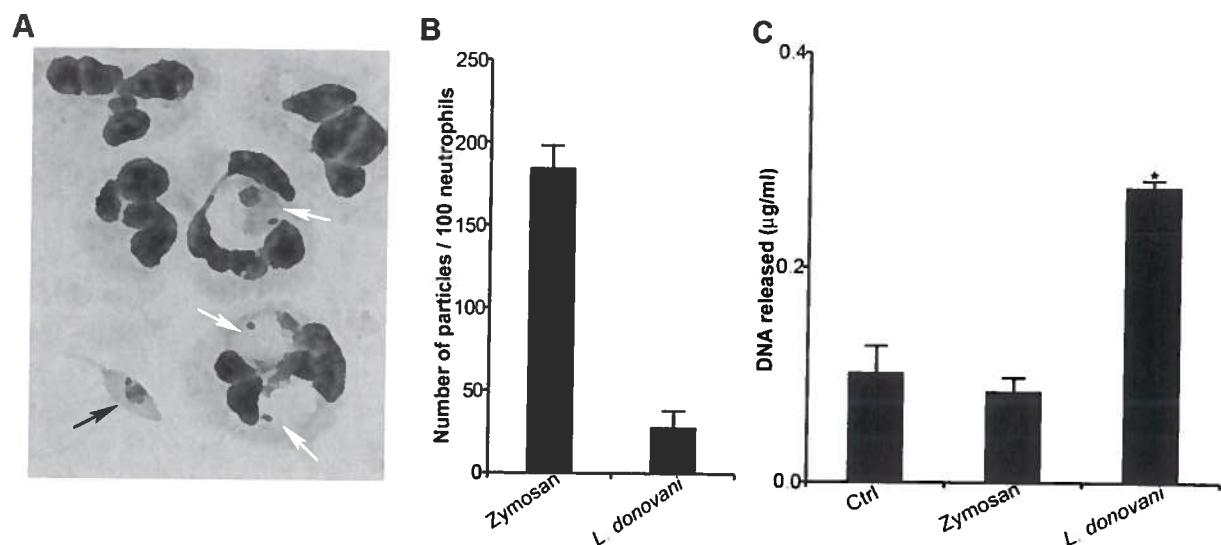


Figure 4. *Leishmania* promastigotes are internalized by human neutrophils in suspension and induce NET release. Human neutrophils in suspension were incubated with either serum opsonized-zymosan or serum opsonized-*L. donovani* (LV9) promastigotes at a MOI of 3:1 during 30 min. (A, B) or at MOI of 10:1 during 120 min. (C). A. Diff-Quick-stained cytocentrifuge preparation showing internalized (white

arrows) or non-internalized (black arrow) *L. donovani* promastigotes. B. Internalization of *Leishmania* promastigotes or zymosan was determined on at least 100 neutrophils. C. Release of DNA was quantified after 120 min. One representative experiment out of three to four performed in triplicates is presented as mean \pm SD in each figure.

* $p \leq 0.0002$ compared with control neutrophils and neutrophils incubated with zymosan.

NET release occurs in the absence of the parasite virulence factors LPG and GP63

Given the prominent role of the surface glycolipid LPG in the establishment of *Leishmania* promastigotes inside mammalian hosts (2, 35, 36), we explored the possible role of LPG in the induction of NET. To this end, we incubated human neutrophils with either wild-type *L. donovani* promastigotes, the LPG-defective *lpg1*-KO mutant, the Gal β 1,4Man α 1-PO₄-defective *lpg2*-KO mutant or the *lpg2*-KO add-back (*lpg2*-KO+LPG2). At various time points, NET formation was assessed by confocal immunofluorescence microscopy and by quantifying DNA release. Similar to wild type promastigotes, both the *lpg1*-KO and the *lpg2*-KO mutants rapidly induced the formation of NET and the release of DNA (Fig. 5), indicating that neither LPG nor other Gal β 1,4Man α 1-PO₄-containing *Leishmania* glycoconjugates were responsible for the induction of NET release by *Leishmania* promastigotes. Of note, we observed morphological differences between NET induced by wild-type and LPG-defective mutants, at early time points (Figure 5C). Hence, at 10 min, NET induced by *lpg2*-KO promastigotes appeared to form clusters and looked more compact than those induced by wild type promastigotes, that were more filamentous (Fig. 5C). However, at 1 h following the addition of promastigotes, NET induced by both wild type and *lpg2*-KO parasites were structurally similar. To confirm that LPG plays no role in the induction of NET formation, we incubated human neutrophils with either zymosan or zymosan coated with purified LPG and quantified DNA release. As shown in Figure 6D, neither zymosan nor LPG-coated zymosan induced DNA release from neutrophils. Furthermore, in contrast to promastigotes, LPG-coated zymosan and zymosan were equally internalized by human neutrophils (Figures 6A, B, and C). The surface GPI-anchored

metalloproteinase GP63 is another abundant promastigote surface molecule that contributes to the establishment of infection within mammals (31). To assess its possible role in the induction of NET release, we incubated human neutrophils with either wild type *L. major* promastigotes, the *gp63*-KO mutant, and the rescued *gp63*-KO add-back. After 30 min incubation, we assessed NET formation by confocal immunofluorescence and we quantified the amount of DNA released by neutrophils. As shown in Figure 7A, wild type, *gp63*-KO and *gp63*-KO add-back *L. major* promastigotes induced similar levels of NET and DNA release from neutrophils, indicating that GP63 is not responsible for the induction of NET formation by *Leishmania* promastigotes. We also tested whether soluble factors released by promastigotes could induce the release of NET. As shown in Figure 7B, addition of promastigote-conditioned medium, that contains *Leishmania* exosomes (37), to neutrophils did not trigger the release of DNA.

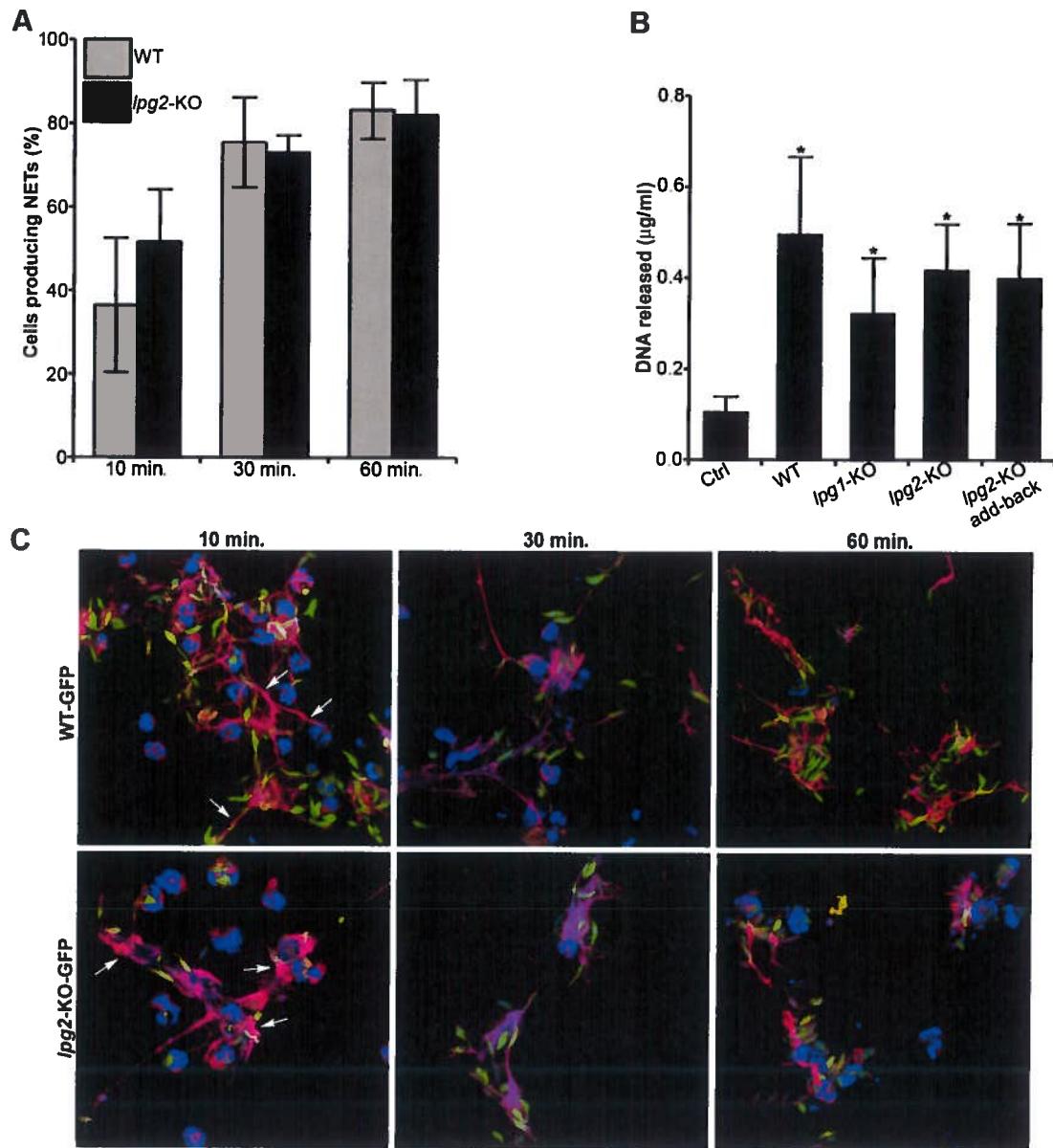


Figure 5. Induction of NET release is independent of LPG and other Gal β 1,4Man α 1-PO₄-containing *L. donovani* glycoconjugates. Human neutrophils adhered on poly-L-lysine coverslips were incubated for 10 min, 30 min, and 60 min. with either wild-type (WT), *lpg1*-KO, *lpg2*-KO, or *lpg2*-KO add-back *L. donovani* promastigotes. A. The percentage of neutrophils producing NET was determined by confocal microscopy. The data are the average of three independent experiments

performed in triplicates presented as mean \pm SD. B. Release of DNA was quantified after 30 min. One representative experiment out of three performed in triplicates is presented as mean \pm SD. * $p<0.05$ compared with resting neutrophils. C. At the indicated time points, samples were fixed, stained for the neutrophil-elastase (red) and DNA (blue). *L. donovani*-GFP promastigotes are in green.

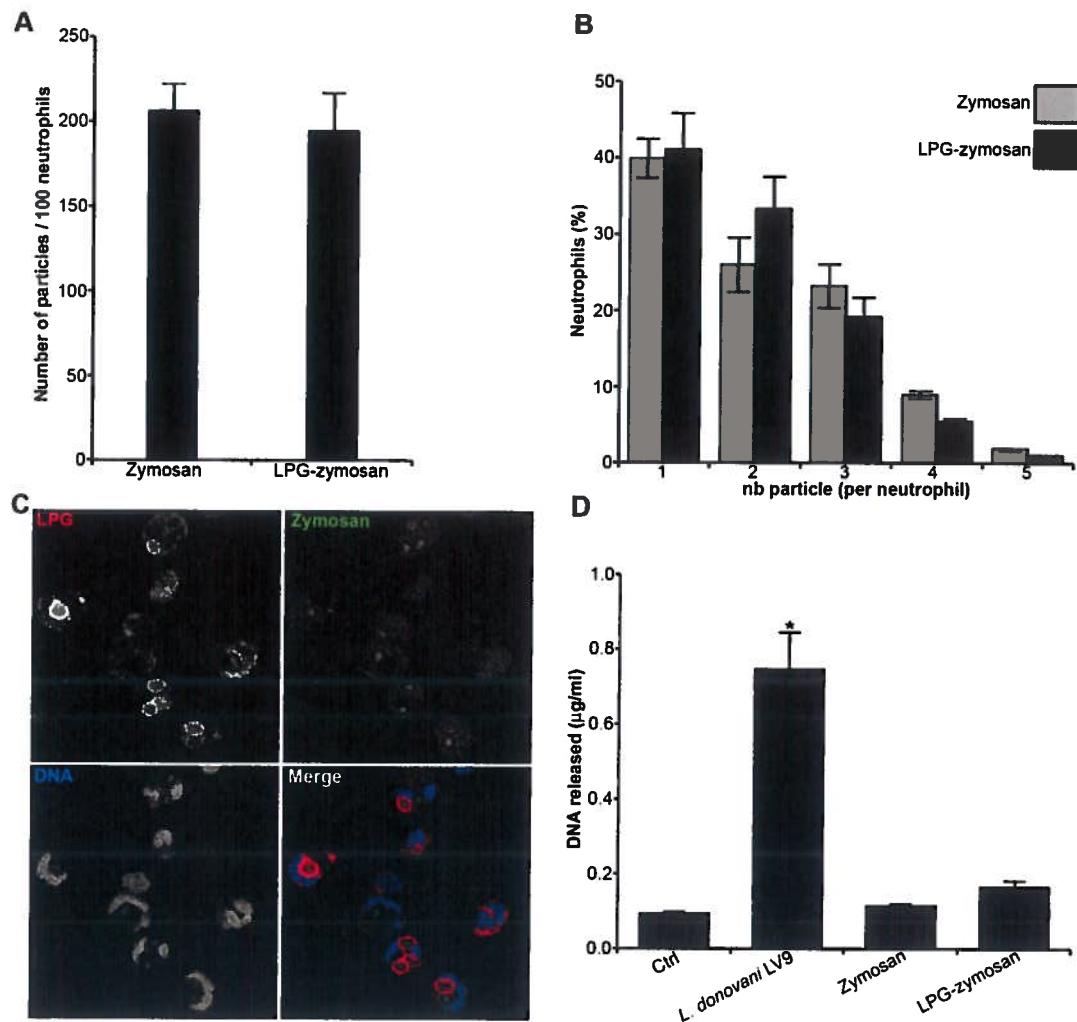
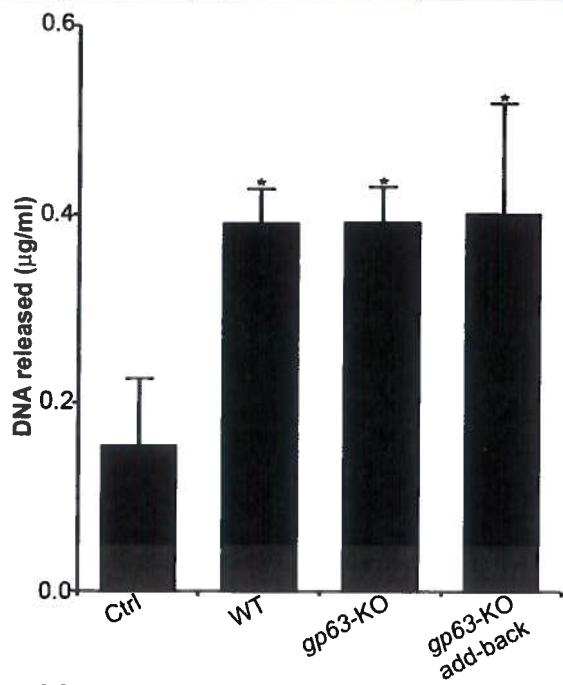
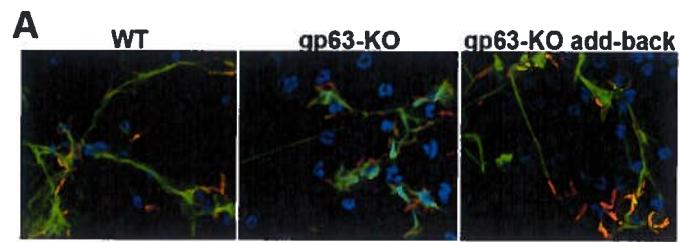


Figure 6. LPG does not interfere with phagocytosis in human neutrophils. Human neutrophils adhered on poly-L-lysine coverslips were incubated for 30 min with either zymosan or zymosan coated with purified *L. donovani* LPG at a particle-to-cell ratio of

10:1. A. Phagocytosis of zymosan and LPG-coated zymosan was assessed by confocal microscopy by calculating the number of particles per 100 neutrophils. One representative experiment out of three performed in triplicates is presented as mean \pm SD. B. The particle distribution per neutrophil was determined on at least 100 cells and expressed as a percentage of neutrophils containing 1, 2, 3, 4, or 5 particles. One representative experiment out of three performed in triplicates is presented as mean \pm SD. C. Samples were fixed and stained for LPG (red) and DNA (blue). Zymosan is in green (natural autofluorescence). D. Release of DNA was quantified after 30 min. One representative experiment out of three performed in triplicates is presented as mean \pm SD.

* $p<0.001$ compared with resting neutrophils.



B

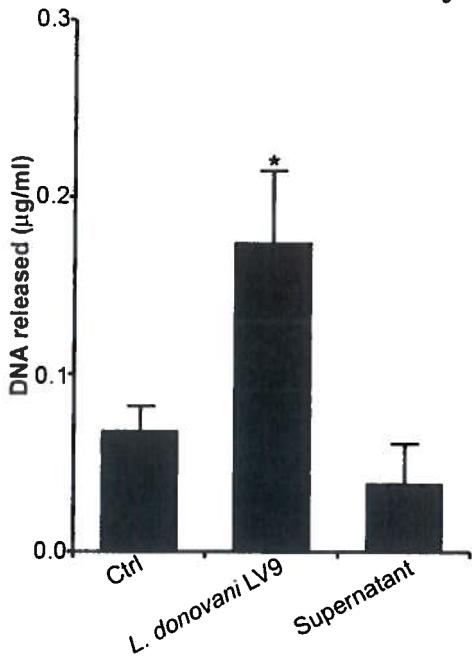


Figure 7. NET release is not mediated by GP63 or a secreted factor. Human neutrophils adhered on poly-L-lysine coverslips were incubated for 30 min with either wild-type, *gp63*-KO, or *gp63*-KO add-back *L. major* promastigotes. A. Samples were fixed and stained for the neutrophil-elastase (green), DNA (blue) and *L. major* promastigotes (anti-LPG, red) (upper panel). Release of DNA was quantified after 30 min (lower panel). One representative experiment out of three performed in triplicates is presented as mean \pm SD. B. Adherent human neutrophils were incubated with either *L. donovani* promastigotes or promastigote-conditionned medium. After 30 min, release of DNA was quantified. Results are the average of three independent experiments performed in triplicates presented as mean \pm SD. * $p<0.05$ compared with resting neutrophils.

LPG confers L. donovani promastigotes resistance to the antimicrobial activity of NET

As NET possess a potent antimicrobial activity, we determined the impact of NET release on the viability of *L. donovani* promastigotes. We included *lpg1*-KO *L. donovani* promastigotes in this assessment, because LPG forms a dense glycocalyx at the promastigote surface that protects the parasite from microbicidal molecules (4). To this end, we incubated human neutrophils with luciferase-expressing *L. donovani* promastigotes (wild type, *lpg1*-KO, and the rescued *lpg1*-KO add-back) and we measured luciferase activity after 6 h of incubation. As shown in Figure 8A, *lpg1*-KO promastigotes survival was significantly reduced compared to that of either wild type or rescued *lpg1*-KO add-back promastigotes. The antimicrobial activity of NET can be abrogated with DNase-1 treatment of neutrophils (19, 38). We thus incubated human neutrophils with luciferase-expressing *L. donovani* WT and *lpg1*-KO promastigotes in the absence or presence of DNase-1 and we measured luciferase activity after 6 h of incubation. As shown in Figure 8B, *lpg1*-KO promastigotes survival was restored in the presence of DNase-1, indicating that LPG confers *L. donovani* promastigotes the ability to resist the microbicidal activity of NET. Of note, resistance to the antimicrobial activity of NET was also observed with *L. major* promastigotes (Fig 8C).

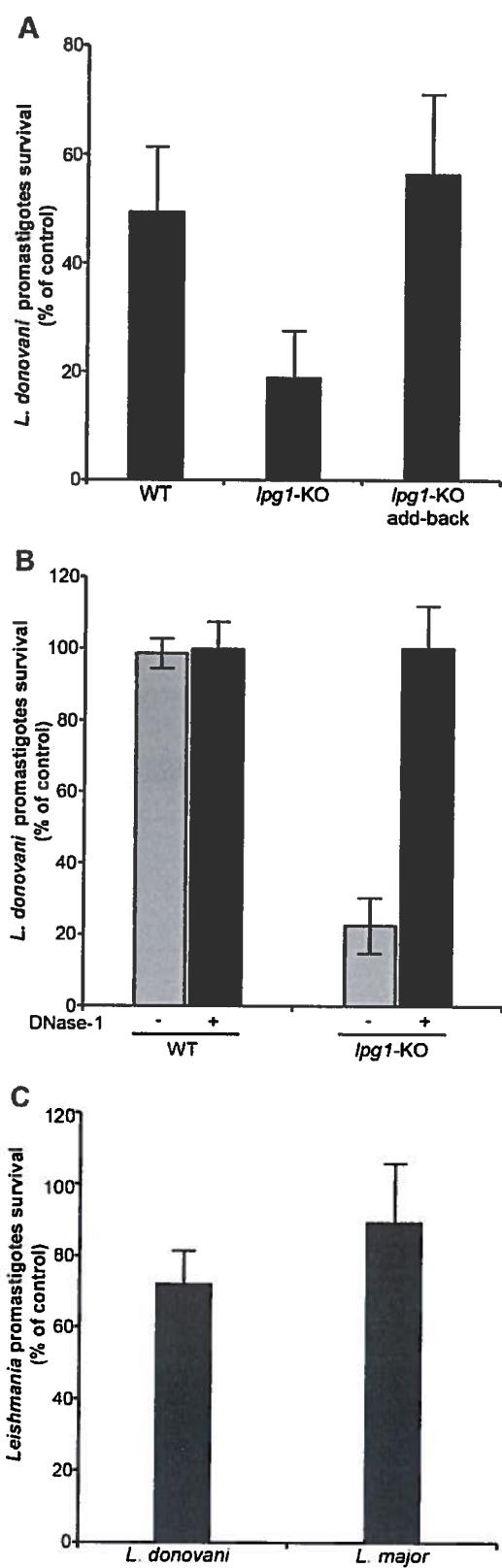


Figure 8. *L. donovani* promastigotes are resistant to the antimicrobial activity of NET.

A. Human neutrophils adhered on poly-L-lysine coverslips were incubated at a MOI of 10:1 with opsonized *L. donovani* 1S promastigotes (WT, *lpg1*-KO, and rescued *lpg1*-KO add-back) expressing luciferase. After 6 h, promastigote survival was determined by dividing the luciferase activity (RLU) in presence of neutrophils by the luciferase activity in the absence of neutrophils. One representative experiment out of four performed in triplicates is presented as mean ± SD. B. Adhered neutrophils were incubated in the absence or the presence of DNase-1 before the addition of *L. donovani* promastigotes (WT and *lpg1*-KO) expressing luciferase at a MOI of 10:1. After 6 h, promastigote survival was determined as described in A. One representative experiment out of two performed in triplicates is presented as mean ± SD. C. Adhered neutrophils were incubated at a MOI of 10:1 with either *L. donovani* (1S) or *L. major* (NIH S clone A2) promastigotes expressing luciferase. After 6 h, promastigote survival was determined as described in A. One representative experiment out of three performed in triplicates is presented as mean ± SD.

ROS are not involved in the induction of NET by Leishmania promastigotes

Previous studies revealed that ROS production is involved in the release of NET (38, 39).

To assess the contribution of ROS in the release of NET, we incubated neutrophils in the absence or presence of either catalase or DPI before the addition of promastigotes. As shown in Figure 9, we did not observe any significant effect of the ROS inhibition on the release of NET induced by *L. donovani* promastigotes, suggesting that a ROS-independent mechanism is involved in this process.

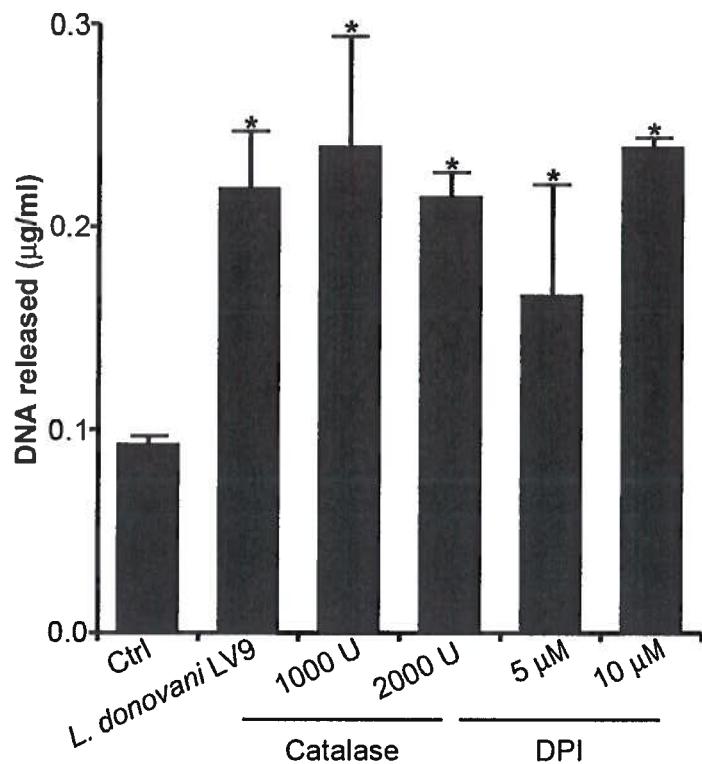


Figure 9. Induction of NET release by *L. donovani* promastigotes is independent of the oxidative burst. Human neutrophils adhered on poly-L-lysine coverslips were incubated in the absence or presence of either catalase or DPI prior to the addition of *L. donovani* promastigotes. After 30 min, release of DNA was quantified. One representative experiment out of three performed in triplicates is presented as mean \pm SD. * $p<0.01$ compared with resting neutrophils.

Discussion

In the present study, we report that whereas *L. donovani* promastigotes induce and are trapped by NET, the surface glycolipid LPG enables these parasites to resist the microbicidal activity of these structures. The observation that induction of NET release was independent of the promastigote opsonization status suggested that a parasite component was responsible for this induction. To identify the parasite molecule(s) potentially involved in this process, we assessed the role of two well-characterized abundant promastigote surface virulence factors, namely LPG and the glycoprotein GP63. Mutants lacking LPG and related phosphoglycans, as well as a mutant lacking GP63 induced NET release and were trapped to the same extent than wild type parasites. Thus, neither LPG, phosphoglycans, nor GP63 are responsible for the rapid induction of NET release by *Leishmania* promastigotes. This is in contrast to the conclusion of Guimarães-Costa and colleagues who reported that addition of purified LPG from *L. amazonensis* promastigotes to human neutrophils was sufficient to induce NET release (21). Several factors may explain the discrepancy between our results and those reported by Guimarães-Costa and colleagues, including the high concentration of purified LPG (10 µg/ml) used to induce DNA release, as well as the structure, in terms of carbohydrate modifications (40). In addition, LPG presented to neutrophils under the form of micelles may elicit cellular responses not observed when presented on particles. Indeed, we found that zymosan particles coated with purified LPG did not trigger NET release and were internalized to the same extent than zymosan. Data obtained with *L. donovani* promastigote-conditionned medium suggested that induction of NET release may not

involve secreted molecules or exosomes (37). Of interest, although production of ROS is as an important stimulus for the release of NET (39), we could not demonstrate the involvement of ROS in the promastigote-induced NET release. Thus, although the mechanism by which *Leishmania* promastigotes elicit the rapid release of NET clearly remains to be elucidated, our data suggest the existence of ROS-independent mechanism.

Most microorganisms trapped by NET are killed in contact with the high local concentrations of antimicrobial molecules present in these structures, that include histones, calprotectin, and the bactericidal/permeability-increasing protein (19, 23, 41). However, some pathogens have evolved strategies to escape trapping and/or killing by NET. One such strategy used by *Streptococcus pneumoniae* and *S. pyogenes*, consists in producing a DNase that degrades the DNA backbone of NET (42, 43). Additionally, the polysaccharide capsule of *S. pneumoniae* was found to reduce trapping by NET, whereas D-alanylation of lipoteichoic acid contributes to the resistance to NET killing by providing positive charge to the bacterial surface (44). Another escape mechanism consists in avoiding NET induction. Hence, the hydrophobin RodA, the major surface component of *Aspergillus fumigatus* conidia, enables this form of the fungus to evade the triggering of NET formation (45). In the case of *L. donovani* promastigotes, our results indicate that LPG confers resistance to the microbicidal activity of NET. Previous studies revealed that the dense glycocalyx formed by LPG at the promastigote surface protects the parasite from hydrolytic enzymes present in the sand fly midgut and from the lytic components of complement (4, 35, 46). We propose that LPG acts as a physical barrier to protect promastigotes from the antimicrobial molecules present in NET. Thus, similar to *Mycobacterium tuberculosis* (26), *L. donovani* promastigotes are trapped by NET but

evade the antimicrobial activity of these structures. It was recently reported that *L. amazonensis* promastigotes are killed by NET (21). The discrepancy between those data and our results suggests that *L. amazonensis*, *L. donovani*, and *L. major* are differentially resistant to the antimicrobial activity of NET. Alternatively, different experimental procedures may account for this discrepancy. Hence, Guimaraes-Costa and colleagues (21) performed their killing assay by incubating *L. amazonensis* promastigotes with PMA-activated neutrophils or with supernatants from PMA-activated neutrophils, whereas we incubated *L. donovani* or *L. major* promastigotes with neutrophils adhered to poly-L-lysine-coated coverslips. Further studies will be required to address this issue.

Much attention has been recently devoted to the internalization of *Leishmania* promastigotes by neutrophils and the consequences of this process on infection (7, 47, 48). Under the experimental conditions used in this study to visualize NET (neutrophils adhered to poly-L-lysine-coated coverslips), internalization of promastigotes by neutrophils was an unfrequent event. This does not exclude the fact that internalized promastigotes may survive in a compartment lacking appropriate microbicidal components (10), and thus enter macrophages according either the Trojan horse strategy (12, 13, 49, 50) or the Trojan rabbit strategy (7, 11). However, consistent with previous reports, we found that human neutrophils in suspension significantly internalized *L. donovani* promastigotes, albeit to a lower extent than zymosan. More importantly, we found that neutrophils in suspension produced NET, as assessed by the quantification of DNA release. Interestingly, careful examination of a figure from an earlier study by Pearson and Steigbigel (33) showing Giemsa-stained cytocentrifuged

neutrophils incubated for 3 hours with *L. donovani* promastigotes strongly suggests that most neutrophils were dying, perhaps as a consequence of NET release.

NET were reported in patients and in various experimental models of infection (19, 21, 23, 42, 43, 45), where they may contribute to the confinement and/or killing of pathogens as well as the modulation of host immune responses. In the context of *Leishmania* infection, NET were observed in lesion biopsies of patients with active cutaneous leishmaniasis and it was proposed that they could be relevant to control the parasite burden (21). The release and impact of NET *in vivo* following inoculation of *Leishmania* promastigotes by the sand fly remain to be demonstrated, and the effect of sand fly saliva on the modulation of NET release and antimicrobial activity is an important issue that will need to be investigated. Whereas Guimarães-Costa proposed that NET is an innate response that might contribute to diminish parasite burden in the *Leishmania* inoculation site (21), based on our findings, we propose that NET might immobilize *L. donovani* promastigotes to facilitate their uptake by mononuclear phagocytes recruited at the site of inoculation.

Acknowledgements

We are grateful to Marcel Desrosiers for his expertise with confocal immunofluorescence microscopy. We thank Dr Salvatore J. Turco (University of Kentucky) for the kind gift of purified *L. donovani* LPG and Dr Arturo Zychlinsky (Max Planck Institute for Infection Biology) for a protocol to quantify NET.

Footnotes

1. This work was supported by Canadian Institutes of Health Research grant MOP-12933. AD is the holder of a Canada Research Chair, and AD and DG were Chercheur-boursier from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). CG was partly supported by the Center for host-parasite interactions (Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies).
2. Address correspondence and reprint requests to Dr. Albert Descoteaux, Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, 531 boul des Prairies, Laval, QC, Canada H7V 1B7. E-mail address: albert.descoteaux@iaf.inrs.ca
3. Abbreviations used in this paper: DPI, diphenyleneiodonium; LPG, lipophosphoglycan; MOI, multiplicity of infection; NET, neutrophil extracellular traps; RLU, relative light unit; ROS, reactive oxygen species; WT, wild-type

References

1. Desjardins, M., and A. Descoteaux. 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med.* 185:2061-2068.
2. Lodge, R., T. O. Diallo, and A. Descoteaux. 2006. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol.* 8:1922-1931.
3. Scianimanico, S., M. Desrosiers, J. F. Dermine, S. Meresse, A. Descoteaux, and M. Desjardins. 1999. Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell Microbiol.* 1:19-32.
4. Spath, G. F., L. A. Garraway, S. J. Turco, and S. M. Beverley. 2003. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:9536-9541.
5. Vinet, A. F., M. Fukuda, S. J. Turco, and A. Descoteaux. 2009. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. *PLoS Pathog.* 5:e1000628.
6. Turco, S. J., and A. Descoteaux. 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol.* 46:65-94.
7. Ritter, U., F. Frischknecht, and G. van Zandbergen. 2009. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitol.* 25:505-510.
8. McFarlane, E., C. Perez, M. Charmoy, C. Allenbach, K. C. Carter, J. Alexander, and F. Tacchini-Cottier. 2008. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun.* 76:532-541.
9. Ribeiro-Gomes, F. L., M. C. Moniz-de-Souza, M. S. Alexandre-Moreira, W. B. Dias, M. F. Lopes, M. P. Nunes, G. Lungarella, and G. A. DosReis. 2007. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J Immunol.* 179:3988-3994.
10. Gueirard, P., A. Laplante, C. Rondeau, G. Milon, and M. Desjardins. 2008. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cell Microbiol.* 10:100-111.
11. Peters, N. C., J. G. Egen, N. Secundino, A. Debrabant, N. Kimblin, S. Kamhawi, P. Lawyer, M. P. Fay, R. N. Germain, and D. Sacks. 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321:970-974.
12. van Zandbergen, G., M. Klinger, A. Mueller, S. Dannenberg, A. Gebert, W. Solbach, and T. Laskay. 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 173:6521-6525.

13. Laskay, T., G. van Zandbergen, and W. Solbach. 2003. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 11:210-214.
14. Nauseef, W. M. 2007. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev.* 219:88-102.
15. Segal, A. W. 2005. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.* 23:197-223.
16. Allen, L. A., and R. L. McCaffrey. 2007. To activate or not to activate: distinct strategies used by *Helicobacter pylori* and *Francisella tularensis* to modulate the NADPH oxidase and survive in human neutrophils. *Immunol Rev.* 219:103-117.
17. Mayer-Scholl, A., P. Averhoff, and A. Zychlinsky. 2004. How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol.* 7:62-66.
18. Laufs, H., K. Muller, J. Fleischer, N. Reiling, N. Jahnke, J. C. Jensenius, W. Solbach, and T. Laskay. 2002. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun.* 70:826-835.
19. Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532-1535.
20. Medina, E. 2009. Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. *J Innate Immun.* 1:176-180.
21. Guimaraes-Costa, A. B., M. T. Nascimento, G. S. Froment, R. P. Soares, F. N. Morgado, F. Conceicao-Silva, and E. M. Saraiva. 2009. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:6748-6753.
22. Urban, C. F., U. Reichard, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 8:668-676.
23. Urban, C. F., D. Ermert, M. Schmid, U. Abu-Abed, C. Goosmann, W. Nacken, V. Brinkmann, P. R. Jungblut, and A. Zychlinsky. 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 5:e1000639.
24. Papayannopoulos, V., and A. Zychlinsky. 2009. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 30:513-521.
25. Grinberg, N., S. Elazar, I. Rosenshine, and N. Y. Shpigel. 2008. Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 76:2802-2807.
26. Ramos-Kichik, V., R. Mondragon-Flores, M. Mondragon-Castelan, S. Gonzalez-Pozos, S. Muniz-Hernandez, O. Rojas-Espinosa, R. Chacon-Salinas, S. Estrada-Parra, and I. Estrada-Garcia. 2009. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 89:29-37.
27. Pelletier, M., A. Bouchard, and D. Girard. 2004. In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J Immunol.* 173:7521-7530.
28. Prive, C., and A. Descoteaux. 2000. *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase,

- and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *Eur J Immunol.* 30:2235-2244.
29. Huang, C., and S. J. Turco. 1993. Defective galactofuranose addition in lipophosphoglycan biosynthesis in a mutant of *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 268:24060-24066.
 30. Descoteaux, A., Y. Luo, S. J. Turco, and S. M. Beverley. 1995. A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. *Science* 269:1869-1872.
 31. Joshi, P. B., B. L. Kelly, S. Kamhawi, D. L. Sacks, and W. R. McMaster. 2002. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol Biochem Parasitol.* 120:33-40.
 32. St-Denis, A., V. Caouras, F. Gervais, and A. Descoteaux. 1999. Role of protein kinase C-alpha in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages. *J Immunol.* 163:5505-5511.
 33. Pearson, R. D., and R. T. Steigbigel. 1981. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol.* 127:1438-1443.
 34. Pearson, R. D., J. A. Sullivan, D. Roberts, R. Romito, and G. L. Mandell. 1983. Interaction of *Leishmania donovani* promastigotes with human phagocytes. *Infect Immun.* 40:411-416.
 35. Sacks, D. L., G. Modi, E. Rowton, G. Spath, L. Epstein, S. J. Turco, and S. M. Beverley. 2000. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:406-411.
 36. Spath, G. F., L. Epstein, B. Leader, S. M. Singer, H. A. Avila, S. J. Turco, and S. M. Beverley. 2000. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:9258-9263.
 37. Silverman, J. M., J. Clos, C. C. de'Oliveira, O. Shirvani, Y. Fang, C. Wang, L. J. Foster, and N. E. Reiner. 2010. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci.* 123:842-852.
 38. Brinkmann, V., and A. Zychlinsky. 2007. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol.* 5:577-582.
 39. Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 176:231-241.
 40. McConville, M. J., and M. A. Ferguson. 1993. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J.* 294 (Pt 2):305-324.
 41. Wartha, F., K. Beiter, S. Normark, and B. Henriques-Normark. 2007. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 10:52-56.
 42. Beiter, K., F. Wartha, B. Albiger, S. Normark, A. Zychlinsky, and B. Henriques-Normark. 2006. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.* 16:401-407.

43. Buchanan, J. T., A. J. Simpson, R. K. Aziz, G. Y. Liu, S. A. Kristian, M. Kotb, J. Feramisco, and V. Nizet. 2006. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Current Biology* 16:396-400.
44. Wartha, F., K. Beiter, B. Albiger, J. Fernebro, A. Zychlinsky, S. Normark, and B. Henriques-Normark. 2007. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol.* 9:1162-1171.
45. Bruns, S., O. Kniemeyer, M. Hasenberg, V. Aimanianda, S. Nietzsche, A. Thywissen, A. Jeron, J. P. Latge, A. A. Brakhage, and M. Gunzer. 2010. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathog.* 6:e1000873.
46. Puentes, S. M., R. P. Da Silva, D. L. Sacks, C. H. Hammer, and K. A. Joiner. 1990. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol.* 145:4311-4316.
47. John, B., and C. A. Hunter. 2008. Immunology. Neutrophil soldiers or Trojan Horses? *Science* 321:917-918.
48. Peters, N. C., and D. L. Sacks. 2009. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol.* 11:1290-1296.
49. Jochim, R. C., and C. Teixeira. 2009. *Leishmania* commandeers the host inflammatory response through neutrophils. *Trends Parasitol.* 25:145-147.+
50. Laskay, T., G. van Zandbergen, and W. Solbach. 2008. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology* 213:183-191.

RESULTAT SUPPLEMENTAIRE

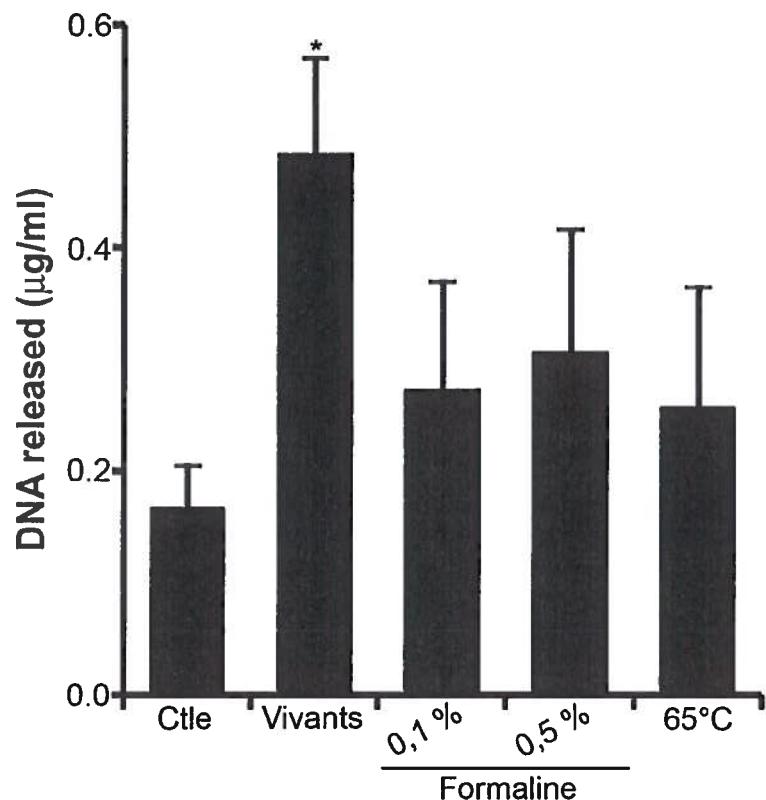


Figure S1: Les promastigotes de *L. donovani* tués à la formaline ou par la chaleur induisent peu la formation de NETs. Les promastigotes de *L. donovani* Ld1S ont été tués soit en présence de formaline (0,1% ou 0,5%), soit à 65°C puis coincubés avec les neutrophiles humains. L'ADN relargué par les neutrophiles a été dosé et exprimé en µg/ml. * $p=0,001$.

DISCUSSION

1 Induction des NETs par le promastigote de *Leishmania*

La contribution et le rôle joué par les neutrophiles dans la leishmaniose est depuis quelques années un sujet très étudié. Il est vrai que les études ont montré qu'ils sont rapidement et abondamment recrutés au site d'inoculation du parasite (Muller *et al.*, 2001, Tacchini-Cottier *et al.*, 2000, Lima *et al.*, 1998, Laurenti *et al.*, 1996, Wilson *et al.*, 1987, Andrade *et al.*, 1984, Peters *et al.*, 2008). De plus, le neutrophile est une cellule qui possède une grande capacité microbicide, notamment grâce à la dégranulation, l'activation de l'enzyme NADPH oxydase et la formation de NETs. La plupart des études menées ont été réalisées chez la souris et dévoilent deux rôles très distincts du neutrophile face à *Leishmania*. Soit il protège l'organisme hôte en détruisant le parasite, soit il contribue à l'établissement de l'infection en aidant *Leishmania* à infecter silencieusement le macrophage (Peters *et al.*, 2009, McFarlane *et al.*, 2008, Peters *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2005, van Zandbergen *et al.*, 2004, Lima *et al.*, 1998, Chang, 1981, Pearson *et al.*, 1981). Durant nos travaux, nous avons mis en évidence une nouvelle réaction du neutrophile face à *Leishmania*, la formation de NETs.

Récemment découverte, la NETose est un phénomène qui suscite un réel intérêt pour les immunologistes et chercheurs traitant des relations hôte/pathogène dans les maladies infectieuses. Suite à l'activation par divers micro-organismes pathogènes, le neutrophile relargue des filaments qui forment un réseau composé d'ADN et de nombreuses protéines leucocytaires (Brinkmann *et al.*, 2004, Urban *et al.*, 2009). Contrairement aux promastigotes, le zymosan n'induit pas de NETs, ce qui témoigne de la spécificité de cet événement pour *Leishmania*. De plus, il est probable que ce soit une réponse du neutrophile généralisée au parasite car *L. donovani* (responsable de la leishmaniose viscérale), *L. major* et *L. amazonensis* (responsables de la leishmaniose cutanée) induisent tous la production de NETs (Guimaraes-Costa *et al.*, 2009).

1.1 Les récepteurs impliqués

Peu d'éléments sont connus quant aux mécanismes qui permettent la formation des NETs. Bien que nous sachions qu'il s'agisse d'un mécanisme actif distinct de l'apoptose et de la nécrose qui nécessite que la cellule soit vivante, les récepteurs impliqués ne sont pas identifiés (Fuchs *et al.*, 2007).

Plusieurs éléments laissent présager que les NETs sont induits suite à un contact direct entre le micro-organisme pathogène et le neutrophile. Premièrement, le relargage d'ADN dépend de la concentration en PMA introduite dans le milieu de culture ainsi que de la quantité de leishmanies présentes (Guimaraes-Costa *et al.*, 2009, Brinkmann *et al.*, 2004). Deuxièmement, seules les cellules proches des promastigotes relarguent des NETs. Troisièmement, l'induction par le PMA ou le LPS génère de plus petites quantités de filaments et nécessite un temps d'incubation plus important que l'induction par les microbes : cinq/dix minutes suffisent dans ce dernier cas contre trois/quatre heures pour le PMA. Enfin, les promastigotes de *L. donovani* tués initient peu le relargage d'ADN (Figure S1). Ainsi, il se peut que plusieurs récepteurs soient impliqués et agissent de façon concertée pour maximiser la formation des NETs. D'ailleurs, il est intéressant de noter que la destruction des microbes par la chaleur s'accompagne de la dégradation des motifs présents à leur surface. Ainsi, si la reconnaissance de motifs moléculaires présents à la surface de *Leishmania* est requise pour la formation des NETs, il est clair que le promastigote tué de cette manière ne peut agir.

1.1.1 PAMPs impliqués dans la NETose induite par le promastigote de *Leishmania*

Les PAMPs sont des motifs moléculaires conservés chez les micro-organismes pathogènes qui permettent leur reconnaissance par le neutrophile. Certains sont bien caractérisés : le LPS des bactéries Gram-négatives, le LTA des bactéries Gram-positives, le peptidoglycan, le LAM de mycobactéries, les β -glycans des levures, les ARNs simple et doubles brin des virus.

Le promastigote de *Leishmania* exprime abondamment à sa surface deux molécules, le glycoconjugué LPG et la protéine GP63. Ces deux molécules sont d'importants facteurs de virulence du parasite. De plus, en interagissant avec les récepteurs des protéines du complément, de la fibronectine et des résidus mannose, le LPG et GP63 agissent en tant que PAMP pour le macrophage et permettent la liaison du parasite à la cellule (Brittingham *et al.*, 1999, Culley *et al.*, 1996, Brittingham *et al.*, 1995, Green *et al.*, 1994, Talamas-Rohana *et al.*, 1990, Russell *et al.*, 1988, Russell *et al.*, 1986).

1.1.1.1 LPG et GP63

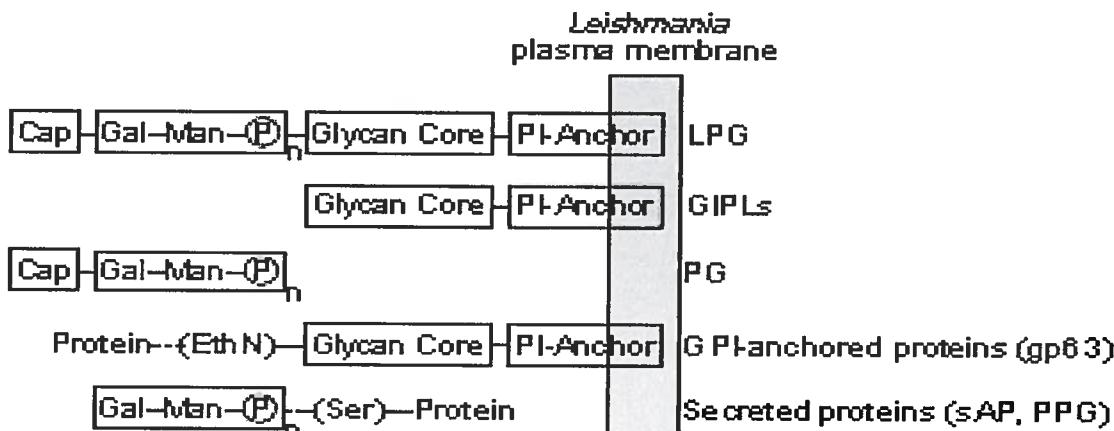
L'utilisation de promastigotes de *L. donovani* et *L. major* respectivement déficients en LPG et GP63 a permis de montrer qu'aucune de ces molécules n'est requise pour l'induction des NETs. Concernant le LPG, nos résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par l'équipe de Guimaraes-Costa (Guimaraes-Costa *et al.*, 2009). Il est possible que cette différence soit due à l'utilisation de LPG purifié à de fortes concentrations alors que nous avons travaillé avec des promastigotes déficients ou des particules de zymosan recouvertes de LPG.

1.1.1.2 Les GIPLs

Les glycosyl-inositolphospholipides (GIPLs) constituent un groupe de glycolipides abondamment présents (1×10^7 molécules/cellule) à la surface de *Leishmania* (Zufferey *et al.*, 2003). Leurs rôles ne sont pas bien connus, cependant étant riches en résidus de mannose et abondamment présents à la surface du parasite, il est possible qu'ils contribuent à la reconnaissance de celui-ci par le neutrophile (via les récepteurs mannose) et qu'ils soient impliqués dans la formation des NETs. Cette hypothèse est étayée par le fait que l'amastigote de *L. amazonensis* induit la formation de NETs (Guimaraes-Costa *et al.*, 2009). En effet, contrairement au LPG et à la protéine GP63 respectivement absent et exprimée à la baisse au stade amastigote, le taux de GIPLs demeure constant et élevé pour les deux stades de développement du parasite (Mukhopadhyay *et al.*, 2006, Schneider *et al.*, 1992, McConville *et al.*, 1991, Medina-

Acosta *et al.*, 1989). Toutefois, il s'avère que les GIPLs sont des molécules de plus petite taille que le LPG et la protéine GP63 (Figure 1). Au stade promastigote, elles sont donc cachées par ces dernières, ce qui rend l'accessibilité des PRRs du neutrophile aux GIPLs moins évidente.

Il est possible de purifier les GIPLs des promastigotes de *L. mexicana* et *L. donovani* (Tachado *et al.*, 1997, Proudfoot *et al.*, 1995, McConville *et al.*, 1993a, McConville *et al.*, 1991). Ainsi, il est envisageable de tester l'impact de ces molécules dans la formation de NETs induite par les promastigotes de *Leishmania*.



(Beverley *et al.*, 1998)

Figure 1 : Structure des glycoconjugués présents à la surface des promastigotes de *Leishmania*. La surface du promastigote de *Leishmania* présente de nombreux glycoconjugués. Certains sont ancrés à la membrane via une ancre lipidique : les GIPLs, le LPG, la protéine GP63. D'autres sont sécrétés : les protéophosphoglycans (PPG), l'acide phosphatase (AP). Du fait de la présence du corps protéique (GP63) et de nombreuses sous-unités répétées (LPG), la protéine GP63 et le LPG ont une taille plus élevée que les GIPLs et masquent la présence de ces derniers.

1.1.2 PRRs du neutrophile impliqués dans la NETose induite par le promastigote de Leishmania

Le neutrophile reconnaît les PAMPs des micro-organismes pathogènes via ses PRRs. Il s'agit de récepteurs membranaires ou cytosoliques qui suite à la liaison aux PAMPs activent des voies de signalisation qui permettent l'élimination des microbes (Table 1). Parmi ces récepteurs, les « Toll-like receptors » (TLRs), les protéines « Nucleotide-binding Oligomerization Domain » (NODs), les récepteurs aux opsonines et les récepteurs aux β -glucans sont les mieux caractérisés. Du fait de la rapidité de l'induction des NETs par les promastigotes, il est essentiel que ces PRRs soient constitutivement exprimés au niveau de la membrane cellulaire et y soient abondamment présents.

Type	Nom	Localisation
TLRs	TLR1	Membrane cellulaire
	TLR2	Membrane cellulaire
	TLR3	Endosome
	TLR4	Membrane cellulaire
	TLR5	Membrane cellulaire
	TLR6	Membrane cellulaire
	TLR7	Endosome
	TLR8	Endosome
	TLR9	Endosome
	TLR10	
	TLR11	Membrane cellulaire
NODs	NOD1	Cytoplasme
	NOD2	Cytoplasme
Opsonines dépendants	Complément	Membrane cellulaire
	CR1	Membrane cellulaire
	CR3	Membrane cellulaire
	Immunoglobulines	Membrane cellulaire
	FcyRIIa (CD32a)	Membrane cellulaire
	FcyRIIIb(CD16b)	Membrane cellulaire

Table 1: Localisation des PRRs du neutrophile

Le zymosan est une particule « fantôme » de la paroi de *S. cerevisiae* principalement constitué de polysaccharides (β -glycanes, mannanes) (Di Carlo *et al.*, 1958). Il est donc reconnu par les récepteurs aux β -glycanes. Nos résultats n'indiquant pas de relargage de NETs par le zymosan, ces récepteurs ne semblent pas être impliqués.

Les NODs étant des protéines cytosoliques (Takeda *et al.*, 2005), il est peu probable qu'elles soient les premiers récepteurs à entrer en jeu dans ce mécanisme. En revanche, les TLRs pourraient intervenir dans ce processus.

1.1.2.1 *Les «Toll-like receptors»*

Les TLRs constituent une famille de protéines transmembranaires. Comme leur nom l'indique, il s'agit de protéines homologues à la protéine Toll. Initialement identifiée comme protéine impliquée dans le développement de l'axe dorso-ventral de la drosophile, la protéine Toll a par la suite intéressé les chercheurs pour sa contribution dans l'immunité innée. En effet, les drosophiles mutées dans la voie de signalisation de Toll sont plus susceptibles à l'infection par le champignon *A. fumigatus* que les drosophiles sauvages (Lemaitre *et al.*, 1996). Par homologie de séquence, treize et dix protéines homologues à Toll (les TLRs) ont respectivement été découvertes chez la souris et l'Homme.

Les TLRs participent grandement à l'immunité innée en reconnaissant une grande variété de PAMPs (lipides, carbohydrates, protéines, acides nucléiques), ce qui permet la reconnaissance de microbes très variés (champignons, bactéries, virus, protozoaires) (Table 1). Chacune de ces protéines reconnaît spécifiquement un PAMP et active une voie de signalisation qui mène à la formation de molécules proinflammatoires et à l'élimination des microbes (Kumagai *et al.*, 2008, Akira, 2006, Kawai *et al.*, 2006, Takeda *et al.*, 2005).

Ces récepteurs ne sont pas tous constitutivement exprimés à la surface de la cellule. TLR3-7-8 et TLR9 sont présents au niveau de la membrane endosomale,

contrairement aux TLRs 1-2-4-5-et 6 (Takeda *et al.*, 2005) (Table 1). La formation de NETs induite par *Leishmania* nécessitant une interaction directe entre le parasite et le neutrophile, TLR1-2-4-5 et TLR6 sont de bons candidats.

TLR2 reconnaît l'acide lipotéichoïque des bactéries Gram-négatives, le peptidoglycan des bactéries Gram-positives, le lipoarabinomannan des mycobactéries, les β -glycane et résidus mannanes du zymosan ainsi que l'hémagglutinine virale (Akira, 2006, Sato *et al.*, 2003). Etant donné que des bactéries Gram-négatives telle que *Salmonella* et des bactéries Gram-positives telle que *Listeria* induisent les NETs, il est probable que TLR2 soit un médiateur de ce phénomène. Cependant, cette hypothèse est ébranlée par le fait que le zymosan soit rapidement phagocyté par le neutrophile et n'indue pas de relargage d'ADN ou d'élastase.

Présentant de fortes homologies entre-elles, les TLRs 1 et 6 se dimérisent à TLR2 pour former un récepteur fonctionnel (Takeuchi *et al.*, 2001, Takeuchi *et al.*, 1999, Takeuchi *et al.*, 2002, Ozinsky *et al.*, 2000). Etant donné qu'il semble peu probable que TLR2 soit important pour l'induction des NETs, il est possible que ce soit également le cas pour TLR1 et TLR6.

TLR5 reconnaît la flagelline, (protéine présente sur toute la surface du flagelle de la bactérie). Malheureusement bien que flagellé, aucune étude relatant de la présence de flagelline sur le promastigote de *Leishmania* a été publiée.

TLR4 demeure le candidat le plus plausible. En effet, ce membre de la famille des TLRs est impliqué dans la réponse précoce du macrophage face à *S. typhimurium* (Weiss *et al.*, 2004). Il est donc concevable qu'il agisse également rapidement chez le neutrophile. L'implication de TLR4 dans la leishmaniose a été mise en évidence *in vivo* et *in vitro* par le fait que les souris déficientes en TLR4 ne contrôlent pas l'infection de *L. major* et que l'élimination de ce même parasite par le macrophage activé par l'élastase du neutrophile passe par la voie de signalisation de TLR4 (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2007, Kropf *et al.*, 2004a, Kropf *et al.*, 2004b).

Les autres arguments qui soutiennent cette hypothèse, sont d'une part que TLR4 reconnaît les mannanes de *C. albicans*, ainsi que le LPS des bactéries Gram-négatives (Table 2). Or, il a été montré que *C. albicans* ainsi que le LPS induisent la formation de NETs (Urban *et al.*, 2009, Urban *et al.*, 2006b, Brinkmann *et al.*, 2004). De plus, TLR4 reconnaît les GIPLs de *T. Cruzi* (Medeiros *et al.*, 2007, Oliveira *et al.*, 2004). *Leishmania* et *Trypanosoma* appartenant à la même famille, celle des *Trypanosomatidae*, il est possible qu'en plus d'être reconnus par les récepteurs mannose, les GIPLs de *Leishmania* interagissent également avec TLR4.

Enfin TLR4 est impliqué dans la formation de NETs durant la septicémie (ou sepsis) sévère. Cette pathologie se caractérise par une réaction du système immunitaire face à une infection bactérienne. Sans comprendre les relations qui s'établissent entre ces différents partenaires, il est connu que le neutrophile, le LPS ainsi que les plaquettes du sang jouent un rôle dans ce type de sepsis. Grâce aux expériences menées *in vivo* et *in vitro* par l'équipe du Dr. Kubes, cette relation est mieux comprise. En effet, une population de plaquettes reconnaissent le LPS bactérien présent dans le sang via le TLR4 exprimé à leur surface. Une fois activées, ces cellules s'agglomèrent et se lient aux neutrophiles circulants. Cette interaction permet une adhésion stable des neutrophiles et est responsable de leur activation. Par la suite, les neutrophiles activés relarguent des NETs capables de capturer *E. coli* présente dans la circulation sanguine (Ma *et al.*, 2008, Clark *et al.*, 2007). Les tests de survie d'*E. coli* suite à sa capture n'ayant pas été relatés, le rôle des NETs dans le sepsis sévère n'est actuellement pas connu (Figure 2).

Afin de vérifier l'impact des TLRs dans la formation des NETs induite par le promastigotes de *Leishmania*, il serait intéressant d'utiliser soit des anticorps spécifiques ou de transfecter les neutrophiles par des ARNs interférence qui diminueraient l'expression de ces protéines. Il existe des souris dépourvues en TLRs ainsi que des souris dont les voies de signalisation dépendantes des TLRs sont affectées (ex. les souris C57BL/10ScCr et C57BL/10ScNcr) (Kropf *et al.*, 2004b). Leur utilisation pour d'éventuelles expériences complémentaires pourrait être une autre alternative. Cependant, le fait que la réponse envers *Leishmania* diffère selon l'origine du neutrophile, et que la

NETose chez la souris soit un mécanisme plus lent que chez l'Homme, rend cette stratégie discutable (Chapitre 4).

	PAMP	Pathogène	TLR
Bactéries	Lipopolysaccharide	Bactéries gram-négatives	TLR4
	Lipopeptides diacyliques	<i>Mycoplasma</i>	TLR2/6
	Lipopeptides triacyliques	Bactéries et mycobactéries	TLR1/2
	Acide lipoteïchoïque	<i>Streptococcus</i> de groupe B	TLR2/6
	Peptidoglycan	Bactéries Gram-positives	TLR2
	Porines	<i>Neisseria</i>	TLR2
	Lipoarabinomannan	Mycobactéries	TLR2
	Flagelline	Bactéries flagellées	TLR5
	ADN CpG	Bactéries et mycobactéries	TLR9
	Non déterminé	Bactéries uropathogènes	TLR11
Champignon	Zymosan	<i>S. cerevisiae</i>	TLR2/6
	Phospholipomannan	<i>C. albicans</i>	TLR2
	Mannan	<i>C. albicans</i>	TLR4
	Glucuronoxylomannan	<i>C. neoformans</i>	TLR2/4
Parasite	tGPI-mutin	<i>Trypanosoma</i>	TLR2
	Glycoinositolphospholipides	<i>Trypanosoma</i>	TLR4
	Hemozoïne	<i>Plasmodium</i>	TLR9
	Phosphoglycans	<i>Leishmania</i>	TLR2
	Non déterminé	<i>Leishmania</i>	TLR4
	Profilin-like molecule	<i>T. gondii</i>	TLR11
Virus	ADN	Virus	TLR9
	ARN double brin	Virus	TLR3
	ARN simple brin	Virus à ARN	TLR7/8
	Protéine de fusion	RST	TLR4
	Protéines de l'enveloppe	MMTV	TLR4
	Hemagglutinine	Virus de la rougeole	TLR2

Table 2 : Liste des PAMPs reconnus par les TLRs.

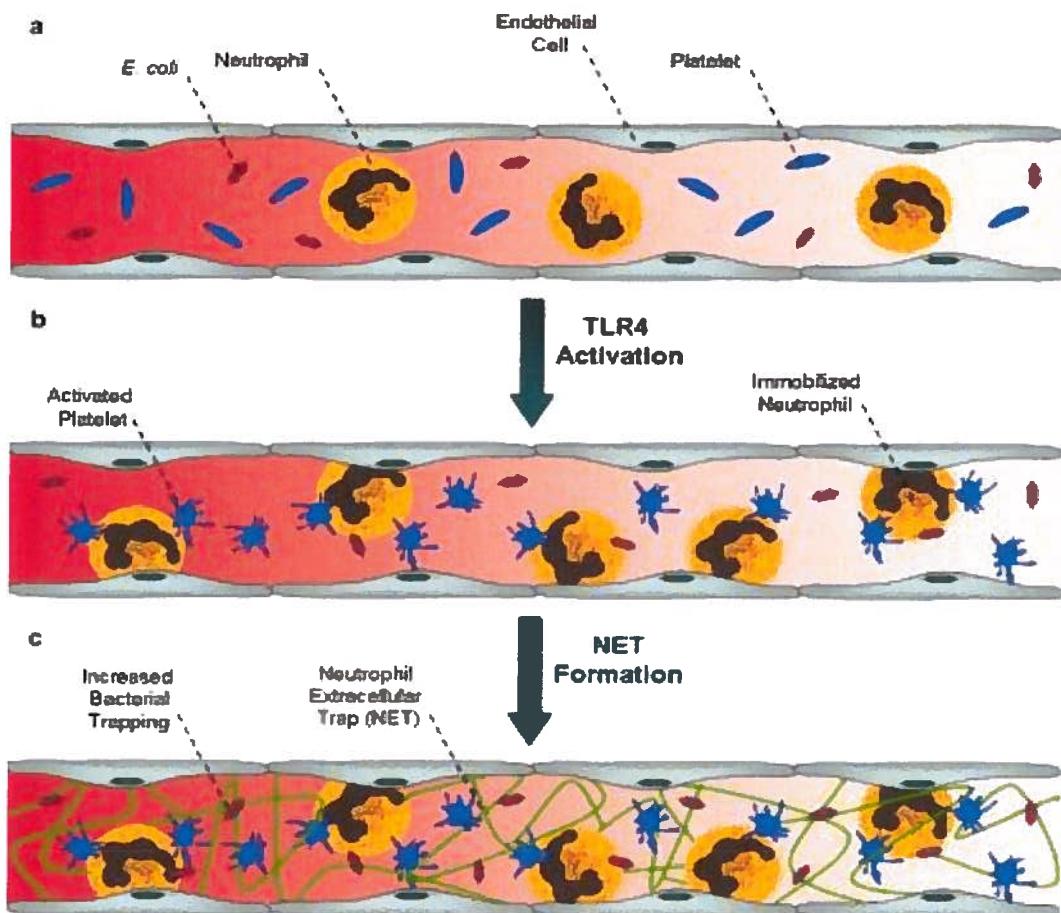
(Ma *et al.*, 2008, Clark *et al.*, 2007)

Figure 2 : Formation de NETs par les neutrophiles circulants induite par les plaquettes-TLR4. (a) Avant activation, les plaquettes et les neutrophiles circulent dans le sang. Le LPS des bactéries *E. coli* présentes dans la circulation activent les plaquettes qui possèdent le récepteur TLR4 à leur surface. (b) Les plaquettes activées agrègent et se fixent aux neutrophiles. Les neutrophiles fortement adhérés aux plaquettes, s'immobilisent et (c) s'activent pour former des NETs qui capturent *E. coli* qui circule dans le sang.

1.1.2.2 *Les récepteurs aux protéines du complément*

Le neutrophile est également pourvu de récepteurs membranaires qui permettent la reconnaissance des opsonines. Deux groupes d'opsonines sont connus, les protéines du complément et les immunoglobulines, notamment celles du type G (IgG). Présentes dans le sérum, les opsonines se fixent aux micro-organismes pathogènes et sont reconnues à la surface du neutrophile par leurs récepteurs spécifiques. Le fragment Fc des IgGs est reconnu par les récepteurs Fc γ RIIa (CD32a) et Fc γ RIIIb (CD16b) tandis que les protéines du complément, notamment les protéines C3 et C1 se fixent à CR1 et CR3. Etant donné que l'opsonisation des micro-organismes pathogènes facilite leur internalisation par le neutrophile, il est possible qu'elle favorise également la formation de NETs. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons quantifié les NETs produits en présence de *L. donovani* (Ld1S, LV9) ou de *L. major*, opsonisés ou non aux protéines du complément. Les résultats obtenus montrent que les filaments sont induits à des niveaux similaires en absence et en présence d'opsonines. Ceci suggère donc que les récepteurs des protéines du complément ne sont pas essentiels. Notre observation concorde avec celles de deux autres équipes. En effet, l'opsonisation de *C. albicans*, de *M. tuberculosis* et de *M. canetti* n'est pas un prérequis à la formation de NETs (Ramos-Kichik *et al.*, 2009, Urban *et al.*, 2006b).

1.1.2.3 *L'adhésion des neutrophiles et la présence de sérum dans le milieu*

Bien que depuis quelques années le rôle du neutrophile dans la leishmaniose soit un sujet très étudié, la formation de NETs par ces cellules en réponse à l'infection par *Leishmania* n'a été observée qu'une seule fois avec les promastigotes et amastigotes de *L. amazonensis* (Guimaraes-Costa *et al.*, 2009).

La présence de sérum dans le milieu de culture, l'utilisation de neutrophiles murins et l'usage de cellules en suspension (cf. 4.1) peuvent être des facteurs limitant pour l'induction des NETs.

1.1.2.3.1.1 L'adhésion des neutrophiles

Généralement, les études qui traitent de la relation neutrophile/*Leishmania* utilisent des cellules en suspension ou isolées à partir d'une poche d'air formée dans le dos de la souris par l'injection sous-dermique d'air stérile (Forget *et al.*, 2005, Matte *et al.*, 2000). Or, tous les travaux qui étudient la formation des NETs *in vitro* emploient des neutrophiles préalablement adhérés sur une surface prétraitée à la poly-L-lysine. La nécessité de l'adhésion des cellules pour ce phénomène est également relevée dans l'étude de Clark (Clark *et al.*, 2007). En effet, bien que le LPS soit un puissant inducteur des NETs (Brinkmann *et al.*, 2004), les neutrophiles circulants activés par ce composé bactérien ne relarguent pas d'ADN contrairement à ceux qui sont adhérés aux plaquettes.

1.1.2.3.1.2 Le sérum

L'impact du sérum présent dans le milieu d'incubation des neutrophiles a également été testé (Fuchs *et al.*, 2007). Le sérum inhibe de manière dose-dépendante la formation de NETs induite par le PMA. 5% de sérum suffisent à diminuer de moitié la quantité de NETs produits et 20% à quasi-inhiber le phénomène. Durant nos expériences, nous avons uniquement travaillé en présence de 2% de sérum autologue, ce qui correspond selon l'équipe de Fuchs à la quantité maximale permise pour être capable de détecter suffisamment de NETs. Etant donné que pour les précédentes études traitant de l'impact du neutrophile sur *Leishmania*, les cellules étaient incubées dans du milieu complémenté par au moins 10% de sérum, il est possible que l'induction des NETs ait été supprimée.

La raison pour laquelle le sérum à de hautes concentrations inhibe la formation des NETs n'est actuellement pas connue.

2 Rôle des NETs dans l'infection par *Leishmania*

Une fois capturés par les filaments, *L. amazoniensis*, *S. flexneri*, *S. aureus*, et *C. albicans* sont éliminés (Guimaraes-Costa *et al.*, 2009, Brinkmann *et al.*, 2004). Ainsi, le rôle généralement attribué à ces structures est la destruction des microbes et la restriction de leur dissémination dans l'organisme hôte. Ce dernier rôle est confirmé par le fait que les streptocoques capables de se libérer des NETs se disséminent plus efficacement que les bactéries qui y restent piégées (Beiter *et al.*, 2006). Dans notre cas, bien que *Leishmania* soit capturé par les filaments d'ADN/élastase, il résiste à leur activité microbicide. La même observation a été faite avec *M. tuberculosis* et *M. canetti* (Ramos-Kichik *et al.*, 2009). Dans cet article, les auteurs suggèrent que les filaments limitent la dissémination des mycobactéries en gardant l'infection localisée. Un tel rôle des NETs dans l'infection par *Leishmania* est également possible, mais il est également probable qu'ils contribuent à l'établissement de l'infection dans l'organisme hôte.

2.1 Les NETs limitent l'infection par *Leishmania*

L'une des conséquences de la formation des NETs par *Leishmania* pourrait être la production ou le relargage de cytokines telle que l'IL-8, connue comme inducteur efficace des NETs et puissant facteur chemoattractant des neutrophiles (Brinkmann *et al.*, 2004). Cette hypothèse sous-entend que les neutrophiles nouvellement recrutés ne forment pas de NETs à leur tour. Au contraire, ils phagocyteraient les promastigotes piégés et les détruirait notamment par la production de ROS (Lima *et al.*, 1998, Pearson *et al.*, 1981, Chen *et al.*, 2005, Chang, 1981, Beil *et al.*, 1992).

La formation des NETs pourrait également servir à activer d'autres médiateurs du système immunitaire. L'élastase et la MPO présentes sur les filaments activeraient les macrophages tissulaires et permettraient la destruction des promastigotes, comme cela a été démontré auparavant (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2007).

2.2 Les NETs contribuent à l'infection de l'organisme hôte par *Leishmania*

La seconde hypothèse quant au rôle des NETs dans la leishmaniose, est qu'ils favoriseraient l'infection. *Leishmania* capturé par les filaments serait hautement concentré au site d'inoculation. Résistant à l'activité microbicide des NETs, le parasite attendrait la venue des macrophages sans être altéré. Notons que les promastigotes sont flagellés et de ce fait très mobiles dans le milieu. En étant capturés par ces structures, les promastigotes se retrouvent immobilisés et deviennent par conséquent très accessibles aux neutrophiles et macrophages.

Dans le cas où des neutrophiles sont recrutés au site de formation des NETs, les notions de « cheval de Troie » et de « trojan rabbit » sont valides. En effet les leucocytes recrutés phagocyteraient les promastigotes, lesquels résisteraient à l'action microbicide de ces cellules et retarderaient leur entrée en apoptose. Ainsi, le macrophage internaliserait une cellule apoptotique infectée ou un parasite libre mais adapté aux conditions hostiles du phagosome (Laskay *et al.*, 2003, van Zandbergen *et al.*, 2004, Laskay *et al.*, 2008). Dans les deux cas, *Leishmania* infecte sa cellule hôte sans initier de réponse inflammatoire.

Bien entendu, il nous est impossible de vérifier *in vivo* la pertinence de ces hypothèses. Néanmoins, des expériences utilisant des macrophages isolés à partir de sang de donneurs sains permettrait de contourner ce problème. L'analyse de l'induction des NETs par les promastigotes de *Leishmania* chez la souris est quant à elle moins évidente du fait des points mentionnés dans le chapitre 4.

3 Résistance de *Leishmania* face à l'activité microbicide des NETs

S. flexneri, *S. aureus*, *L. amazonensis*, *C. albicans* initient la formation de NETs, sont capturés puis tués par ces structures (Guimaraes-Costa *et al.*, 2009, Brinkmann *et al.*, 2004). Les observations obtenues par analyse en microscopie confocale et analyse protéomique ont montré que de nombreuses protéines d'origine nucléaire, granulaire et cytoplasmique à activité microbicide sont présentes sur ces filaments (Urban *et al.*, 2009, Brinkmann *et al.*, 2004). Parmi ces protéines, les histones, la calprotectine et l'élastase sont responsables de l'élimination des micro-organismes pathogènes testés. *L. donovani* n'étant pas éliminé par ces structures, il est légitime de se demander si les NETs induits par ce parasite sont structurellement et fonctionnellement similaires à ceux formés par les micro-organismes pathogènes cités ci-dessus. En effet, bien que l'élastase et l'ADN y soient présents, l'existence d'autres protéines telles que la calprotectine et la BPI sur ces filaments n'a pas été vérifiée. Toutefois, le fait que les promastigotes dépourvus en glycoconjugués de surface (dont le LPG) soient drastiquement éliminés par les NETs, rejette cette hypothèse.

3.1 Contribution du LPG dans la protection de *Leishmania*

Le LPG est un glycoconjugué ancré à la membrane du promastigote de *Leishmania*. De nombreux travaux ont montré que sa présence contribue à l'établissement de l'infection du parasite notamment via l'altération des voies de signalisation du macrophage (Prive *et al.*, 2000, Descoteaux *et al.*, 1991) et le retard de la maturation phagosomale (Vinet *et al.*, 2009, Lodge *et al.*, 2005a, Holm *et al.*, 2001). En formant une couche épaisse sur le promastigote, le LPG constitue un glycocalyx dense (17 nm) qui protège *Leishmania* de l'action lytique des protéines du complément (Sacks *et al.*, 2000, Puentes *et al.*, 1990). Il est donc possible que comme observé chez le macrophage, le

LPG des promastigotes de *L. donovani* protège ce dernier de l'activité microbicide des différentes protéines présentes sur les NETs.

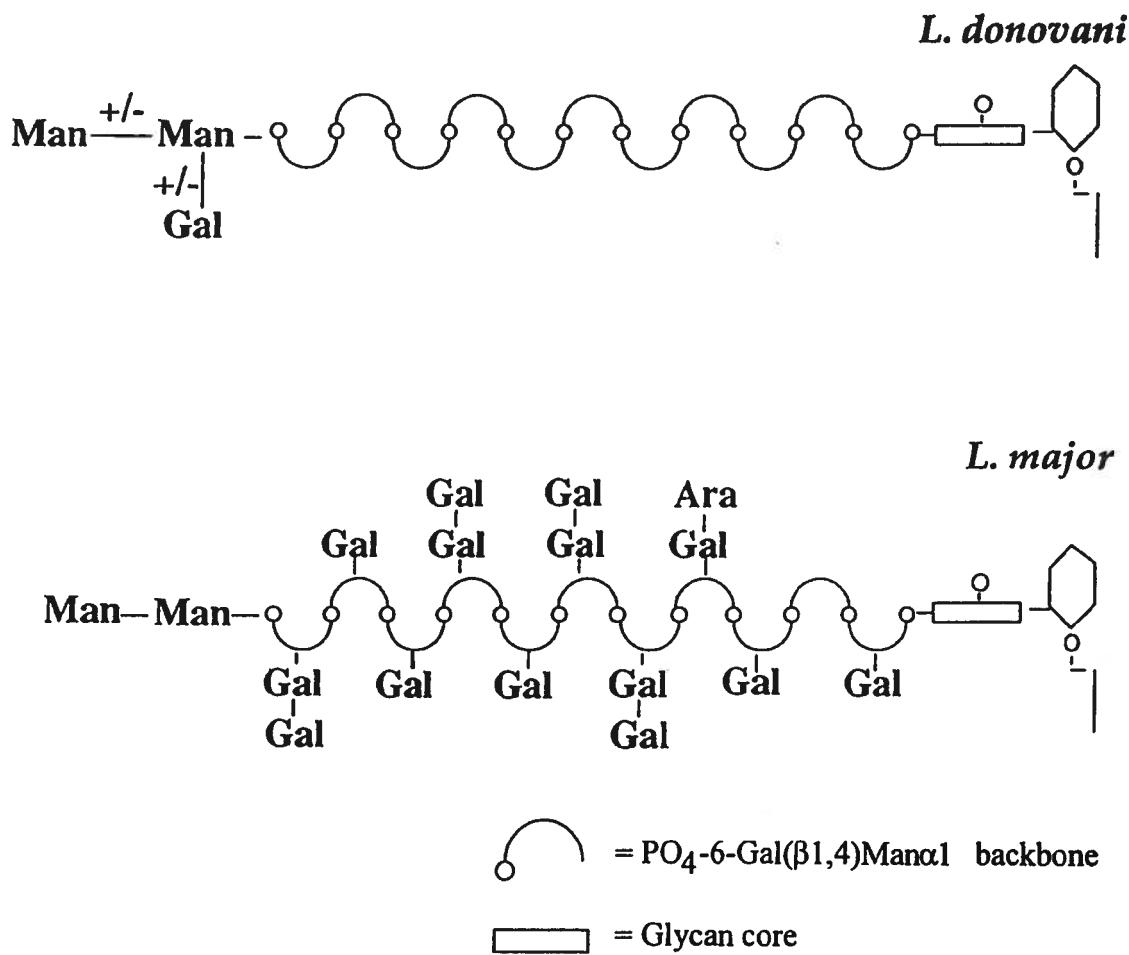
3.2 Implication de la structure du LPG

La structure du LPG varie selon l'espèce de leishmanie (McConville *et al.*, 1995). *L. donovani* synthétise un LPG de type 1 non ramifié tandis que *L. amazonensis* exprime un LPG plus complexe (Figure 3).

La capacité du promastigote à résister à l'activité microbicide des NETs pourrait changer selon la structure du LPG. Pour tester une telle éventualité, un test de survie utilisant les promastigotes de *L. major* (qui possède un LPG de type 2 ramifié), ou les promastigotes de *L. aethiopica* (qui possède un LPG ramifié de type 3) est envisageable.

Les différences structurelles du LPG pourraient également expliquer la destruction des promastigotes de *L. amazonensis* par les NETs (Guimaraes-Costa *et al.*, 2009).

Bien qu'il soit établit que le LPG est un important facteur de virulence de *L. major* et *L. donovani*, celui de *L. mexicana* n'est pas essentiel à l'infection des macrophages (Ilg, 2000). L'utilisation de promastigotes de *L. mexicana* permettrait de vérifier si le rôle joué par le LPG face aux NETs est associé ou non à son statut de facteur de virulence.



(Butcher *et al.*, 1996)

Figure 3 : Structure du LPG des promastigotes de *Leishmania*. La structure et composition du LPG varie selon l'espèce du *Leishmania*. *L.donovani* possède un LPG simple, non ramifié contrairement au promastigote de *L. major*.

3.3 Altération de l'accessibilité des protéines antimicrobiennes au promastigote de *Leishmania* par le LPG

Comme les promastigotes sauvages de *L. donovani*, les promastigotes *lpg1*-KO et *lpg2*-KO déficients en LPG induisent le relargage d'ADN ainsi que la formation de filaments d'ADN/élastase dans lesquels ils sont piégés. L'observation des échantillons par microscopie confocale a mis en évidence une différence structurelle de ces filaments. En l'absence de glycoconjugués de surface dont le LPG, les filaments formés sont plus épais et compacts que ceux produits par les promastigotes sauvages. Actuellement, les mécanismes par lesquels les micro-organismes interagissent avec les NETs ne sont pas connus. Cependant plusieurs équipes supposent que des interactions électrostatiques entre les bactéries et les filaments interviennent. En effet, les NETs sont en majorité (70%) constitués d'histones (hautement positivement chargés) ainsi que de protéines qui peuvent avoir une charge positive ou négative (Urban *et al.*, 2009). Les bactéries quant à elles possèdent une paroi constituée d'éléments également chargés tel que le LTA (bactéries Gram-positives) ou le LPS (bactéries Gram-négatives).

Comme *Leishmania*, *S. pneumoniae* est capturé par les NETs sans être éliminé. Cette résistance a été attribuée à la présence de LTA à sa surface, plus particulièrement aux charges négatives de cette molécule. La D-alanylation du LTA introduit des charges positives et conduit à la destruction de la bactérie par les filaments (Wartha *et al.*, 2007a). Le LPG est une molécule fortement négativement chargée. En éliminant sa présence à la surface des promastigotes, la charge du parasite est modifiée. Par comparaison à l'étude de Wartha, il est possible que les charges du LPG permettent à *Leishmania* de se fixer le long des filaments en interagissant sur des protéines positives qui ne l'affectent pas. Au contraire le mutant devenu moins négatif se fixerait sur des protéines qui ont un effet microbicide sur le promastigote.

4 Notes expérimentales

La réaction du neutrophile face à *Leishmania* est très étudiée depuis quelques années et pourtant seule l'étude de Guimaraes-Costa et la nôtre décrivent la formation des NETs. En effet, que ce soit dans le modèle du « cheval de Troie » ou pour l'élimination du parasite, toutes les études ont jusqu'alors observé la phagocytose de *Leishmania* par le neutrophile. Comme mentionné auparavant, l'utilisation de sérum et de cellules en suspension semble en être les raisons. De plus, il faut souligner que les précédentes recherches employaient également des neutrophiles murins.

4.1 L'utilisation de neutrophiles murins vs les neutrophiles humains

La formation des NETs chez la souris a été testée et comparée à celle observée chez l'Homme. Il s'avère que suite à l'infection par *L. monocytogenes*, *C. albicans* et l'incubation au PMA, les neutrophiles murins forment des NETs. Ces NETs sont structuralement similaires à ceux produits par le neutrophile humain puisqu'il s'agit de fibres lisses de 15 nm de diamètre composées d'ADN, de MPO, d'histones, qui présentent des domaines globulaires de 30 nm (Ermert *et al.*, 2009). En revanche, l'analyse par microscopie de ces domaines globulaires révèle que ces derniers sont très proches les uns des autres et recouvrent la quasi-totalité de la surface de NETs, contrairement à ce qui est observé chez l'Homme. L'utilisation de neutrophiles issus de souris déficientes en gp91^{phox} a montré que la formation des NETs chez la souris dépend également de la présence des ROS. Cependant, le processus mis en place par le neutrophile murin est plus long que celui observé chez son homologue humain. En effet, alors que trois à quatre heures d'incubation au PMA suffisent pour initier la NETose chez 80% des neutrophiles humains, seize heures sont nécessaires pour obtenir 30% de cellules formant des NETs chez la souris (Ermert *et al.*, 2009).

La plupart des études traitant de l'interaction neutrophile/*Leishmania* ont été effectuées avec des neutrophiles murins, notamment ceux de souris Balb/c et C57Bl/6. L'équipe d'Ermert a testé l'induction des NETs chez sept espèces différentes de souris, parmi lesquelles les souris Balb/c et C57Bl/6. Leur étude a montré que les neutrophiles de ces dernières ont une cinétique de formation des NETs similaire ainsi qu'un taux équivalent de cellules qui entrent en NETose.

Lors de nos travaux, nous avons observé l'induction des NETs par les promastigotes de *L. major* et *L. donovani* chez le neutrophile humain. Bien que les NETs aient été observés et caractérisés chez le neutrophile murin, rien ne prédit leur formation par *Leishmania*. En effet, la réponse du neutrophile diffère selon son origine ainsi que l'espèce de leishmanie utilisée (Charmoy *et al.*, 2007). Par exemple, les souris C57BL/6 sont résistantes à l'infection par *L. major*, contrairement aux souris Balb/c qui sont susceptibles. Ceci pourrait expliquer le fait que les NETs n'aient pas été observées auparavant.

4.2 Variation entre les donneurs

Il n'a pas toujours été aisément d'effectuer des moyennes entre les résultats obtenus avec les différents donneurs. En réalité, bien que nous observions tout le temps et quelque soit le donneur une induction très significative des NETs par *Leishmania*, le niveau pouvait fortement varier selon le donneur. Cette observation a également été mentionnée dans l'article de Fuchs (Fuchs *et al.*, 2007). Les auteurs ont comparé la formation de filaments par les neutrophiles simultanément isolés de quatre donneurs puis stimulés soit au PMA soit à la glucose oxydase (GO). Comme nous, ils ont constaté que le nombre de cellules qui entrent en NETose varie selon le donneur. Etant donné que nous avons peu de connaissances sur les mécanismes qui initient ce phénomène chez le neutrophile, il est difficile de comprendre pourquoi un individu répond plus fortement qu'un autre.

Partant de cette observation, on peut se demander si tous les neutrophiles sont capables de former des NETs en réponse à *Leishmania*. Certaines études ont montré

qu'en réalité la population de neutrophiles isolés à partir de sang humain est une population hétérogène de cellules. En effet, les neutrophiles isolés d'un même donneur ne sont pas tous équivalents quant à l'expression de récepteurs à leur surface, leur capacité à adhérer ainsi que par leur aptitude à générer des ROS (Egginton *et al.*, 1995, Egginton *et al.*, 1992, Gallin, 1984, Seligmann *et al.*, 1981, Klempner *et al.*, 1978). Ne connaissant pas les facteurs responsables de l'entrée en NETose des neutrophiles, il est probable que seulement certaines sous-populations puissent former des NETs. De plus, l'équipe de Yost montre que les neutrophiles issus de nouveaux nés et activés au LPS ne forment pas ces structures (Yost *et al.*, 2009). Ceci met bien en évidence, que le neutrophile humain doit acquérir certaines propriétés pour être capable de former de telles structures.

Ainsi, on peut supposer que certains donneurs forment plus de NETs que d'autres grâce à la présence dans leur sang d'une plus grande proportion de neutrophiles aptes à produire ces structures.

CONCLUSION

La réponse précoce du neutrophile face à *Leishmania* est un sujet à controverse. Les précédentes études décrivent une internalisation du parasite par le leucocyte, lequel contribue soit à l'élimination, soit à la préservation de *Leishmania*.

Durant cette thèse, nous avons mis en évidence la formation de « neutrophils extracellular traps » induite par les promastigotes de *Leishmania* chez le neutrophile humain.

En contact avec le parasite, le neutrophile entre rapidement dans une voie de mort cellulaire récemment identifiée, la NETose. Ce processus le conduit à former et relarguer des structures très filamenteuses composées essentiellement d'ADN puis de protéines cytoplasmiques et granulaires. Ces structures ainsi formées piègent et immobilisent *Leishmania* sans le tuer.

Nos travaux ont ainsi permis d'identifier une nouvelle réponse de l'hôte face à *Leishmania*. Cette étude a également mis en évidence qu'une fois de plus le parasite parvient à déjouer la réponse immunitaire de l'hôte mammifère dans le but d'assurer sa survie et probablement son établissement.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de cette thèse au cours de ces cinq dernières années. En premier lieu je remercie mon directeur de recherche, le Dr. Albert Descoteaux de m'avoir accueillie au sein de son équipe et orientée vers ce beau projet. Merci de m'avoir permis de continuer malgré les nombreuses expériences infructueuses entreprises, encouragée à développer ce projet au cours de ces deux dernières années.

Je remercie également les Drs. Charles Dozois, Martin Olivier, Paul Naccache pour le temps qu'ils ont consacrés à l'évaluation de cette thèse.

Une petite note également pour le personnel de l'IAF, en particulier Anne Phillipon qui m'a souvent vu franchir la porte de son bureau, Carole Bouchard que j'ai plus d'une fois appelé en panique pour passer une commande et qui a souvent entendu des « s'il-te-plaît,... c'est super urgent », Marcel pour son expertise et son aide pour les expériences nécessitant l'usage du microscope confocal.

Je remercie le Dr. Denis Girard et son équipe : Jean-Christophe, David, Jamila, Marie-Michelle, François, Sonia, Francis pour leur gentillesse et leur aide pour les neutrophiles.

J'ai eu énormément de chance de travailler au sein de « l'équipe Descoteaux ». Un grand merci aux membres passés et présents du laboratoire, spécialement à Adrien présent dès le début de cette expérience. Merci également à Jean-Fred, Tamsir (le macho), Robert (que nous aimions tant faire rougir), François « moufflet », John, Julia, PO (et son inoubliable imitation de la moule et de la bactérie flagellée), Christine pour sa joie de vivre et son dynamisme, Louise et sa patience, les « nouveaux » du lab. : Sahar, Neda « chocolate-addict girl », Guillermo, Lydie et Carolina (petites mais....). Bien évidemment, je n'oublie pas les stagiaires : Aurélie, Christine T., Geneviève, Mireille, Stéphanie (tellement sage et silencieuse...). Merci à tous pour votre bonne humeur, votre grain de folie et l'atmosphère d'entraide qui a régné au laboratoire.

L'IAF étant une petite structure, il a été facile de créer des liens avec les étudiants des autres laboratoires : Houda, Meriam, Alban, Charles, Caro, Benoît, Phillippe, Olivier, Gilles (qui sait si bien tester ma résistance), Ronan, Héctor, Sil. (mémorable durant ses grossesses), Audrey et tous ceux que j'ai oublié. Merci pour ces lunchs au cours desquels nous résolvions tant de problèmes existentiels, scientifiques et métaphysiques.

Je remercie également mes amis ainsi que ma famille, qui sont là-bas, de l'autre côté de l'océan. Surtout mes parents qui ont toujours été présents quelque soit la distance et qui m'ont toujours soutenue et guidée. Je vous en suis extrêmement reconnaissante et suis pleinement consciente que je n'y serai jamais parvenu sans vous. Merci également à « Mr. » Victor pour ses conseils, son support et son aide dans bien des domaines.

Enfin, je souhaite dédicacer cette thèse à ma grand-mère pour laquelle j'ai souvent eu une pensée au cours de ces dernières années.

BIBLIOGRAPHIE

- Aga, E., Katschinski, D.M., van Zandbergen, G., Laufs, H., Hansen, B., Muller, K., et al. (2002). Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol* **169**, 898-905.
- Ago, T., Kuribayashi, F., Hiroaki, H., Takeya, R., Ito, T., Kohda, D. and Sumimoto, H. (2003). Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4474-4479.
- Akira, S. (2006). TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* **311**, 1-16.
- Al Tuwaijri, A.S., al Mofleh, I.A. and Mahmoud, A.A. (1990). Effect of *Leishmania major* on human polymorphonuclear leucocyte function in vitro. *J Med Microbiol* **32**, 189-193.
- Alghamdi, A.S. and Foster, D.N. (2005). Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. *Biol Reprod* **73**, 1174-1181.
- Allen, L.A., DeLeo, F.R., Gallois, A., Toyoshima, S., Suzuki, K. and Nauseef, W.M. (1999). Transient association of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunits p47phox and p67phox with phagosomes in neutrophils from patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Blood* **93**, 3521-3530.
- Allen, L.A. and McCaffrey, R.L. (2007). To activate or not to activate: distinct strategies used by *Helicobacter pylori* and *Francisella tularensis* to modulate the NADPH oxidase and survive in human neutrophils. *Immunol Rev* **219**, 103-117.
- Alvar, J., Yactayo, S. and Bern, C. (2006). Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* **22**, 552-557.
- Andrade, Z.A., Reed, S.G., Roters, S.B. and Sadigursky, M. (1984). Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol* **114**, 137-148.
- Athens, J.W., Haab, O.P., Raab, S.O., Mauer, A.M., Ashenbrucker, H., Cartwright, G.E. and Wintrobe, M.M. (1961a). Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J Clin Invest* **40**, 989-995.
- Athens, J.W., Raab, S.O., Haab, O.P., Mauer, A.M., Ashenbrucker, H., Cartwright, G.E. and Wintrobe, M.M. (1961b). Leukokinetic studies. III. The distribution of granulocytes in the blood of normal subjects. *J Clin Invest* **40**, 159-164.
- Bainton, D.F. and Farquhar, M.G. (1966). Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. Two types derived from opposite faces of the Golgi complex in developing granulocytes. *J Cell Biol* **28**, 277-301.

- Bainton, D.F., Ulliyot, J.L. and Farquhar, M.G. (1971). The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med* **134**, 907-934.
- Barreda, D.R., Hanington, P.C. and Belosevic, M. (2004). Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol* **28**, 509-554.
- Beil, W.J., Meinardus-Hager, G., Neugebauer, D.C. and Sorg, C. (1992). Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J Leukoc Biol* **52**, 135-142.
- Beiter, K., Wartha, F., Albiger, B., Normark, S., Zychlinsky, A. and Henriques-Normark, B. (2006). An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* **16**, 401-407.
- Belaouaj, A., McCarthy, R., Baumann, M., Gao, Z., Ley, T.J., Abraham, S.N. and Shapiro, S.D. (1998). Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med* **4**, 615-618.
- Beverley, S.M. and Turco, S.J. (1998). Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. *Trends Microbiol* **6**, 35-40.
- Bhowmick, S., Ravindran, R. and Ali, N. (2008). gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* **76**, 1003-1015.
- Borregaard, N. and Cowland, J.B. (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* **89**, 3503-3521.
- Borregaard, N., Lollike, K., Kjeldsen, L., Sengelov, H., Bastholm, L., Nielsen, M.H. and Bainton, D.F. (1993). Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol* **51**, 187-198.
- Borregaard, N. and Tauber, A.I. (1984). Subcellular localization of the human neutrophil NADPH oxidase. b-Cytochrome and associated flavoprotein. *J Biol Chem* **259**, 47-52.
- Bouvier, J., Etges, R. and Bordier, C. (1987). Identification of the promastigote surface protease in seven species of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **24**, 73-79.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., et al. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532-1535.
- Brinkmann, V. and Zychlinsky, A. (2007). Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* **5**, 577-582.

- Brittingham, A., Chen, G., McGwire, B.S., Chang, K.P. and Mosser, D.M. (1999). Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infect Immun* **67**, 4477-4484.
- Brittingham, A., Morrison, C.J., McMaster, W.R., McGwire, B.S., Chang, K.P. and Mosser, D.M. (1995). Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol* **155**, 3102-3111.
- Buchanan, J.T., Simpson, A.J., Aziz, R.K., Liu, G.Y., Kristian, S.A., Kotb, M., et al. (2006). DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* **16**, 396-400.
- Butcher, B.A., Turco, S.J., Hilty, B.A., Pimenta, P.F., Panunzio, M. and Sacks, D.L. (1996). Deficiency in beta1,3-galactosyltransferase of a *Leishmania major* lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania*-sand fly interaction. *J Biol Chem* **271**, 20573-20579.
- Capul, A.A., Barron, T., Dobson, D.E., Turco, S.J. and Beverley, S.M. (2007). Two functionally divergent UDP-Gal nucleotide sugar transporters participate in phosphoglycan synthesis in *Leishmania major*. *J Biol Chem* **282**, 14006-14017.
- Cartwright, G.E., Athens, J.W. and Wintrobe, M.M. (1964). The Kinetics of Granulopoiesis in Normal Man. *Blood* **24**, 780-803.
- Carver, M.A. and Turco, S.J. (1992). Biosynthesis of lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*: characterization of mannosylphosphate transfer in vitro. *Arch Biochem Biophys* **295**, 309-317.
- Cham, B.P., Gerrard, J.M. and Bainton, D.F. (1994). Granulophysin is located in the membrane of azurophilic granules in human neutrophils and mobilizes to the plasma membrane following cell stimulation. *Am J Pathol* **144**, 1369-1380.
- Chang, K.P. (1981). Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Am J Trop Med Hyg* **30**, 322-333.
- Chapple, D.S., Mason, D.J., Joannou, C.L., Odell, E.W., Gant, V. and Evans, R.W. (1998). Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype O111. *Infect Immun* **66**, 2434-2440.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., et al. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* **5**, 873-882.

- Charmoy, M., Megnekou, R., Allenbach, C., Zweifel, C., Perez, C., Monnat, K., *et al.* (2007). *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *J Leukoc Biol* **82**, 288-299.
- Chavakis, T., Keiper, T., Matz-Westphal, R., Hersemeyer, K., Sachs, U.J., Nawroth, P.P., *et al.* (2004). The junctional adhesion molecule-C promotes neutrophil transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **279**, 55602-55608.
- Chen, L., Zhang, Z.H., Watanabe, T., Yamashita, T., Kobayakawa, T., Kaneko, A., *et al.* (2005). The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. *Parasitol Int* **54**, 109-118.
- Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., *et al.* (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* **13**, 463-469.
- Clohessy, P.A. and Golden, B.E. (1995). Calprotectin-mediated zinc chelation as a biostatic mechanism in host defence. *Scand J Immunol* **42**, 551-556.
- Culley, F.J., Harris, R.A., Kaye, P.M., McAdam, K.P. and Raynes, J.G. (1996). C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages. *J Immunol* **156**, 4691-4696.
- Daley, J.M., Thomay, A.A., Connolly, M.D., Reichner, J.S. and Albina, J.E. (2008). Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* **83**, 64-70.
- Dermine, J.F., Goyette, G., Houde, M., Turco, S.J. and Desjardins, M. (2005). *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cell Microbiol* **7**, 1263-1270.
- Dermine, J.F., Scianimanico, S., Prive, C., Descoteaux, A. and Desjardins, M. (2000). *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol* **2**, 115-126.
- Descoteaux, A., Avila, H.A., Zhang, K., Turco, S.J. and Beverley, S.M. (2002). *Leishmania* LPG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability. *EMBO J* **21**, 4458-4469.
- Descoteaux, A., Luo, Y., Turco, S.J. and Beverley, S.M. (1995). A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. *Science* **269**, 1869-1872.
- Descoteaux, A., Turco, S.J., Sacks, D.L. and Matlashewski, G. (1991). *Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. *J Immunol* **146**, 2747-2753.

- Desjardins, M. and Descoteaux, A. (1997). Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med* **185**, 2061-2068.
- Di Carlo, F.J. and Fiore, J.V. (1958). On the composition of zymosan. *Science* **127**, 756-757.
- Eddy, R.J., Pierini, L.M. and Maxfield, F.R. (2002). Microtubule asymmetry during neutrophil polarization and migration. *Mol Biol Cell* **13**, 4470-4483.
- Egesten, A., Breton-Gorius, J., Guichard, J., Gullberg, U. and Olsson, I. (1994). The heterogeneity of azurophil granules in neutrophil promyelocytes: immunogold localization of myeloperoxidase, cathepsin G, elastase, proteinase 3, and bactericidal/permeability increasing protein. *Blood* **83**, 2985-2994.
- Eggleton, P., Fisher, D. and Crawford, N. (1992). Heterogeneity in the circulating neutrophil pool: studies on subpopulations separated by continuous flow electrophoresis. *J Leukoc Biol* **51**, 617-625.
- Eggleton, P., Wang, L., Penhallow, J., Crawford, N. and Brown, K.A. (1995). Differences in oxidative response of subpopulations of neutrophils from healthy subjects and patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **54**, 916-923.
- Ermert, D., Urban, C.F., Laube, B., Goosmann, C., Zychlinsky, A. and Brinkmann, V. (2009). Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *J Innate Immun.* **1**, 181-193.
- Etges, R., Bouvier, J. and Bordier, C. (1986). The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *J Biol Chem* **261**, 9098-9101.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Frasch, S.C., Warner, M.L. and Henson, P.M. (1998a). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* **5**, 551-562.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y. and Henson, P.M. (1998b). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* **101**, 890-898.
- Faurschou, M. and Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* **5**, 1317-1327.
- Forget, G., Matte, C., Siminovitch, K.A., Rivest, S., Pouliot, P. and Olivier, M. (2005). Regulation of the *Leishmania*-induced innate inflammatory response by the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Eur J Immunol* **35**, 1906-1917.

- Frommel, T.O., Button, L.L., Fujikura, Y. and McMaster, W.R. (1990). The major surface glycoprotein (GP63) is present in both life stages of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **38**, 25-32.
- Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., et al. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* **176**, 231-241.
- Gallin, J.I. (1984). Human neutrophil heterogeneity exists, but is it meaningful? *Blood* **63**, 977-983.
- Garrood, T., Lee, L. and Pitzalis, C. (2006). Molecular mechanisms of cell recruitment to inflammatory sites: general and tissue-specific pathways. *Rheumatology (Oxford)* **45**, 250-260.
- Giorgione, J.R., Turco, S.J. and Epand, R.M. (1996). Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11634-11639.
- Gomez, M.A., Contreras, I., Halle, M., Tremblay, M.L., McMaster, R.W. and Olivier, M. (2009). *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Sci Signal* **2**, ra58.
- Green, P.J., Feizi, T., Stoll, M.S., Thiel, S., Prescott, A. and McConville, M.J. (1994). Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannose-binding protein. *Mol Biochem Parasitol* **66**, 319-328.
- Grinberg, N., Elazar, S., Rosenshine, I. and Shpigel, N.Y. (2008). Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **76**, 2802-2807.
- Groemping, Y. and Rittinger, K. (2005). Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J* **386**, 401-416.
- Gueirard, P., Laplante, A., Rondeau, C., Milon, G. and Desjardins, M. (2008). Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cell Microbiol* **10**, 100-111.
- Guimaraes-Costa, A.B., Nascimento, M.T., Froment, G.S., Soares, R.P., Morgado, F.N., Conceicao-Silva, F. and Saraiva, E.M. (2009). *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6748-6753.

- Gullberg, U., Andersson, E., Garwicz, D., Lindmark, A. and Olsson, I. (1997). Biosynthesis, processing and sorting of neutrophil proteins: insight into neutrophil granule development. *Eur J Haematol* **58**, 137-153.
- Halle, M., Gomez, M.A., Stuible, M., Shimizu, H., McMaster, W.R., Olivier, M. and Tremblay, M.L. (2009). The *Leishmania* surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation. *J Biol Chem* **284**, 6893-6908.
- Hatzigeorgiou, D.E., Geng, J., Zhu, B., Zhang, Y., Liu, K., Rom, W.N., et al. (1996). Lipophosphoglycan from *Leishmania* suppresses agonist-induced interleukin 1 beta gene expression in human monocytes via a unique promoter sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14708-14713.
- Heyworth, P.G., Curnutte, J.T., Nauseef, W.M., Volpp, B.D., Pearson, D.W., Rosen, H. and Clark, R.A. (1991). Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. *J Clin Invest* **87**, 352-356.
- Hirsch, J.G. (1958). Bactericidal action of histone. *J Exp Med* **108**, 925-944.
- Holm, A., Tejle, K., Gunnarsson, T., Magnusson, K.E., Descoteaux, A. and Rasmusson, B. (2003). Role of protein kinase C alpha for uptake of unopsonized prey and phagosomal maturation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 653-658.
- Holm, A., Tejle, K., Magnusson, K.E., Descoteaux, A. and Rasmusson, B. (2001). *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation. *Cell Microbiol* **3**, 439-447.
- Huang, C. and Turco, S.J. (1993). Defective galactofuranose addition in lipophosphoglycan biosynthesis in a mutant of *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* **268**, 24060-24066.
- Ilg, T. (2000). Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. *EMBO J* **19**, 1953-1962.
- Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., et al. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**, 436-442.
- Jaafari, M.R., Ghafarian, A., Farrokh-Gisour, A., Samiei, A., Kheiri, M.T., Mahboudi, F., et al. (2006). Immune response and protection assay of recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) reconstituted with liposomes in BALB/c mice. *Vaccine* **24**, 5708-5717.

- Jaffe, C.L. and Dwyer, D.M. (2003). Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* and insect trypanosomatids. *Parasitol Res* **91**, 229-237.
- Jochim, R.C. and Teixeira, C. (2009). *Leishmania* commandeers the host inflammatory response through neutrophils. *Trends Parasitol* **25**, 145-147.
- John, B. and Hunter, C.A. (2008). Immunology. Neutrophil soldiers or Trojan Horses? *Science* **321**, 917-918.
- Joshi, P.B., Kelly, B.L., Kamhawi, S., Sacks, D.L. and McMaster, W.R. (2002). Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol Biochem Parasitol* **120**, 33-40.
- Kawai, T. and Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ* **13**, 816-825.
- Killmann, S.A., Cronkite, E.P., Fliedner, T.M. and Bond, V.P. (1962). Mitotic indices of human bone marrow cells. I. Number and cytologic distribution of mitoses. *Blood* **19**, 743-750.
- Kinashi, T. (2005). Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **5**, 546-559.
- Klempner, M.S. and Gallin, J.I. (1978). Separation and functional characterization of human neutrophil subpopulations. *Blood* **51**, 659-669.
- Kobayashi, S.D., Voyich, J.M., Burlak, C. and DeLeo, F.R. (2005). Neutrophils in the innate immune response. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **53**, 505-517.
- Kropf, P., Freudenberg, M.A., Modolell, M., Price, H.P., Herath, S., Antoniazi, S., et al. (2004a). Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun* **72**, 1920-1928.
- Kropf, P., Freudenberg, N., Kalis, C., Modolell, M., Herath, S., Galanos, C., et al. (2004b). Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNCr mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication. *J Leukoc Biol* **76**, 48-57.
- Kulkarni, M.M., Jones, E.A., McMaster, W.R. and McGwire, B.S. (2008). Fibronectin binding and proteolytic degradation by *Leishmania* and effects on macrophage activation. *Infect Immun* **76**, 1738-1747.
- Kulkarni, M.M., McMaster, W.R., Kamysz, E., Kamysz, W., Engman, D.M. and McGwire, B.S. (2006). The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Mol Microbiol* **62**, 1484-1497.

- Kumagai, Y., Takeuchi, O. and Akira, S. (2008). Pathogen recognition by innate receptors. *J Infect Chemother* **14**, 86-92.
- Laskay, T., van Zandbergen, G. and Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol* **11**, 210-214.
- Laskay, T., van Zandbergen, G. and Solbach, W. (2008). Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology* **213**, 183-191.
- Laufs, H., Muller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J.C., et al. (2002). Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun* **70**, 826-835.
- Laurenti, M.D., Corbett, C.E., Sotto, M.N., Sinhorini, I.L. and Goto, H. (1996). The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host-parasite interaction in hamsters inoculated with *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi. *Int J Exp Pathol* **77**, 15-24.
- Lekstrom-Himes, J.A. and Gallin, J.I. (2000). Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med* **343**, 1703-1714.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983.
- Lerner, E.A., Iuga, A.O. and Reddy, V.B. (2007). Maxadilan, a PAC1 receptor agonist from sand flies. *Peptides* **28**, 1651-1654.
- Lima, G.M., Vallochi, A.L., Silva, U.R., Bevilacqua, E.M., Kiffer, M.M. and Abrahamsohn, I.A. (1998). The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. *Immunol Lett* **64**, 145-151.
- Liu, D., Kebaier, C., Pakpour, N., Capul, A.A., Beverley, S.M., Scott, P. and Uzonna, J.E. (2009). *Leishmania major* phosphoglycans influence the host early immune response by modulating dendritic cell functions. *Infect Immun* **77**, 3272-3283.
- Lodge, R. and Descoteaux, A. (2005a). *Leishmania donovani* promastigotes induce periphagosomal F-actin accumulation through retention of the GTPase Cdc42. *Cell Microbiol* **7**, 1647-1658.
- Lodge, R. and Descoteaux, A. (2005b). Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clin Immunol* **114**, 256-265.

- Lodge, R., Diallo, T.O. and Descoteaux, A. (2006). *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol* **8**, 1922-1931.
- Loomans, H.J., Hahn, B.L., Li, Q.Q., Phadnis, S.H. and Sohnle, P.G. (1998). Histidine-based zinc-binding sequences and the antimicrobial activity of calprotectin. *J Infect Dis* **177**, 812-814.
- Ma, A.C. and Kubes, P. (2008). Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *J Thromb Haemost* **6**, 415-420.
- Ma, D., Russell, D.G., Beverley, S.M. and Turco, S.J. (1997). Golgi GDP-mannose uptake requires Leishmania LPG2. A member of a eukaryotic family of putative nucleotide-sugar transporters. *J Biol Chem* **272**, 3799-3805.
- Mahoney, A.B., Sacks, D.L., Saraiva, E., Modi, G. and Turco, S.J. (1999a). Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. *Biochemistry* **38**, 9813-9823.
- Mahoney, A.B. and Turco, S.J. (1999b). Characterization of the glucosyltransferases that assemble the side chains of the Indian *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Arch Biochem Biophys* **372**, 367-374.
- Mantovani, A., Bussolino, F. and Dejana, E. (1992). Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J* **6**, 2591-2599.
- Matte, C., Marquis, J.F., Blanchette, J., Gros, P., Faure, R., Posner, B.I. and Olivier, M. (2000). Peroxovanadium-mediated protection against murine leishmaniasis: role of the modulation of nitric oxide. *Eur J Immunol* **30**, 2555-2564.
- Mayer-Scholl, A., Averhoff, P. and Zychlinsky, A. (2004). How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol* **7**, 62-66.
- McConville, M.J. and Blackwell, J.M. (1991). Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J Biol Chem* **266**, 15170-15179.
- McConville, M.J., Collidge, T.A., Ferguson, M.A. and Schneider, P. (1993a). The glycoinositol phospholipids of *Leishmania mexicana* promastigotes. Evidence for the presence of three distinct pathways of glycolipid biosynthesis. *J Biol Chem* **268**, 15595-15604.
- McConville, M.J. and Ferguson, M.A. (1993b). The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J* **294** (Pt 2), 305-324.

- McConville, M.J., Schnur, L.F., Jaffe, C. and Schneider, P. (1995). Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem J* **310** (Pt 3), 807-818.
- McConville, M.J., Turco, S.J., Ferguson, M.A. and Sacks, D.L. (1992). Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J* **11**, 3593-3600.
- McFarlane, E., Perez, C., Charmoy, M., Allenbach, C., Carter, K.C., Alexander, J. and Tacchini-Cottier, F. (2008). Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* **76**, 532-541.
- McGwire, B.S., Chang, K.P. and Engman, D.M. (2003). Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infect Immun* **71**, 1008-1010.
- McGwire, B.S., O'Connell, W.A., Chang, K.P. and Engman, D.M. (2002). Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. *J Biol Chem* **277**, 8802-8809.
- McNeely, T.B., Rosen, G., Londner, M.V. and Turco, S.J. (1989). Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochem J* **259**, 601-604.
- Meagher, L.C., Savill, J.S., Baker, A., Fuller, R.W. and Haslett, C. (1992). Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B₂. *J Leukoc Biol* **52**, 269-273.
- Medeiros, M.M., Peixoto, J.R., Oliveira, A.C., Cardilo-Reis, L., Koatz, V.L., Van Kaer, L., et al. (2007). Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent proinflammatory and immunomodulatory properties of the glycoinositolphospholipid (GIPL) from *Trypanosoma cruzi*. *J Leukoc Biol* **82**, 488-496.
- Medina-Acosta, E., Karess, R.E., Schwartz, H. and Russell, D.G. (1989). The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. *Mol Biochem Parasitol* **37**, 263-273.
- Medina, E. (2009). Neutrophil Extracellular Traps: A strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. *J Innate Immun* **1**, 176-180.

- Mengeling, B.J., Zilberstein, D. and Turco, S.J. (1997). Biosynthesis of *Leishmania* lipophosphoglycan: solubilization and partial characterization of the initiating mannosylphosphoryltransferase. *Glycobiology* **7**, 847-853.
- Monteiro, M.C., Nogueira, L.G., Almeida Souza, A.A., Ribeiro, J.M., Silva, J.S. and Cunha, F.Q. (2005). Effect of salivary gland extract of *Leishmania* vector, *Lutzomyia longipalpis*, on leukocyte migration in OVA-induced immune peritonitis. *Eur J Immunol* **35**, 2424-2433.
- Moore, K.L., Patel, K.D., Bruehl, R.E., Li, F., Johnson, D.A., Lichenstein, H.S., et al. (1995). P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol* **128**, 661-671.
- Morris, R.V., Shoemaker, C.B., David, J.R., Lanzaro, G.C. and Titus, R.G. (2001). Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol* **167**, 5226-5230.
- Mukhopadhyay, S. and Mandal, C. (2006). Glycobiology of *Leishmania donovani*. *Indian J Med Res* **123**, 203-220.
- Mukhopadhyay, S., Sen, P., Bhattacharyya, S., Majumdar, S. and Roy, S. (1999). Immunoprophylaxis and immunotherapy against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine* **17**, 291-300.
- Muller, K., van Zandbergen, G., Hansen, B., Laufs, H., Jahnke, N., Solbach, W. and Laskay, T. (2001). Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol* **190**, 73-76.
- Murthy, A.R., Lehrer, R.I., Harwig, S.S. and Miyasaki, K.T. (1993). In vitro candidastatic properties of the human neutrophil calprotectin complex. *J Immunol* **151**, 6291-6301.
- Nauseef, W.M. (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* **219**, 88-102.
- Neeli, I., Dwivedi, N., Khan, S. and Radic, M. (2009). Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun.* **1**, 194-201.
- Neeli, I., Khan, S.N. and Radic, M. (2008). Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J Immunol* **180**, 1895-1902.
- Oliveira, A.C., Peixoto, J.R., de Arruda, L.B., Campos, M.A., Gazzinelli, R.T., Golenbock, D.T., et al. (2004). Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol* **173**, 5688-5696.

- Ostermann, G., Weber, K.S., Zernecke, A., Schroder, A. and Weber, C. (2002). JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol* **3**, 151-158.
- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., et al. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13766-13771.
- Palic, D., Andreasen, C.B., Ostojic, J., Tell, R.M. and Roth, J.A. (2007a). Zebrafish (*Danio rerio*) whole kidney assays to measure neutrophil extracellular trap release and degranulation of primary granules. *J Immunol Methods* **319**, 87-97.
- Palic, D., Ostojic, J., Andreasen, C.B. and Roth, J.A. (2007b). Fish cast NETs: neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Dev Comp Immunol* **31**, 805-816.
- Papayannopoulos, V. and Zychlinsky, A. (2009). NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* **30**, 513-521.
- Parmley, R.T., Rice, W.G., Kinkade, J.M., Jr., Gilbert, C. and Barton, J.C. (1987). Peroxidase-containing microgranules in human neutrophils: physical, morphological, cytochemical, and secretory properties. *Blood* **70**, 1630-1638.
- Pearson, R.D. and Steigbigel, R.T. (1981). Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* **127**, 1438-1443.
- Pearson, R.D., Sullivan, J.A., Roberts, D., Romito, R. and Mandell, G.L. (1983). Interaction of *Leishmania donovani* promastigotes with human phagocytes. *Infect Immun* **40**, 411-416.
- Pelletier, M., Bouchard, A. and Girard, D. (2004). In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J Immunol* **173**, 7521-7530.
- Peters, N.C., Egen, J.G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., et al. (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* **321**, 970-974.
- Peters, N.C. and Sacks, D.L. (2009). The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol* **11**, 1290-1296.
- Pham, C.T. (2006). Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol* **6**, 541-550.
- Pierce, A., Legrand, D. and Mazurier, J. (2009). [Lactoferrin: a multifunctional protein]. *Med Sci (Paris)* **25**, 361-369.

- Pinheiro, R.O., Pinto, E.F., de Matos Guedes, H.L., Filho, O.A., de Mattos, K.A., Saraiva, E.M., *et al.* (2007). Protection against cutaneous leishmaniasis by intranasal vaccination with lipophosphoglycan. *Vaccine* **25**, 2716-2722.
- Prive, C. and Descoteaux, A. (2000). *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *Eur J Immunol* **30**, 2235-2244.
- Proudfoot, L., O'Donnell, C.A. and Liew, F.Y. (1995). Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol* **25**, 745-750.
- Puentes, S.M., Da Silva, R.P., Sacks, D.L., Hammer, C.H. and Joiner, K.A. (1990). Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol* **145**, 4311-4316.
- Ramos-Kichik, V., Mondragon-Flores, R., Mondragon-Castelan, M., Gonzalez-Pozos, S., Muniz-Hernandez, S., Rojas-Espinosa, O., *et al.* (2009). Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* **89**, 29-37.
- Ribeiro-Gomes, F.L., Moniz-de-Souza, M.C., Alexandre-Moreira, M.S., Dias, W.B., Lopes, M.F., Nunes, M.P., *et al.* (2007). Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J Immunol* **179**, 3988-3994.
- Rice, W.G., Ganz, T., Kinkade, J.M., Jr., Selsted, M.E., Lehrer, R.I. and Parmley, R.T. (1987). Defensin-rich dense granules of human neutrophils. *Blood* **70**, 757-765.
- Ritter, U., F. Frischknecht , and G. van Zandbergen (2009). Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitol.* **25**, 505-510.
- Roberts, L.J., Handman, E. and Foote, S.J. (2000). Science, medicine, and the future: Leishmaniasis. *BMJ* **321**, 801-804.
- Rosenthal, E., Delaunay, P., Jeandel, P.Y., Haas, H., Pomares-Estran, C. and Marty, P. (2009). [Liposomal amphotericin B as treatment for visceral leishmaniasis in Europe, 2009]. *Med Mal Infect* **39**, 741-744.
- Russell, D.G. and Wilhelm, H. (1986). The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J Immunol* **136**, 2613-2620.
- Russell, D.G. and Wright, S.D. (1988). Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania* promastigotes. *J Exp Med* **168**, 279-292.

- Sacks, D.L. (1989). Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* **69**, 100-103.
- Sacks, D.L., Modi, G., Rowton, E., Spath, G., Epstein, L., Turco, S.J. and Beverley, S.M. (2000). The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 406-411.
- Sacks, D.L., Pimenta, P.F., McConville, M.J., Schneider, P. and Turco, S.J. (1995). Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* **181**, 685-697.
- Sato, M., Sano, H., Iwaki, D., Kudo, K., Konishi, M., Takahashi, H., et al. (2003). Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *J Immunol* **171**, 417-425.
- Schneider, P., Rosat, J.P., Bouvier, J., Louis, J. and Bordier, C. (1992). *Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Exp Parasitol* **75**, 196-206.
- Scianimanico, S., Desrosiers, M., Dermine, J.F., Meresse, S., Descoteaux, A. and Desjardins, M. (1999). Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell Microbiol* **1**, 19-32.
- Segal, A.W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* **23**, 197-223.
- Segal, B.H., Romani, L. and Puccetti, P. (2009). Chronic granulomatous disease. *Cell Mol Life Sci* **66**, 553-558.
- Seligmann, B., Chused, T.M. and Gallin, J.I. (1981). Human neutrophil heterogeneity identified using flow microfluorometry to monitor membrane potential. *J Clin Invest* **68**, 1125-1131.
- Sengelov, H., Follin, P., Kjeldsen, L., Lollike, K., Dahlgren, C. and Borregaard, N. (1995). Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J Immunol* **154**, 4157-4165.
- Sengelov, H., Kjeldsen, L. and Borregaard, N. (1993). Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol* **150**, 1535-1543.
- Silverman, J.M., J. Clos, C. C. De'oliveira, O. Shirvani, Y. Fang, C. Wang, L. J. Foster, and N. E. Reiner. (2010). An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci.* **123**, 842-852.

- Soares, M.B., Titus, R.G., Shoemaker, C.B., David, J.R. and Bozza, M. (1998). The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *J Immunol* **160**, 1811-1816.
- Soares, R.P., Barron, T., McCoy-Simandle, K., Svobodova, M., Warburg, A. and Turco, S.J. (2004). *Leishmania tropica*: intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different *Phlebotomus* species. *Exp Parasitol* **107**, 105-114.
- Soares, R.P., Cardoso, T.L., Barron, T., Araujo, M.S., Pimenta, P.F. and Turco, S.J. (2005). Leishmania braziliensis: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *Int J Parasitol* **35**, 245-253.
- Soares, R.P., Macedo, M.E., Ropert, C., Gontijo, N.F., Almeida, I.C., Gazzinelli, R.T., et al. (2002). *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Mol Biochem Parasitol* **121**, 213-224.
- Sorensen, A.L., Kharazmi, A. and Nielsen, H. (1989). *Leishmania* interaction with human monocytes and neutrophils: modulation of the chemotactic response. *APMIS* **97**, 754-760.
- Spath, G.F., Epstein, L., Leader, B., Singer, S.M., Avila, H.A., Turco, S.J. and Beverley, S.M. (2000). Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9258-9263.
- Spath, G.F., Garraway, L.A., Turco, S.J. and Beverley, S.M. (2003). The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9536-9541.
- St-Denis, A., Caouras, V., Gervais, F. and Descoteaux, A. (1999). Role of protein kinase C-alpha in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages. *J Immunol* **163**, 5505-5511.
- Steinberg, B.E. and Grinstein, S. (2007). Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci STKE* **2007**, pe11.
- Sumby, P., Barbian, K.D., Gardner, D.J., Whitney, A.R., Welty, D.M., Long, R.D., et al. (2005). Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1679-1684.

- Tacchini-Cottier, F., Zweifel, C., Belkaid, Y., Mukankundiye, C., Vasei, M., Launois, P., *et al.* (2000). An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* **165**, 2628-2636.
- Tachado, S.D., Gerold, P., Schwarz, R., Novakovic, S., McConville, M. and Schofield, L. (1997). Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4022-4027.
- Takeda, K. and Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunopharmacol* **17**, 1-14.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., *et al.* (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunopharmacol* **13**, 933-940.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., *et al.* (1999). TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* **231**, 59-65.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., *et al.* (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* **169**, 10-14.
- Talamas-Rohana, P., Wright, S.D., Lennartz, M.R. and Russell, 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.
- Teixeira, C.R., Teixeira, M.J., Gomes, R.B., Santos, C.S., Andrade, B.B., Raffaele-Netto, I., *et al.* (2005). Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *J Immunol* **175**, 8346-8353.
- Thiakaki, M., Kolli, B., Chang, K.P. and Soteriadou, K. (2006). Down-regulation of gp63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice. *Microbes Infect* **8**, 1455-1463.
- Tolson, D.L., Turco, S.J. and Pearson, T.W. (1990). Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* **58**, 3500-3507.
- Turco, S.J. and Descoteaux, A. (1992). The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* **46**, 65-94.

- Urban, C.F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., *et al.* (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **5**, e1000639.
- Urban, C.F., Lourido, S. and Zychlinsky, A. (2006a). How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol* **8**, 1687-1696.
- Urban, C.F., Reichard, U., Brinkmann, V. and Zychlinsky, A. (2006b). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* **8**, 668-676.
- Uzonna, J.E., Spath, G.F., Beverley, S.M. and Scott, P. (2004). Vaccination with phosphoglycan-deficient *Leishmania major* protects highly susceptible mice from virulent challenge without inducing a strong Th1 response. *J Immunol* **172**, 3793-3797.
- van Zandbergen, G., Hermann, N., Laufs, H., Solbach, W. and Laskay, T. (2002). *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infect Immun* **70**, 4177-4184.
- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W. and Laskay, T. (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* **173**, 6521-6525.
- Vignais, P.V. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1428-1459.
- Vinet, A.F., Fukuda, M., Turco, S.J. and Descoteaux, A. (2009). The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. *PLoS Pathog* **5**, e1000628.
- Vitkov, L., Klappacher, M., Hannig, M. and Krautgartner, W.D. (2009). Extracellular neutrophil traps in periodontitis. *J Periodontal Res* **44**, 664-672.
- Walker, M.J., Hollands, A., Sanderson-Smith, M.L., Cole, J.N., Kirk, J.K., Henningham, A., *et al.* (2007). DNase Sd1 provides selection pressure for a switch to invasive group A streptococcal infection. *Nat Med* **13**, 981-985.
- Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., *et al.* (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol* **184**, 205-213.

- Wardini, A.B., Guimaraes-Costa, A.B., Nascimento, M.T., Nadaes, N.R., Danelli, M.D., Mazur, C., et al. (2009). Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally-infected with the feline leukemia virus (FeLV). *J Gen Virol.*
- Wartha, F., Beiter, K., Albiger, B., Fernebro, J., Zychlinsky, A., Normark, S. and Henriques-Normark, B. (2007a). Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol* **9**, 1162-1171.
- Wartha, F., Beiter, K., Normark, S. and Henriques-Normark, B. (2007b). Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **10**, 52-56.
- Weinrauch, Y., Drujan, D., Shapiro, S.D., Weiss, J. and Zychlinsky, A. (2002). Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* **417**, 91-94.
- Weiss, D.S., Raupach, B., Takeda, K., Akira, S. and Zychlinsky, A. (2004). Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *J Immunol* **172**, 4463-4469.
- Welte, K. and Boxer, L.A. (1997). Severe chronic neutropenia: pathophysiology and therapy. *Semin Hematol* **34**, 267-278.
- Welte, K. and Dale, D. (1996). Pathophysiology and treatment of severe chronic neutropenia. *Ann Hematol* **72**, 158-165.
- Wilson, M.E., Innes, D.J., Sousa, A.D. and Pearson, R.D. (1987). Early histopathology of experimental infection with *Leishmania donovani* in hamsters. *J Parasitol* **73**, 55-63.
- Wimley, W.C., Selsted, M.E. and White, S.H. (1994). Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci* **3**, 1362-1373.
- Winberg, M.E., Holm, A., Sarndahl, E., Vinet, A.F., Descoteaux, A., Magnusson, K.E., et al. (2009). *Leishmania donovani* lipophosphoglycan inhibits phagosomal maturation via action on membrane rafts. *Microbes Infect* **11**, 215-222.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P. and Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* **80**, 617-653.
- Yao, C., Leidal, K.G., Brittingham, A., Tarr, D.E., Donelson, J.E. and Wilson, M.E. (2002). Biosynthesis of the major surface protease GP63 of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* **121**, 119-128.

- Yost, C.C., Cody, M.J., Harris, E.S., Thornton, N.L., McInturff, A.M., Martinez, M.L., *et al.* (2009). Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood* **113**, 6419-6427.
- Zufferey, R., Allen, S., Barron, T., Sullivan, D.R., Denny, P.W., Almeida, I.C., *et al.* (2003). Ether phospholipids and glycosylinositolphospholipids are not required for amastigote virulence or for inhibition of macrophage activation by *Leishmania major*. *J Biol Chem* **278**, 44708-44718.

VERSION PDF DE L'ARTICLE

The Journal of Immunology

This information is current as
of September 22, 2010

**Leishmania donovani Promastigotes
Evade the Antimicrobial Activity of
Neutrophil Extracellular Traps**

Christelle Gabriel, W. Robert McMaster, Denis Girard
and Albert Descoteaux

J. Immunol. 2010;185;4319-4327; originally published
online Sep 8, 2010;
doi:10.4049/jimmunol.1000893
<http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/185/7/4319>

References

This article cites 50 articles, 22 of which can be accessed free
at: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/185/7/4319#BIBL>

Subscriptions

Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is
online at <http://www.jimmunol.org/subscriptions/>

Permissions

Submit copyright permission requests at
<http://www.aai.org/ji/copyright.html>

Email Alerts

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign
up at <http://www.jimmunol.org/subscriptions/etoc.shtml>



Leishmania donovani Promastigotes Evasive the Antimicrobial Activity of Neutrophil Extracellular Traps

Christelle Gabriel,^{*,†} W. Robert McMaster,^{‡,§} Denis Girard,^{*} and Albert Descoteaux^{*,†}

Upon their recruitment to a site of infection and their subsequent activation, neutrophils release DNA and a subset of their granule content to form filamentous structures, known as neutrophil extracellular traps, which capture and kill microorganisms. In this study, we show that *Leishmania* promastigotes induced the rapid release of neutrophil extracellular traps from human neutrophils and were trapped by these structures. The use of *Leishmania* mutants defective in the biosynthesis of either lipophosphoglycan or GP63 revealed that these two major surface promastigote virulence determinants were not responsible for inducing the release of the surface protease neutrophil extracellular traps. We also demonstrate that this induction was independent of superoxide production by neutrophils. Finally, in contrast to wild-type *Leishmania donovani* promastigotes, mutants defective in lipophosphoglycan biosynthesis were highly susceptible to the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. Altogether, our data suggest that neutrophil extracellular traps may contribute to the containment of *L. donovani* promastigotes at the site of inoculation, thereby facilitating their uptake by mononuclear phagocytes. *The Journal of Immunology*, 2010, 185: 4319–4327.

PROTOZOAN parasites of the genus *Leishmania* infect millions of people worldwide, causing leishmaniasis, a spectrum of clinical manifestations that range from self-healing ulcers to potentially fatal visceral leishmaniasis. Transmission of the parasite is mediated by the blood-sucking sand fly of either the genus *Phlebotomus* or the genus *Lutzomyia*. Upon feeding, infected sand flies inoculate infective promastigote forms into the mammalian host, where they evade and resist nonspecific defense mechanisms, such as complement-mediated lysis, to ultimately enter mononuclear phagocytes by a receptor-mediated process. After their uptake by macrophages, promastigotes of *Leishmania donovani* and *Leishmania major* inhibit phagolysosome biogenesis to evade the microbicidal phagolysosomal environment (1–5). This inhibition is mediated by lipophosphoglycan (LPG), an abundant surface virulence glycolipid consisting of a polymer of Galβ1,4Manα1-PO₄ units anchored into the promastigote membrane via an unusual glycosyl phosphatidylinositol (1, 6).

Because neutrophils are rapidly recruited to infection sites, there has been growing evidence for the potential role of these immune cells during the early stages of *Leishmania* promastigotes infection. However, data obtained in various experimental models led to conflicting conclusions regarding the role of neutrophils in experimental leishmaniasis (7). Hence, although several studies indicated that neutrophils contribute to a protective response

against *Leishmania* (8, 9), others provided evidence that internalization of *Leishmania* promastigotes by neutrophils may favor the establishment of infection (10–12). The latter observations lent weight to the concept that apoptotic neutrophils harboring *Leishmania* promastigotes may act as “Trojan horses,” because they are internalized by macrophages (7, 13).

Phagocytosis is the best characterized killing mechanism in neutrophils, whereby microorganisms are efficiently internalized in phagosomes where large amounts of toxic reactive oxygen species (ROS) are generated (14, 15). Furthermore, fusion with various intracellular granules results in the rapid delivery of proteases, antimicrobial peptides, and myeloperoxidase, culminating in the formation of a highly microbicidal phagolysosome (16, 17). The mechanisms by which *Leishmania* promastigotes evade killing by neutrophils may be related to their ability to block the oxidative burst (18) and to enter a nonlytic compartment unable to fuse with lysosomes and displaying endoplasmic reticulum features (10).

Recently, evidence was provided that neutrophils use an additional microbicidal mechanism that consists of the release of structures composed of chromatin and specific granule proteins in response to various stimuli, including IL-8, LPS, bacteria, and fungi (19, 20). These structures, called neutrophil extracellular traps (NETs), form extracellular fibers able to ensnare and kill extracellularly various microorganisms (19, 21–25), possibly through the action of one or several microbicidal proteins associated with these structures in high concentrations (19, 23). Additionally, NETs may also prevent the spread of pathogens by confining microorganisms to the site of infection (26). In this study, we show that although *L. donovani* promastigotes are trapped by NETs released by human neutrophils, they resist their microbicidal activity.

Materials and Methods

Human neutrophils

Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Quebec, Canada). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to institutionally approved procedures. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion, and the purity (>98%) was verified by cytology from cyt centrifuged preparations stained by Diff-Quick staining (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada) (27).

*Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand-Frappier, [†]Center for Host-Parasite Interactions, Laval, Quebec; [‡]Department of Medical Genetics, University of British Columbia; and [§]Immunity and Infection Research Centre, Vancouver Coastal Health Research Institute, Vancouver, British Columbia, Canada

Received for publication March 18, 2010. Accepted for publication August 2, 2010.

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research Grant MOP-12933. A.D. is the holder of a Canada Research Chair, and A.D. and D.G. were Chercheur-Boursier from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. C.G. was partly supported by the Center for Host-Parasite Interactions (Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Albert Descoteaux, Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Quebec, Canada H7V 1B7. E-mail address: albert.descoteaux@iaf.inrs.ca

Abbreviations used in this paper: DPI, diphenyleneiodonium; LPG, lipophosphoglycan; MOI, multiplicity of infection; NET, neutrophil extracellular trap; RLU, relative light unit; ROS, reactive oxygen species; WT, wild-type.

Copyright © 2010 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/10/\$16.00

Parasites

Promastigotes of the *L. donovani* strains 1S and LV9 and the *L. major* strains LV39 and NIH S clone A2 were cultured at 26°C in M199 supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 μM adenine, HEPES, 5 μM hemin, 3 μM biotin, 1 μM biotin, and antibiotics. The *L. donovani* 1S isogenic mutants *lpg1*-KO and *lpg2*-KO were described previously (28). The *lpg1*-KO mutant secretes repeating Galβ1,4Manα1-PO₄-containing molecules but lacks the ability to assemble a functional LPG glycan core (29), precluding synthesis of LPG. The rescued *lpg1*-KO add-back was generated by transfection of the pLeishZeo-LPG1 expression vector. The *lpg2*-KO mutant expresses the truncated LPG Gal(α1,6)Gal(α1,3)Gal(β1,3)[Glc(α1-P)]Man(α1,3)Man(α1,4)GN(α1,6)-PI and does not synthesize repeating Galβ1,4Manα1-PO₄ units (30). The *L. major* NIH S clone A2 isogenic *gp63*-KO mutant and *gp63*-KO add-back were previously described (31). *L. donovani* 1S and *L. major* NIH S clone A2 promastigotes expressing luciferase (32) and *L. donovani* 1S promastigotes expressing GFP (3) were grown in the presence of 50 μg/ml G418 (Life Technologies, Rockville, MD). The *L. donovani* *lpg1*-KO add-back was grown in the presence of 100 μg/ml Zeocin (Invitrogen). Promastigotes were used in the late stationary phase of growth. Unless otherwise stated, promastigotes were opsonized by a 30-min incubation at 37°C in the presence of 10% human C8-deficient serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Confocal immunofluorescence microscopy for the detection and quantification of NETs

Human neutrophils (10⁶ per well) were seeded on poly-L-lysine-coated glass coverslips (BD Biosciences, San Jose, CA) in RPMI 1640 sup-

plemented with 10 mM HEPES, penicillin/streptomycin, and 2% heat-inactivated human serum and were allowed to adhere for 30 min at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. Adherent neutrophils were incubated in the absence or presence of either *Leishmania* promastigotes, zymosan, or LPG-coated zymosan during 10, 30, or 60 min at 37°C. They were then fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich), blocked overnight in blocking solution (PBS with 10% normal goat serum [Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA], 5% cold fish gelatin [Sigma-Aldrich], 1% BSA [Sigma-Aldrich], 0.05% Tween 20 [Sigma-Aldrich]), and incubated with primary Abs either directed against human neutrophil-elastase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or against repeated subunits of LPG (CA7AE Ab). Secondary Abs coupled to Alexa Fluor 568 or 488 (Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, OR) were used to detect primary Abs, and DRAQ5 (Biostatus Limited, Shepshed, Leicestershire, U.K.) was used for DNA labeling. Coverslips were mounted on slides with Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL). Specimens were analyzed with an oil immersion Nikon Plan Apo 100 (Toronto, Ontario, Canada) (numerical aperture 1.4) objective mounted on a Nikon Eclipse E800 microscope equipped with a Bio-Rad Radiance 2000 confocal imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA). Percentages of cells producing NETs were determined by counting at least 100 cells per condition. Neutrophils that release DNA and elastase to form filamentous structures were considered as producing NETs.

Quantification of DNA released from neutrophils

Human neutrophils adhered to poly-L-lysine-coated glass coverslips were incubated with either *Leishmania* promastigotes or zymosan at a multiplicity of infection (MOI) of 10:1 for 30 min in RPMI 1640 supplemented with 10 mM HEPES, penicillin/streptomycin, and 2% heat-inactivated

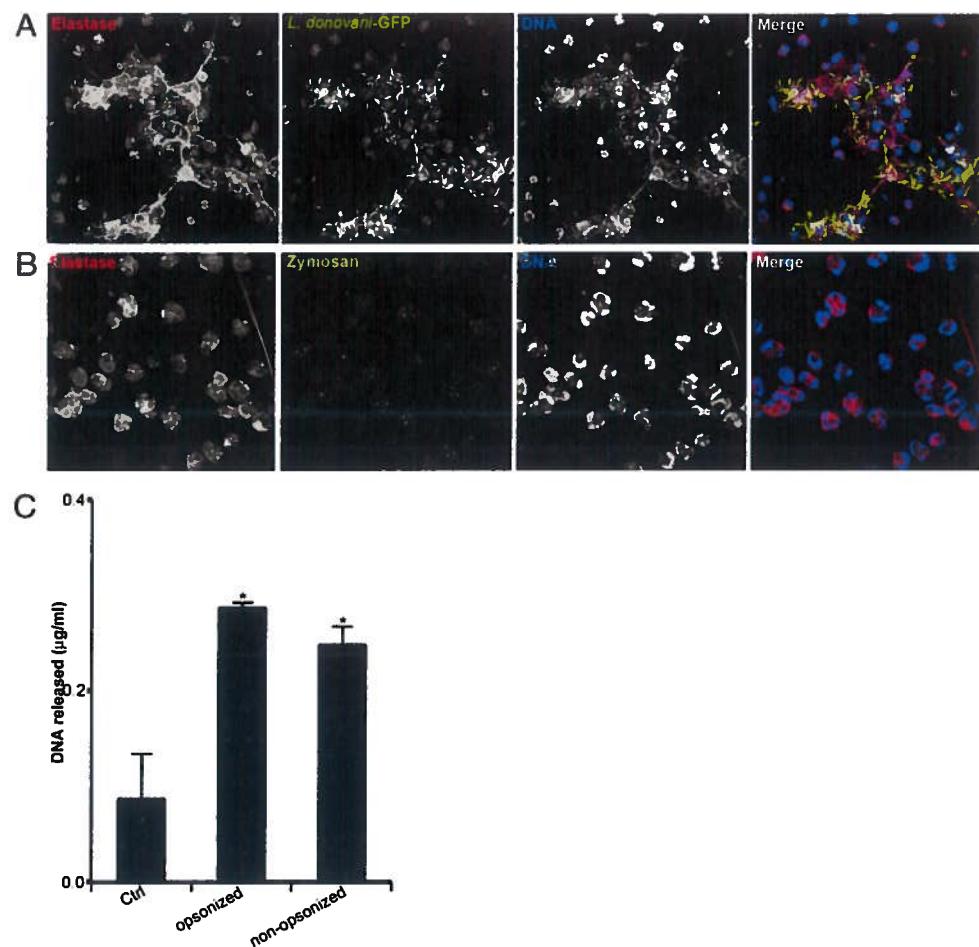


FIGURE 1. Induction of NET by *L. donovani* promastigotes. **A, B**, Freshly isolated human neutrophils were adhered on poly-L-lysine coverslips and incubated for 10 or 30 min with either serum-opsonized *L. donovani*-GFP promastigotes (**A**) or serum-opsonized zymosan (**B**). Samples were fixed and stained for neutrophil-elastase (red) and DNA (blue) (original magnification $\times 100$). **C**, Human neutrophils adhered on poly-L-lysine coverslips were incubated with either serum-opsonized or unopsonized *L. donovani* promastigotes at a parasite-to-cell ratio of 10:1. DNA release was quantified after 30 min of incubation. One representative experiment out of three performed in triplicate is presented as mean \pm SD. * $p \leq 0.01$ compared with control neutrophils.

human serum at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. For neutrophils in suspension, cells were distributed in a 48-well plates in the same culture medium (detailed above) and were incubated with either zymosan or *L. donovani* LV9 promastigotes at a MOI of 10:1 for 120 min at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. Neutrophils in suspension were gently resuspended every 10 min. After incubation, 1 U/ml micrococcal nuclease (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) in the presence of 1 mM Ca²⁺ was added for 1 h at 37°C. The nuclease activity was stopped with 5 mM EDTA, and samples were collected. Released DNA was quantified using the Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen/Molecular Probes). Samples were distributed into 96-well plates and were read in a spectrofluorometer reader (SpectraMax M5; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) with a filter setting of 480 nm (excitation)/520 nm (emission).

Phagocytosis assay in suspension

Human neutrophils (4×10^6 per well) were incubated with serum-opsonized zymosan or with serum-opsonized *L. donovani* LV9 promastigotes at a MOI of 3:1 in a 48-well plate in RPMI 1640 supplemented with 10 mM HEPES, penicillin/streptomycin, and 2% heat-inactivated human serum at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. Cells were gently resuspended every 10 min. After 30 min of incubation, cells were washed with PBS and cytospinned. Cytocentrifuged slides were stained with Diff-Quick, and phagocytosed particles were counted by light microscopy. Each condition was analyzed in triplicate, and at least 100 cells were scored per sample. Results were expressed as the number of ingested particles per 100 neutrophils.

Effect of NETs on Leishmania promastigote survival

Human neutrophils were adhered to poly-L-lysine-coated coverslips (BD Biosciences) in RPMI 1640 supplemented with 10 mM HEPES, penicillin/streptomycin, and 2% heat-inactivated human serum. Cells pretreated or not with DNase-1 (100 U/ml; Worthington Biochemical) were incubated with

luciferase-expressing *L. donovani* 1S or *L. major* NIH S clone A2 promastigotes during 6 h in an incubator at 37°C with 5% CO₂. Controls consisted of promastigotes without neutrophils incubated in the absence or presence of DNase-1. Luciferase activity was measured using a luciferase assay system (Promega, Madison, WI). Briefly, after 6 h of incubation, cells were lysed with 1× Cell Culture Lysis Reagent (Promega, Madison, WI) containing 2× protease inhibitor (Roche, Laval, Canada). Luciferase activity was quantified using a Lumat LB 9507 luminometer (EG&G Berthold, Nashua, NH). *Leishmania* promastigote survival in the presence of human neutrophils was determined as the percentage of control values (luciferase-expressing *Leishmania* promastigotes incubated without neutrophils in presence or not of DNase-1).

Influence of ROS on the induction of NETs by Leishmania promastigotes

Human neutrophils adhered to poly-L-lysine-coated were incubated with the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium (DPI) (5 or 10 μM) or catalase (1000 or 2000 U) for 30 min. *Leishmania* promastigotes were then added, and after 30 min DNA release was quantified.

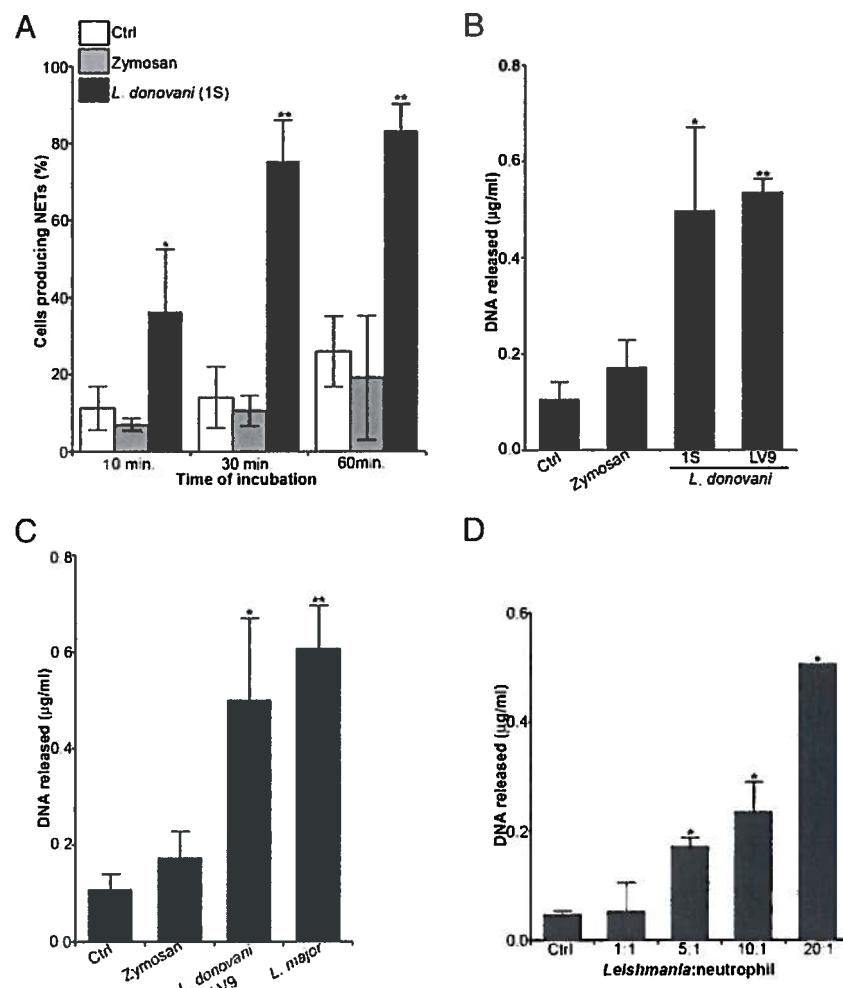
Incubation of neutrophils with Leishmania promastigote supernatant

Human neutrophils adhered to poly-L-lysine-coated coverslips were incubated in the absence or presence of supernatants from *L. donovani* promastigotes in the stationary phase of growth, and after 30 min DNA release was quantified.

Statistical analyses

Each experiment was performed at least with three different blood donors. Comparisons of the means within and between groups were tested with the Student *t* test to determine statistical significance. A *p* value of ≤ 0.05 was considered significant.

FIGURE 2. Different strains and species of *Leishmania* induce NET release in a time- and dose-dependent manner. Human neutrophils adhered on poly-L-lysine coverslips were incubated with either zymosan, *L. donovani* (strains 1S and LV9), or *L. major* (strain LV39) promastigotes at a MOI of 10:1 for A, B, and C or various ratios for D for the indicated time points. A, The percentage of neutrophils producing NETs was quantified for each time point. B–D, Release of DNA was quantified after 30 min. One representative experiment out of three to five performed in triplicates is presented as mean \pm SD in each figure. **p* < 0.05; ***p* \leq 0.005 compared with control neutrophils and neutrophils incubated with zymosan.



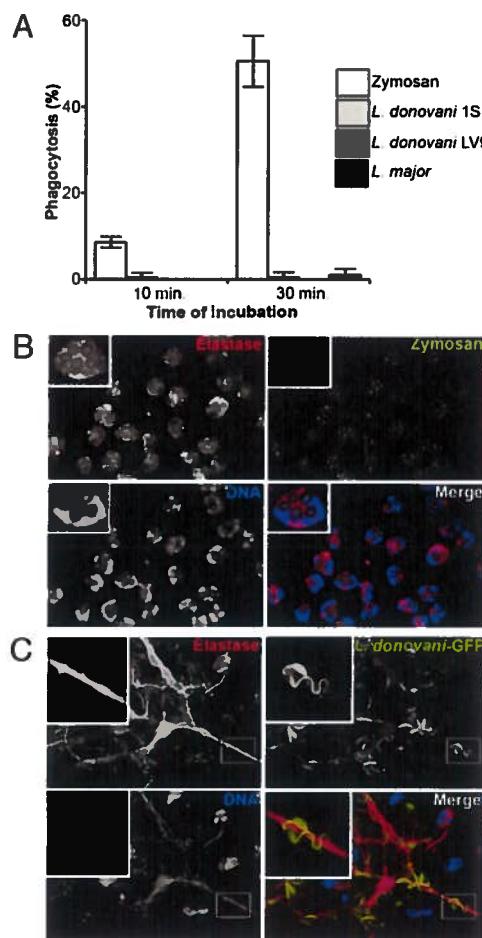


FIGURE 3. *Leishmania* promastigotes are trapped by NETs. Human neutrophils adhered on poly-L-lysine coverslips were incubated with *L. donovani* (1S and LV9 strains), *L. major*, or zymosan for 10 and 30 min at a particle-to-cell ratio of 10:1. *A*, Internalization of *Leishmania* promastigotes or zymosan was determined on at least 100 neutrophils for each condition. The data are the average of two independent experiments performed in triplicate presented as mean \pm SD. *B, C*, Samples were fixed after 30 min and were stained for the neutrophil-elastase (red) and DNA (blue). *L. donovani*-GFP promastigotes are in green (original magnification $\times 100$).

Results

Leishmania promastigotes induce the formation of NETs

To study one aspect of the interaction between *Leishmania* promastigotes and human neutrophils, we assessed the potential of these parasites to induce the formation of NETs. Human neutrophils were incubated for various time points with serum-opsonized *L. donovani*-GFP promastigotes (strain 1S), and the presence of NET was determined by confocal immunofluorescence microscopy. As early as 10 min after the addition of *L. donovani*-GFP promastigotes, neutrophils lost their typical rounded morphology and released NETs, which appear as filamentous structures identified by the presence of DNA and elastase (Fig. 1*A*). NET release appears to be contact-dependent, because we observed these structures only where neutrophils were associated with *L. donovani*-GFP promastigotes (Fig. 1*A*). In contrast, the levels of NET induced by serum-opsonized zymosan (Fig. 1*B*) were similar to the spontaneous baseline of NET release observed with resting neutrophils. We observed no differences between serum-opsonized and unopsonized promastigotes for their ability to induce the formation of NETs, as assessed by quantification of DNA released by neutrophils (Fig. 1*C*). NET formation was time-dependent, with >80% of neutrophils

having released DNA and elastase after 1 h of contact with *L. donovani*-GFP promastigotes (Fig. 2*A*). We also assessed the ability of other *Leishmania* strains and species to induce the formation of NETs by quantifying the amount of DNA released by neutrophils 30 min after the initial contact with the parasites. As shown in Fig. 2*B* and 2*C*, promastigotes from two strains of *L. donovani* (Sudanese 1S and Ethiopian LV9) and the *L. major* strain LV39 induced comparable levels of DNA release. Confocal immunofluorescence microscopy confirmed that these *Leishmania* strains and species induced the formation of NETs (data not shown). Using various ratios of *L. donovani* LV9 promastigotes per neutrophil, we observed that the release of neutrophil DNA was dose-dependent, with a 4-fold increase above baseline levels for a MOI of 5:1 and a 10-fold increase above baseline levels at a MOI of 20:1 (Fig. 2*D*). Similar results were obtained with promastigotes of *L. donovani* 1S and *L. major* LV39 (data not shown).

Leishmania promastigotes are trapped by NETs

Because we observed rapid and massive formation of NETs in response to *Leishmania* promastigotes, we sought to determine the extent of parasite internalization by human neutrophils. Neutrophils adhered to poly-L-lysine-coated coverslips were incubated with either serum-opsonized promastigotes or serum-opsonized zymosan, and internalization was assessed by confocal immunofluorescence microscopy at 10 and 30 min after the addition of the particles. As expected, 8.5 and 50.5% of neutrophils had phagocytosed zymosan at 10 and 30 min, respectively (Fig. 3*A*, 3*B*). In contrast, very low levels of *L. donovani* (both 1S and LV9 strains) or *L. major* promastigotes were found to be internalized by human neutrophils (1%). Phagocytosis of *Leishmania* promastigotes by human neutrophils thus appears to be a rare event in our experimental system. Instead, as shown in Fig. 3*C* for *L. donovani*, promastigotes were found entrapped in NET fibers containing DNA and elastase. Because promastigote-induced NET formation occurred rapidly, it is possible that promastigotes get trapped before neutrophils can internalize them. Because previous studies revealed that *Leishmania* promastigotes are internalized by neutrophils in suspension (10, 18, 33, 34), it was important to assess the extent of *Leishmania* promastigote internalization and NET formation by human neutrophils in suspension. As shown in Fig. 4, we observed significant internalization of *L. donovani* promastigotes by human neutrophils in suspension, although to a lesser extent than zymosan. Importantly, we also found that *L. donovani* promastigotes induced DNA release from human neutrophils in suspension, indicating that NETs are produced under those conditions.

NET release occurs in the absence of the parasite virulence factors LPG and GP63

Given the prominent role of the surface glycolipid LPG in the establishment of *Leishmania* promastigotes inside mammalian hosts (2, 35, 36), we explored the possible role of LPG in the induction of NETs. To this end, we incubated human neutrophils with either wild-type (WT) *L. donovani* promastigotes, the LPG-defective *lpg1*-KO mutant, the Gal β 1,4Mano1-PO $_4$ -defective *lpg2*-KO mutant, or the *lpg2*-KO add-back (*lpg2*-KO + LPG2). At various time points, NET formation was assessed by confocal immunofluorescence microscopy and by quantifying DNA release. Similar to WT promastigotes, both the *lpg1*-KO and the *lpg2*-KO mutants rapidly induced the formation of NETs and the release of DNA (Fig. 5), indicating that neither LPG nor other Gal β 1,4Mano1-PO $_4$ -containing *Leishmania* glycoconjugates were responsible for the induction of NET release by *Leishmania* promastigotes. Of note, we observed morphological differences between NETs induced by WT and LPG-defective mutants at early time points (Fig. 5*C*). Hence, at 10 min, NETs

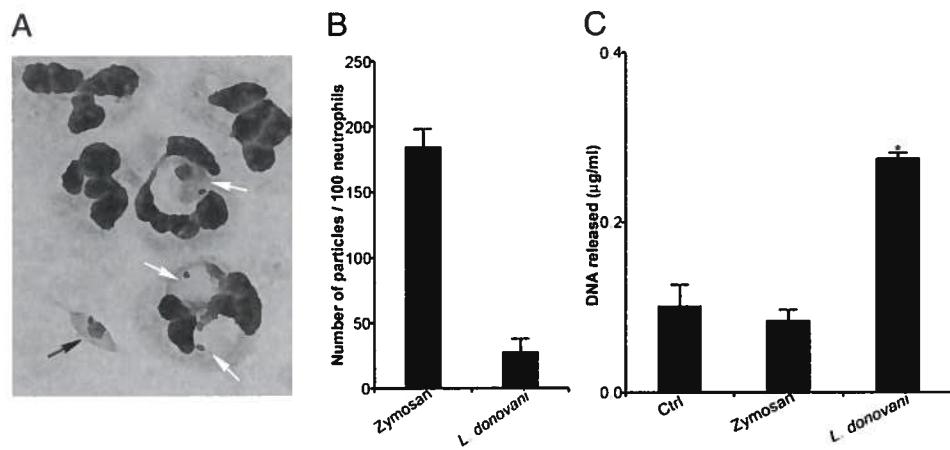


FIGURE 4. *Leishmania* promastigotes are internalized by human neutrophils in suspension and induce NET release. Human neutrophils in suspension were incubated with either serum-opsonized zymosan or serum-opsonized *L. donovani* (LV9) promastigotes at a MOI of 3:1 during 30 min (A, B) or at a MOI of 10:1 during 120 min (C). A, Diff-Quick-stained cytocentrifuge preparation showing internalized (white arrows) or noninternalized (black arrow) *L. donovani* promastigotes (original magnification $\times 100$). B, Internalization of *Leishmania* promastigotes or zymosan was determined on at least 100 neutrophils. C, Release of DNA was quantified after 120 min. One representative experiment out of three to four performed in triplicate is presented as mean \pm SD in each figure. * $p \leq 0.0002$ compared with control neutrophils and neutrophils incubated with zymosan.

induced by *lpg2*-KO promastigotes appeared to form clusters and looked more compact than those induced by WT promastigotes that were more filamentous (Fig. 5C). However, at 1 h after the addition of the promastigotes, NETs induced by both WT and *lpg2*-KO parasites were structurally similar. To confirm that LPG plays no role in

the induction of NET formation, we incubated human neutrophils with either zymosan or zymosan coated with purified LPG and quantified DNA release. As shown in Fig. 6D, neither zymosan nor LPG-coated zymosan induced DNA release from neutrophils. Furthermore, in contrast to promastigotes, LPG-coated zymosan and

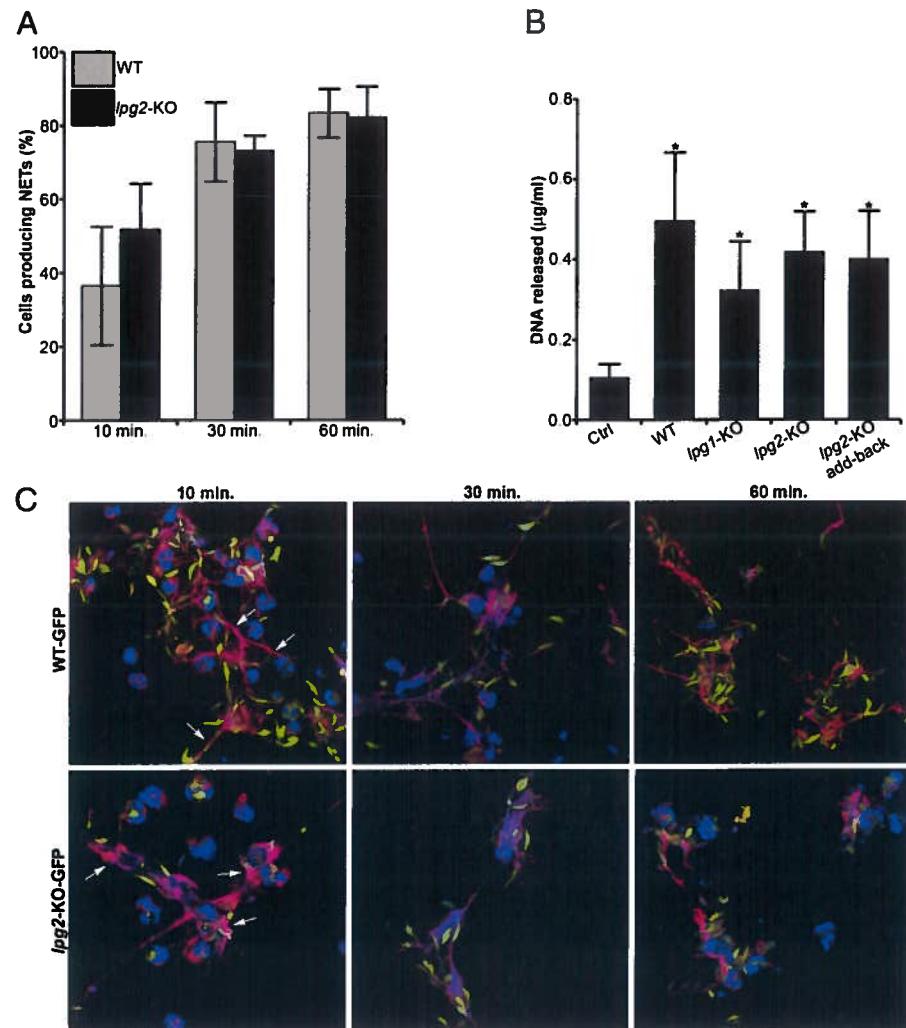


FIGURE 5. Induction of NET release is independent of LPG and other Gal β 1, 4Man α 1-PO $_4$ -containing *L. donovani* glycoconjugates. Human neutrophils adhered on poly-L-lysine coverslips were incubated for 10, 30, and 60 min with either WT, *lpg1*-KO, *lpg2*-KO, or *lpg2*-KO add-back *L. donovani* promastigotes. A, The percentage of neutrophils producing NETs was determined by confocal microscopy. The data are the average of three independent experiments performed in triplicate presented as mean \pm SD. B, Release of DNA was quantified after 30 min. One representative experiment out of three performed in triplicate is presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$ compared with resting neutrophils. C, At the indicated time points, samples were fixed and stained for the neutrophil-elastase (red) and DNA (blue). *L. donovani*-GFP promastigotes are in green (original magnification $\times 100$).

zymosan were equally internalized by human neutrophils (Fig. 6). The surface GPI-anchored metalloproteinase GP63 is another abundant promastigote surface molecule that contributes to the establishment of infection within mammals (31). To assess its possible role in the induction of NET release, we incubated human neutrophils with either WT *L. major* promastigotes, the *gp63*-KO mutant, or the rescued *gp63*-KO add-back. After 30 min of incubation, we assessed NET formation by confocal immunofluorescence, and we quantified the amount of DNA released by the neutrophils. As shown in Fig. 7A, WT, *gp63*-KO and *gp63*-KO add-back *L. major* promastigotes induced similar levels of NETs and DNA release from neutrophils, indicating that GP63 is not responsible for the induction of NET formation by *Leishmania* promastigotes. We also tested whether soluble factors released by promastigotes could induce the release of NET. As shown in Fig. 7B, addition of promastigote-conditioned medium that contains *Leishmania* exosomes (37) to neutrophils did not trigger the release of DNA.

LPG confers L. donovani promastigote resistance to the antimicrobial activity of NETs

Because NETs possess potent antimicrobial activity, we determined the impact of NET release on the viability of *L. donovani* promastigotes. We included *lpgI*-KO *L. donovani* promastigotes

in this assessment, because LPG forms a dense glycocalyx at the promastigote surface that protects the parasite from microbicidal molecules (4). To this end, we incubated human neutrophils with luciferase-expressing *L. donovani* promastigotes (WT, *lpgI*-KO, and the rescued *lpgI*-KO add-back), and we measured luciferase activity after 6 h of incubation. As shown in Fig. 8A, *lpgI*-KO promastigote survival was significantly reduced compared with that of either wild-type or rescued *lpgI*-KO add-back promastigotes. The antimicrobial activity of NET can be abrogated with DNase-1 treatment of neutrophils (19, 38). We thus incubated human neutrophils with luciferase-expressing *L. donovani* WT and *lpgI*-KO promastigotes in the absence or presence of DNase-1, and we measured luciferase activity after 6 h of incubation. As shown in Fig. 8B, *lpgI*-KO promastigote survival was restored in the presence of DNase-1, indicating that LPG confers *L. donovani* promastigotes the ability to resist the microbicidal activity of NET. Of note, resistance to the antimicrobial activity of NET was also observed with *L. major* promastigotes (Fig. 8C).

ROS are not involved in the induction of NETs by Leishmania promastigotes

Previous studies revealed that ROS production is involved in the release of NETs (38, 39). To assess the contribution of ROS in the

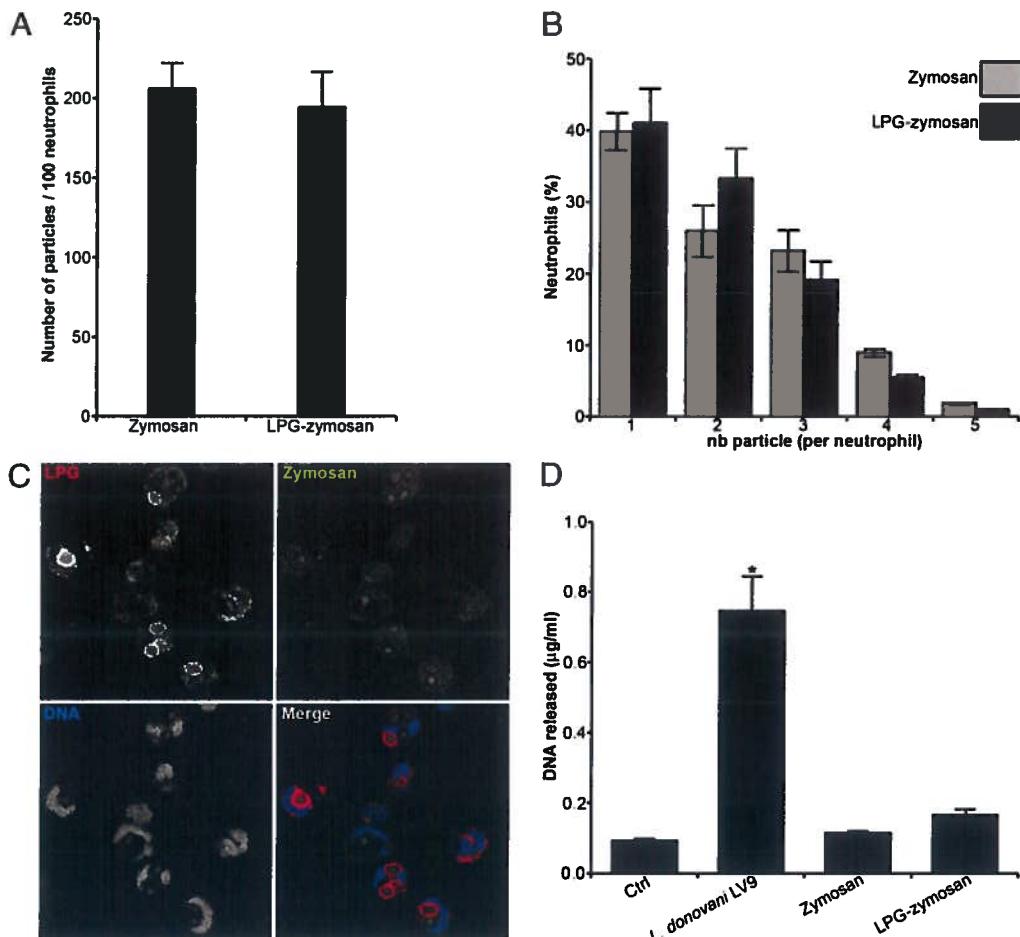


FIGURE 6. LPG does not interfere with phagocytosis in human neutrophils. Human neutrophils adhered on poly-L-lysine coverslips were incubated for 30 min with either zymosan or zymosan coated with purified *L. donovani* LPG at a particle-to-cell ratio of 10:1. *A*, Phagocytosis of zymosan and LPG-coated zymosan was assessed by confocal microscopy by calculating the number of particles per 100 neutrophils. One representative experiment out of three performed in triplicate is presented as mean \pm SD. *B*, The particle distribution per neutrophil was determined on at least 100 cells and expressed as a percentage of neutrophils containing one, two, three, four, or five particles. One representative experiment out of three performed in triplicate is presented as mean \pm SD. *C*, Samples were fixed and stained for LPG (red) and DNA (blue). Zymosan is in green (natural autofluorescence). *D*, Release of DNA was quantified after 30 min. One representative experiment out of three performed in triplicate is presented as mean \pm SD (original magnification $\times 100$). * $p < 0.001$ compared with resting neutrophils.

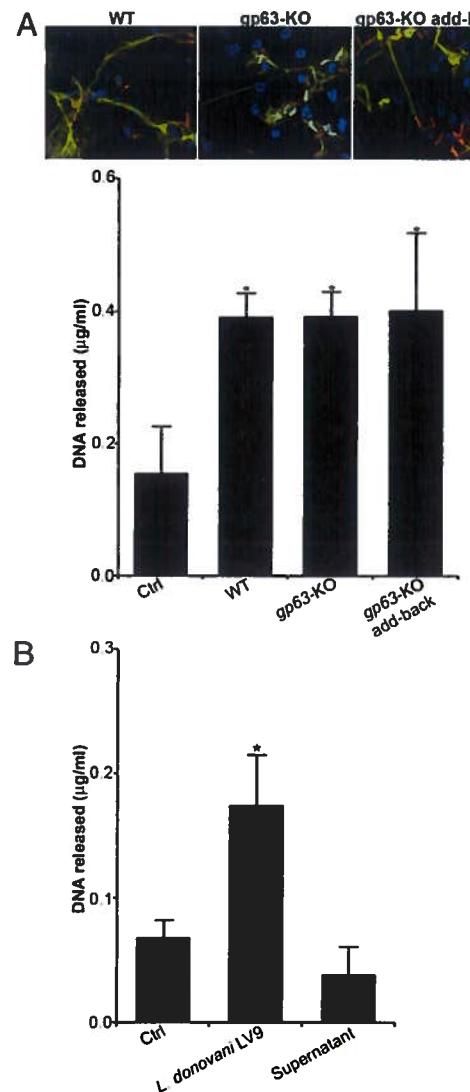


FIGURE 7. NET release is not mediated by GP63 or a secreted factor. Human neutrophils adhered on poly-L-lysine coverslips were incubated for 30 min with either WT, *gp63*-KO, or *gp63*-KO add-back *L. major* promastigotes. *A*, Samples were fixed and stained for the neutrophil-elastase (green), DNA (blue), and *L. major* promastigotes (anti-LPG, red) (upper panel). Release of DNA was quantified after 30 min (lower panel). One representative experiment out of three performed in triplicate is presented as mean \pm SD (original magnification $\times 100$). *B*, Adherent human neutrophils were incubated with either *L. donovani* promastigotes or promastigote-conditioned medium. After 30 min, release of DNA was quantified. Results are the average of three independent experiments performed in triplicate presented as mean \pm SD. * p < 0.05 compared with resting neutrophils.

release of NETs, we incubated neutrophils in the absence or presence of either catalase or DPI before the addition of promastigotes. As shown in Fig. 9, we did not observe any significant effect of the ROS inhibition on the release of NETs induced by *L. donovani* promastigotes, suggesting that a ROS-independent mechanism is involved in this process.

Discussion

In the current study, we report that although *L. donovani* promastigotes induce and are trapped by NETs, the surface glycolipid LPG enables these parasites to resist the microbicidal activity of these structures. The observation that induction of NET release was independent of the promastigote opsonization status suggested that

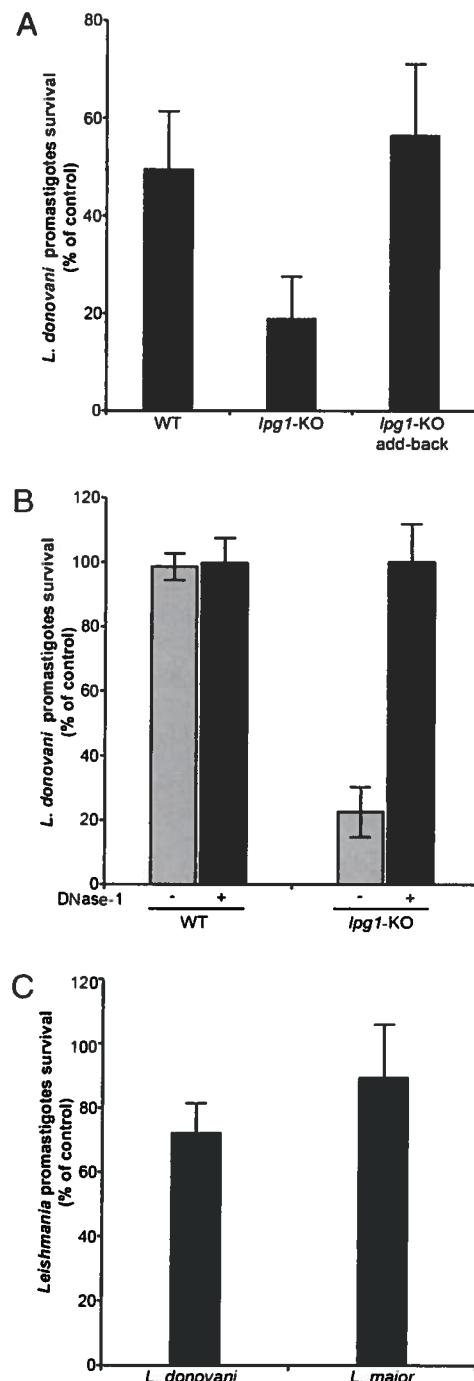


FIGURE 8. *L. donovani* promastigotes are resistant to the antimicrobial activity of NETs. *A*, Human neutrophils adhered on poly-L-lysine coverslips were incubated at a MOI of 10:1 with opsonized *L. donovani* 1S promastigotes (WT, *lpg1*-KO, and rescued *lpg1*-KO add-back) expressing luciferase. After 6 h, promastigote survival was determined by dividing the luciferase activity relative light units (RLUs) in presence of neutrophils by the luciferase activity in the absence of neutrophils. One representative experiment out of four performed in triplicate is presented as mean \pm SD. *B*, Adhered neutrophils were incubated in the absence or the presence of DNase-1 before the addition of *L. donovani* promastigotes (WT and *lpg1*-KO) expressing luciferase at a MOI of 10:1. After 6 h, promastigote survival was determined as described in *A*. One representative experiment out of two performed in triplicate is presented as mean \pm SD. *C*, Adhered neutrophils were incubated at a MOI of 10:1 with either *L. donovani* (1S) or *L. major* (NIH S clone A2) promastigotes expressing luciferase. After 6 h, promastigote survival was determined as described in *A*. One representative experiment out of three performed in triplicate is presented as mean \pm SD.

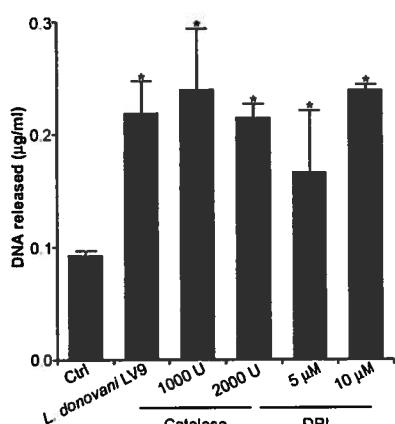


FIGURE 9. Induction of NET release by *L. donovani* promastigotes is independent of the oxidative burst. Human neutrophils adhered on poly-L-lysine coverslips were incubated in the absence or presence of either catalase or DPI prior to the addition of *L. donovani* promastigotes. After 30 min, release of DNA was quantified. One representative experiment out of three performed in triplicate is presented as mean \pm SD. * p < 0.01 compared with resting neutrophils.

a parasite component was responsible for this induction. To identify the parasite molecule(s) potentially involved in this process, we assessed the role of two well-characterized abundant promastigote surface virulence factors, namely, LPG and the glycoprotein GP63. Mutants lacking LPG and related phosphoglycans as well as a mutant lacking GP63 induced NET release and were trapped to the same extent as WT parasites. Thus, neither LPG, phosphoglycans, nor GP63 are responsible for the rapid induction of NET release by *Leishmania* promastigotes. This is in contrast to the conclusion of Guimarães-Costa et al. (21) and colleagues who reported that the addition of purified LPG from *Leishmania amazonensis* promastigotes to human neutrophils was sufficient to induce NET release. Several factors may explain the discrepancy between our results and those reported by Guimarães-Costa et al. (21), including the high concentration of purified LPG (10 μ g/ml) used to induce DNA release as well as the structure, in terms of carbohydrate modifications (40). In addition, LPG presented to neutrophils under the form of micelles may elicit cellular responses not observed when presented on particles. Indeed, we found that zymosan particles coated with purified LPG did not trigger NET release and were internalized to the same extent as zymosan. Data obtained with *L. donovani* promastigote-conditioned medium suggested that induction of NET release may not involve secreted molecules or exosomes (37). Of interest, although production of ROS is an important stimulus for the release of NETs (39), we could not demonstrate the involvement of ROS in the promastigote-induced NET release. Thus, although the mechanism by which *Leishmania* promastigotes elicit the rapid release of NETs clearly remains to be elucidated, our data suggest the existence of a ROS-independent mechanism.

Most microorganisms trapped by NETs are killed in contact with the high local concentrations of antimicrobial molecules present in these structures, which include histones, calprotectin, and the bactericidal/permeability-increasing protein (19, 23, 41). However, some pathogens have evolved strategies to escape trapping and/or killing by NETs. One such strategy used by *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*, consists of producing a DNase that degrades the DNA backbone of NETs (42, 43). Additionally, the polysaccharide capsule of *S. pneumoniae* was found to reduce trapping by NETs, whereas D-alanylation of lipoteichoic acid contributes to the resistance to NET killing by providing positive charge to the bacterial surface (44). Another escape mechanism consists of

avoiding NET induction. Hence, the hydrophobin RodA, the major surface component of *Aspergillus fumigatus* conidia, enables this form of the fungus to evade the triggering of NET formation (45). In the case of *L. donovani* promastigotes, our results indicate that LPG confers resistance to the microbicidal activity of NETs. Previous studies revealed that the dense glycocalyx formed by LPG at the promastigote surface protects the parasite from hydrolytic enzymes present in the sand fly midgut and from the lytic components of complement (4, 35, 46). We propose that LPG acts as a physical barrier to protect promastigotes from the antimicrobial molecules present in NETs. Thus, similar to *Mycobacterium tuberculosis* (26), *L. donovani* promastigotes are trapped by NETs but evade the antimicrobial activity of these structures. It was recently reported that *L. amazonensis* promastigotes are killed by NETs (21). The discrepancy between those data and our results suggests that *L. amazonensis*, *L. donovani*, and *L. major* are differentially resistant to the antimicrobial activity of NETs. Alternatively, different experimental procedures may account for this discrepancy. Hence, Guimarães-Costa et al. (21) performed their killing assay by incubating *L. amazonensis* promastigotes with PMA-activated neutrophils or with supernatants from PMA-activated neutrophils, whereas we incubated *L. donovani* and *L. major* promastigotes with neutrophils adhered to poly-L-lysine-coated coverslips. Further studies will be required to address this issue.

Much attention has been recently devoted to the internalization of *Leishmania* promastigotes by neutrophils and the consequences of this process on infection (7, 47, 48). Under the experimental conditions used in this study to visualize NETs (neutrophils adhered to poly-L-lysine-coated coverslips), internalization of promastigotes by neutrophils was an unfrequent event. This does not exclude the fact that internalized promastigotes may survive in a compartment lacking appropriate microbicidal components (10) and thus enter macrophages according either to the Trojan horse strategy (12, 13, 49, 50) or the “Trojan rabbit” strategy (7, 11). However, consistent with previous reports, we found that human neutrophils in suspension significantly internalized *L. donovani* promastigotes, albeit to a lower extent than zymosan. More importantly, we found that neutrophils in suspension produced NET, as assessed by the quantification of DNA release. Interestingly, careful examination of a figure from an earlier study by Pearson and Steigbigel (33) showing Giemsa-stained cytocentrifuged neutrophils incubated for 3 h with *L. donovani* promastigotes strongly suggests that most neutrophils were dying, perhaps as a consequence of NET release.

NETs were reported in patients and in various experimental models of infection, where they may contribute to the confinement and/or killing of pathogens as well as the modulation of host immune responses (19, 21, 23, 42, 43, 45). In the context of *Leishmania* infection, NETs were observed in lesion biopsies of patients with active cutaneous leishmaniasis, and it was proposed that they could be relevant to control the parasite burden (21). The release and impact of NETs in vivo after inoculation of *Leishmania* promastigotes by the sand fly remain to be demonstrated, and the effect of sand fly saliva on the modulation of NET release and antimicrobial activity is an important issue that will need to be investigated. Whereas Guimarães-Costa et al. (21) proposed that NETs are an innate response that might contribute to diminish parasite burden in the *Leishmania* inoculation site, based on our findings, we propose that NETs might immobilize *L. donovani* promastigotes to facilitate their uptake by mononuclear phagocytes recruited at the site of inoculation.

Acknowledgments

We thank Marcel Desrosiers for expertise with confocal immunofluorescence microscopy. We also thank Dr. Salvatore J. Turco (University of Ken-

tucky) for the kind gift of purified *L. donovani* LPG and Dr. Arturo Zychlinsky (Max Planck Institute for Infection Biology) for a protocol to quantify NETs.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Desjardins, M., and A. Descoteaux. 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 185: 2061–2068.
- Lodge, R., T. O. Diallo, and A. Descoteaux. 2006. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell. Microbiol.* 8: 1922–1931.
- Scianimanico, S., M. Desrosiers, J. F. Dermine, S. Méresse, A. Descoteaux, and M. Desjardins. 1999. Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell. Microbiol.* 1: 19–32.
- Spath, G. F., L. A. Garraway, S. J. Turco, and S. M. Beverley. 2003. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 9536–9541.
- Vinet, A. F., M. Fukuda, S. J. Turco, and A. Descoteaux. 2009. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. *PLoS Pathog.* 5: e1000628.
- Turco, S. J., and A. Descoteaux. 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 65–94.
- Ritter, U., F. Frischknecht, and G. van Zandbergen. 2009. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitol.* 25: 505–510.
- McFarlane, E., C. Perez, M. Charmoy, C. Allenbach, K. C. Carter, J. Alexander, and F. Tacchini-Cottier. 2008. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.* 76: 532–541.
- Ribeiro-Gomes, F. L., M. C. Moniz-de-Souza, M. S. Alexandre-Moreira, W. B. Dias, M. F. Lopes, M. P. Nunes, G. Lungarella, and G. A. DosReis. 2007. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J. Immunol.* 179: 3988–3994.
- Gueirard, P., A. Laplante, C. Rondeau, G. Milon, and M. Desjardins. 2008. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cell. Microbiol.* 10: 100–111.
- Peters, N. C., J. G. Egen, N. Secundino, A. Debrabant, N. Kimblin, S. Kamhawi, P. Lawyer, M. P. Fay, R. N. Germain, and D. Sacks. 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321: 970–974.
- van Zandbergen, G., M. Klinger, A. Mueller, S. Dannenberg, A. Gebert, W. Solbach, and T. Laskay. 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J. Immunol.* 173: 6521–6525.
- Laskay, T., G. van Zandbergen, and W. Solbach. 2003. Neutrophil granulocytes—Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 11: 210–214.
- Nauseef, W. M. 2007. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol. Rev.* 219: 88–102.
- Segal, A. W. 2005. How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 197–223.
- Allen, L. A., and R. L. McCaffrey. 2007. To activate or not to activate: distinct strategies used by *Helicobacter pylori* and *Francisella tularensis* to modulate the NADPH oxidase and survive in human neutrophils. *Immunol. Rev.* 219: 103–117.
- Mayer-Scholl, A., P. Averhoff, and A. Zychlinsky. 2004. How do neutrophils and pathogens interact? *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 62–66.
- Laufs, H., K. Müller, J. Fleischer, N. Reiling, N. Jahnke, J. C. Jensenius, W. Solbach, and T. Laskay. 2002. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect. Immun.* 70: 826–835.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532–1535.
- Medina, E. 2009. Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. *J. Innate Immun.* 1: 176–180.
- Guimaraes-Costa, A. B., M. T. Nascimento, G. S. Froment, R. P. Soares, F. N. Morgado, F. Conceição-Silva, and E. M. Saraiva. 2009. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 6748–6753.
- Urban, C. F., U. Reichard, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell. Microbiol.* 8: 668–676.
- Urban, C. F., D. Ermert, M. Schmid, U. Abu-Abed, C. Goosmann, W. Nacken, V. Brinkmann, P. R. Jungblut, and A. Zychlinsky. 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 5: e1000639.
- Papayannopoulos, V., and A. Zychlinsky. 2009. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 30: 513–521.
- Grinberg, N., S. Elazar, I. Rosenshine, and N. Y. Shpigel. 2008. Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 76: 2802–2807.
- Ramos-Kichik, V., R. Mondragón-Flores, M. Mondragón-Castelán, S. Gonzalez-Pozos, S. Muñiz-Hernandez, O. Rojas-Espinosa, R. Chacón-Salinas, S. Estrada-Parra, and I. Estrada-García. 2009. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb.)* 89: 29–37.
- Pelleter, M., A. Bouchard, and D. Girard. 2004. In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J. Immunol.* 173: 7521–7530.
- Privé, C., and A. Descoteaux. 2000. *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *Eur. J. Immunol.* 30: 2235–2244.
- Huang, C., and S. J. Turco. 1993. Defective galactofuranose addition in lipophosphoglycan biosynthesis in a mutant of *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 268: 24060–24066.
- Descoteaux, A., Y. Luo, S. J. Turco, and S. M. Beverley. 1995. A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. *Science* 269: 1869–1872.
- Joshi, P. B., B. L. Kelly, S. Kamhawi, D. L. Sacks, and W. R. McMaster. 2002. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120: 33–40.
- St-Denis, A., V. Caouras, F. Gervais, and A. Descoteaux. 1999. Role of protein kinase C-alpha in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages. *J. Immunol.* 163: 5505–5511.
- Pearson, R. D., and R. T. Steigbigel. 1981. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 127: 1438–1443.
- Pearson, R. D., J. A. Sullivan, D. Roberts, R. Romito, and G. L. Mandell. 1983. Interaction of *Leishmania donovani* promastigotes with human phagocytes. *Infect. Immun.* 40: 411–416.
- Sacks, D. L., G. Modi, E. Rowton, G. Späth, L. Epstein, S. J. Turco, and S. M. Beverley. 2000. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 406–411.
- Späth, G. F., L. Epstein, B. Leader, S. M. Singer, H. A. Avila, S. J. Turco, and S. M. Beverley. 2000. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9258–9263.
- Silverman, J. M., J. Clos, C. C. deOliveira, O. Shirvani, Y. Fang, C. Wang, L. J. Foster, and N. E. Reiner. 2010. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J. Cell Sci.* 123: 842–852.
- Brinkmann, V., and A. Zychlinsky. 2007. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 577–582.
- Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 176: 231–241.
- McConville, M. J., and M. A. Ferguson. 1993. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem. J.* 294: 305–324.
- Wartha, F., K. Beiter, S. Normark, and B. Henriques-Normark. 2007. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 10: 52–56.
- Beiter, K., F. Wartha, B. Albiger, S. Normark, A. Zychlinsky, and B. Henriques-Normark. 2006. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol.* 16: 401–407.
- Buchanan, J. T., A. J. Simpson, R. K. Aziz, G. Y. Liu, S. A. Kristian, M. Kotb, J. Feramisco, and V. Nizet. 2006. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol.* 16: 396–400.
- Wartha, F., K. Beiter, B. Albiger, J. Fernebro, A. Zychlinsky, S. Normark, and B. Henriques-Normark. 2007. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell. Microbiol.* 9: 1162–1171.
- Brunn, S., O. Kniemeyer, M. Hasenberg, V. Aimanianda, S. Nietzsche, A. Thywissen, A. Jeron, J. P. Latgé, A. A. Brakhage, and M. Gunzer. 2010. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathog.* 6: e1000873.
- Puentes, S. M., R. P. Da Silva, D. L. Sacks, C. H. Hammer, and K. A. Joiner. 1990. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J. Immunol.* 145: 4311–4316.
- John, B., and C. A. Hunter. 2008. Immunology. Neutrophil soldiers or Trojan Horses? *Science* 321: 917–918.
- Peters, N. C., and D. L. Sacks. 2009. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell. Microbiol.* 11: 1290–1296.
- Jochim, R. C., and C. Teixeira. 2009. *Leishmania* commandeers the host inflammatory response through neutrophils. *Trends Parasitol.* 25: 145–147.
- Laskay, T., G. van Zandbergen, and W. Solbach. 2008. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology* 213: 183–191.