

Université de Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

La cystéine protéase B régule la virulence de *Leishmania mexicana* par la modulation de l'expression de GP63

Par
Pierre-André Casgrain

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc)
en Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation

| | |
|------------------------|--|
| Président du Jury | Mme Maritza Jaramillo, Ph. D. INRS-Institut Armand-Frappier |
| Examineur externe | Mme Sachiko Sato, Ph. D. Université Laval |
| Directeur de recherche | M. Albert Descoteaux, Ph. D. INRS-Institut Armand-Frappier |

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Albert Descoteaux, de m'avoir donné la chance de travailler dans son laboratoire. Il a été le coach idéal pour moi. Les nombreux encouragements ainsi que la grande autonomie qu'il me laissait m'ont permis d'évoluer comme scientifique et comme personne.

Un gros merci à Carolina, Christine, Guillermo, Maria et Neda pour leur patience et leur temps pour mes nombreuses questions.

J'aimerais aussi remercier mes parents qui ont sacrifié beaucoup pour me permettre d'aller dans les bonnes écoles et qui m'ont encouragé à faire ce que j'aime. Ils m'ont fourni les outils nécessaires à l'aboutissement d'un très beau projet que sont les études graduées.

Je voudrais remercier et m'excuser auprès de mes amis que j'ai mis de côté pendant mes études au cours des 5 dernières années. Il est temps qu'on passe du bon temps ensemble. Je ne peux pas passer par-dessus Alain, Joseph et Olivier avec lesquels j'ai passé au moins 500 heures à manger en d'agréables compagnies.

Pour finir, je désire remercier Stéphanie Turcotte pour tout. Tu es ma plus grande motivation et ma plus grande fierté. J'ai fini mon secondaire, traversé le CÉGEP, mon bac et maintenant ma maîtrise à tes côtés. Huit ans qu'on s'aime et une éternité pour en profiter.

Merci à tous

Table des matières

| | |
|--|------|
| Remerciement..... | i |
| Table des matières..... | ii |
| Liste des abréviations..... | iv |
| Liste des figures et des tableaux | vii |
| Résumé..... | viii |
| Introduction | 1 |
| SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE | 2 |
| CHAPITRE 1 : RÉPONSE IMMUNITAIRE..... | 3 |
| 1.1 Système immunitaire..... | 3 |
| 1.2 Macrophage | 4 |
| 1.3 Phagocytose | 5 |
| 1.4 Contournement de la phagocytose par les SNAREs | 10 |
| CHAPITRE 2 : <i>LEISHMANIA</i> | 12 |
| 2.1 Leishmaniose..... | 12 |
| 2.2 Anatomie et cycle de vie | 13 |
| 2.3 Facteur de pathogenèse | 17 |
| 2.3.1 LPG | 17 |
| 2.3.2 GP63 | 18 |
| 2.3.3 CPB | 21 |
| CHAPITRE 3 : INTERACTION HÔTE-PATHOGENÈNE | 25 |
| 3.1 L'entrée..... | 25 |
| 3.2 Survie intracellulaire..... | 28 |
| 3.3 Modulation de la réponse immunitaire..... | 30 |
| 3.3.1 Cytokines | 30 |

| | |
|--|----|
| 3.3.2 TLR..... | 33 |
| 3.3.3 Présentation antigénique..... | 34 |
| SECTION 2 : Article | 36 |
| ARTICLE | 37 |
| CONTRIBUTION DES AUTEURS | 38 |
| RÉSUMÉ DE L'ARTICLE | 39 |
| ABSTRACT | 40 |
| INTRODUCTION..... | 41 |
| RESULTS..... | 43 |
| DISCUSSION..... | 53 |
| MATERIALS AND METHODS..... | 56 |
| SUPPORTING INFORMATION..... | 61 |
| SECTION 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION | 62 |
| DISCUSSION ET CONCLUSION..... | 63 |
| Liste des références | 68 |

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique
APC: Antigen presenting cells
ANOVA: Analysis of variance
ARN: Acide ribonucléique
ARNm: Acide ribonucléique messenger
ATP: Adénosine triphosphate
BMDC: Bone marrow-derived dendritic cell
BMM: Bone marrow-derived macrophage
BSA: Bovine serum albumine
CAS: Cellular apoptosis susceptibility
CD: Cluster of differentiation
CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité
CP: Cystéine protéase
CPA : Cystéine protéase A
CPB: Cystéine protéase B
CPC: Cystéine protéase C
CR: Complement receptor
CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT: Dithiothréitol
ECL: Enhanced chemiluminescence
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
EEA1: Early endosome antigen 1
ER: Endoplasmic reticulum
ERK: Extracellular signal-regulated kinase
FBS: Fetal bovine serum
FcR: Fc receptor
GP63: Glycoprotéine 63 (Leishmanolysine)
GPI: Glycosylphosphatidylinositol
GTP: Guanosine triphosphate
HRP: Horeseradish peroxydase
IFNs: Interférons
Ig: Immunoglobuline

IL: Interleukine
IP-10: Interferon gamma-induced protein 10 (CXCL10)
IRF: Interferon regulatory transcription factor
ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JAK: Janus kinase
LPG: Lipophosphoglycan
LPS: Lipopolysaccharide
LYST: Lysosomal trafficking regulator
MAP: Mitogen-activated protein
MARCKS: Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor
MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2)
MFR: Mannose-fucose receptor
MIF: Macrophage migration inhibitory factor
MIP-1 α : Macrophage inflammatory protein-1 alpha (CCL3)
MIP-1 β : Macrophage inflammatory protein-1 beta (CCL4)
MIP-2: Macrophage inflammatory protein-2 (CXCL2)
MSPC: Major surface protein constitutively (GP63 produit constitutivement)
MSPL: Major surface protein Logarithmique (GP63 produit en phase logarithmique)
MSPS: Major surface protein Stationary (GP63 produit en phase stationnaire)
mTOR: Mammalian target of rapamycin
NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NdK: nucleoside diphosphatase kinase
NF- κ B: Nuclear factor-kappa B
NSF: N-ethylmaleimide sensitive factor
NO: Oxyde nitrique
NOS: Nitric oxide synthase
NOX: NADPH-dependent oxydase
PAMPs: Pathogen-associated molecular pattern
PBS: Phosphate-buffered saline
PCR: Polymerase chain reaction
PD1: Programmed cell death 1
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
PKC: Protein kinase C
PS: Phosphatidylsérine

PTP-1B: Protein tyrosine phosphatase 1B
PV: Parasitophorous vacuole
RANTES: Regulated on activation normal T cell expressed and secreted (CCL5)
RI: Région intergénique
RNA: Ribonucleic acid
ROS: Reactive oxygen species
SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM: Standard error of the mean
SHP-1: Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1
SNAP: Synaptosomal-associated protein
SNAREs: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
STAT: Signal transducer and activator of transcription
STX: Syntaxin
TBS: Tris-buffered saline
TCR: T cell receptor
TGF: Transforming growth factor
TLR: Toll-like receptor
TNF: Tumor necrosis factor
Treg: Lymphocyte T régulateur
UTR: Untranslated region
VAMP: Vesicle-associated membrane protein
VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Polarisation de macrophage vers un macrophage M1 ou M2 (adapté de (Biswas et Mantovani, 2010)..... | 5 |
| Figure 2 : Distribution des SNAREs sur les différents compartiments endosomaux (Chen et Scheller 2001) | 8 |
| Figure 3 : Phagocytose d'un pathogène (Flannagan et al, 2009). | 9 |
| Figure 4 : L'impact de l'inhibition de SNAREs sur la phagocytose (Wesolowski et Paumet 2010). | 10 |
| Figure 5 : Représentation du promastigote et de l'amastigote (Besteiro et al, 2007). | 15 |
| Figure 6 : Cycle de vie de <i>Leishmania</i> comprenant la phase amastigote et la phase promastigote (Rostan, 2013). | 16 |
| Figure 7 : Organisation génomique GP63 selon différentes espèces (Yao et al, 2003)..... | 20 |
| Figure 8 : Organisation génomique de CPB chez <i>L. mexicana</i> (Mottram et al, 1997) | 24 |
| Figure 9 : Schéma de l'entrée du parasite jusqu'au macrophage (Cecilio, Perez-Cabezas et al. 2014). | 27 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 . Rôle connu de différents facteurs de virulence | 24 |
|---|----|

Résumé

Leishmania échappe au système immunitaire en survivant et se multipliant dans les phagolysosomes de macrophages. Par contre, il doit être en mesure de modifier la maturation de ceux-ci. Certaines espèces de *Leishmania* comme *L. donovani* et *L. major* sont capables d'interférer avec la biogenèse des phagolysosomes. Toutefois, certaines espèces comme *L. amazonensis* et *L. mexicana* n'ont pas besoin de bloquer la fusion des vésicules de la phagocytose. Au contraire, ils tendent à rapatrier le plus de vésicules possible pour étendre leur volume. Avec toutes ces fusions, les vacuoles, qui ne contenaient qu'un seul parasite, se regroupent en vacuole géante pour former une vacuole communale. De cette façon, les agents oxydatifs et les hydrolases du macrophage sont en trop faible concentration pour être efficaces et le parasite peut survivre et poursuivre sa différenciation en amastigote. Pour *L. donovani*, souche à vacuole individuelle, le lipophosphoglycan (LPG) est essentiel à la survie du parasite, tandis que pour *L. mexicana*, souche à vacuole communale, une délétion de LPG n'affecte pas le parasite puisque son rôle jusqu'à présent connu est de bloquer la fusion avec le phagosome. Cependant, la cystéine protéase B (CPB) est essentielle à la virulence du parasite. Il a été montré que les souris infectées par des parasites dépourvus de CPB sont capables de monter une réponse Th1 et de limiter la croissance des lésions au site d'infection.

Ici, nous avons entrepris d'évaluer si la CPB a un rôle dans la formation des vacuoles communales et donc de permettre la survie du parasite dans le macrophage. Nous montrons, toutefois, que l'absence de CPB diminue les niveaux de GP63 et LPG. Cela conduit à de plus petites vacuoles et la survie du parasite intracellulaire est entravée. Les parasites sans CPB ne peuvent plus cliver les molécules SNAREs VAMP3 et VAMP8, qui sont connues pour affecter la maturation du phagolysosome. En outre, les parasites knock-out sont également plus sensibles à la lyse par le sérum humain, forme de plus petites lésions et la parasitémie est inférieure au type sauvage (WT). Ces phénomènes peuvent être restaurés par l'expression de CPB ou GP63. En somme, ces résultats révèlent que *L. mexicana* nécessite CPB pour l'expression de GP63 et de LPG. Sans ces facteurs de virulence, les macrophages sont en mesure d'éliminer l'infection. Comprendre l'interaction entre ces facteurs de pathogénicité nous fournira un aperçu sur la virulence de *Leishmania*.

Introduction

Leishmania est le protozoaire responsable de la leishmaniose, une maladie présente dans 98 pays principalement sous-développés. Chaque année, il y a environ 2 millions de nouveaux cas et plus de 55 000 morts. La maladie peut se manifester sous 3 formes selon l'espèce. Il y a la forme cutanée, la forme muco-cutanée et la forme viscérale. Pour les formes cutanées, la glycoprotéine GP63 permet de modifier la régulation du système immunitaire et la formation de lésions cutanées en modulant l'expression, la sécrétion et la réponse aux cytokines produites par différentes cellules. La pathogénèse des parasites formant des lésions similaires peut être très différente. Par exemple, *L. major* et *L. mexicana* causent toutes les deux des lésions cutanées. Toutefois, *L. major* est une souche à vacuole singulière et *L. mexicana* est une souche à vacuole communale. Chez les souches à vacuole singulière, le parasite utilise le LPG pour former une barrière physique pour empêcher la fusion avec les endosomes et lysosomes. Tandis que chez les souches à vacuole communale, le parasite tente de fusionner avec les vésicules pour accroître son volume et ainsi diminuer l'efficacité des molécules microbicides du macrophage. À ce jour, le moyen d'y parvenir reste inconnu. Lors d'une infection par un agent pathogène, le macrophage le reconnaît avec des récepteurs à la surface. Il s'en suit d'une fusion avec les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes. Chaque vésicule apporte les éléments nécessaires à la maturation du phagosome vers un phagolysosome et ainsi détruire le pathogène. Les fusions entre ces vésicules sont médiées par les soluble-N-ethylmaleidime-sensitive-factor accessory-protein receptor (SNAREs). Toutefois, lors de l'infection par *L. mexicana*, le parasite prend le contrôle de la fusion de vésicule et force la fusion entre le phagosome et les différentes vésicules. La métalloprotéase GP63 de *L. major* clive les SNAREs VAMP3 et VAMP8, ce qui empêche la fusion du phagosome avec les endosomes tardifs et les endosomes de recyclage donc promeut la survie du parasite dans le macrophage. Chez *L. mexicana*, une autre protéase est essentielle à la virulence du parasite, la cystéine protéase B. Sans celle-ci, la survie dans le macrophage et chez le hamster est fortement diminuée. Il a été prouvé que la CPB est capable de cliver plusieurs protéines chez le macrophage afin de permettre sa survie. Néanmoins, on ne sait toujours pas si la CPB aurait un rôle dans la création de ces vacuoles communales. Le but de mon projet est d'évaluer l'impact de la CPB sur l'apport de membrane au phagosome. En utilisant une souche de *L. mexicana* sauvage ainsi qu'une souche déficiente CPB, je serai en mesure de confirmer si la CPB a un impact sur la phagocytose du parasite.

SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

CHAPITRE 1 : LA RÉPONSE IMMUNITAIRE

1.1 Système immunitaire

Le rôle du système immunitaire est de protéger l'hôte contre les attaques des envahisseurs. Ceux-ci peuvent être viraux, procaryotes et eucaryotes. Lors de l'évolution vers les mammifères actuels, le système immunitaire a progressé afin de s'approcher d'une défense presque parfaite (Naito 2008). Il y a tout d'abord le système inné. Celui-ci, bien que primitif, permet de s'acquitter d'un grand rôle dans la protection contre les infections. Les macrophages sont parmi les cellules actives du système inné avec les cellules NK et les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles). Les macrophages reconnaissent des motifs conservés chez les pathogènes pour les englober, un phénomène nommé phagocytose (Kawai et Akira 2010) (Takeuchi et Akira 2010). Ces cellules ont évolué pour être capables de présenter ce qu'elles ont éliminé aux cellules du système immunitaire adaptatif (Cooper et Alder 2006). Les lymphocytes T et B agissent ensemble afin d'éliminer des pathogènes portants des antigènes spécifiques. (Akbar et Fletcher 2005). Ces cellules possèdent des récepteurs de surface uniques pour des antigènes particuliers qui sont produits de manière aléatoire (Palm et Medzhitov 2009, Iwasaki et Medzhitov 2010). Lorsque les récepteurs reconnaissent leur antigène, ces lymphocytes vont en expansion clonale. Suite à l'élimination du danger, une petite partie de lymphocytes seront des cellules mémoires tandis que la grande majorité trouvera la mort. Les cellules mémoires pourront, suite à la reconnaissance de leur antigène, être prêtes pour une seconde attaque par les pathogènes (Palm et Medzhitov 2009). La réponse immunitaire fonctionne avec le principe du soi versus non-soi ou soi altéré. Il y a donc une tolérance contre le soi et une réaction contre ce qui n'est pas reconnu comme le soi. Selon Matzinger, la réaction immunitaire n'est pas simplement activée par des micro-organismes ou des particules exogènes, mais plutôt par la mort et un dommage tissulaire. C'est le modèle de « danger » (Matzinger 2002).

1.2 Macrophage

Comme décrit auparavant, le macrophage est une cellule capable de phagocyter d'où le nom makro, « grand » et phagein « manger ». Il fût décrit pour la première fois par Elie Metchnikoff en 1883 (Gordon 2008). La phagocytose ne se fait pas seulement au niveau des pathogènes, mais aussi des cellules apoptotiques, nécrotiques et sénescents (Elliott et Ravichandran 2010). Ceci a pour effet de recycler les éléments chimiques, sucres, protéines et gras des cellules pour les redistribuer pour la formation de nouvelles cellules (Wynn, Chawla et al. 2013). L'activation des macrophages se fait par une grande variété de stimuli dont la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMPs), le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries et l'exposition à diverses cytokines pro-inflammatoires comme les interférons (IFNs) (Akira, Uematsu et al. 2006). Dans ces situations, le macrophage se différenciera en macrophage de type M1. Comme démontré à la figure 1, il y aura augmentation de la production de réactifs oxydatifs, de TNF- α et d'IL-12 qui ont pour effet d'augmenter l'activité phagocytaire du macrophage, de favoriser une réponse Th1 et de mettre le reste du système immunitaire en alerte (Linehan et Fitzgerald 2015). Tandis que lorsque le macrophage est en contact avec des molécules anti-inflammatoires comme les phosphatidylsérine (PS), IL-13 et IL-4, il se différenciera en macrophage de type M2 .qui ont pour effet de favoriser une réponse Th2 et de diminuer la réponse immunitaire locale (Gordon et Martinez 2010).

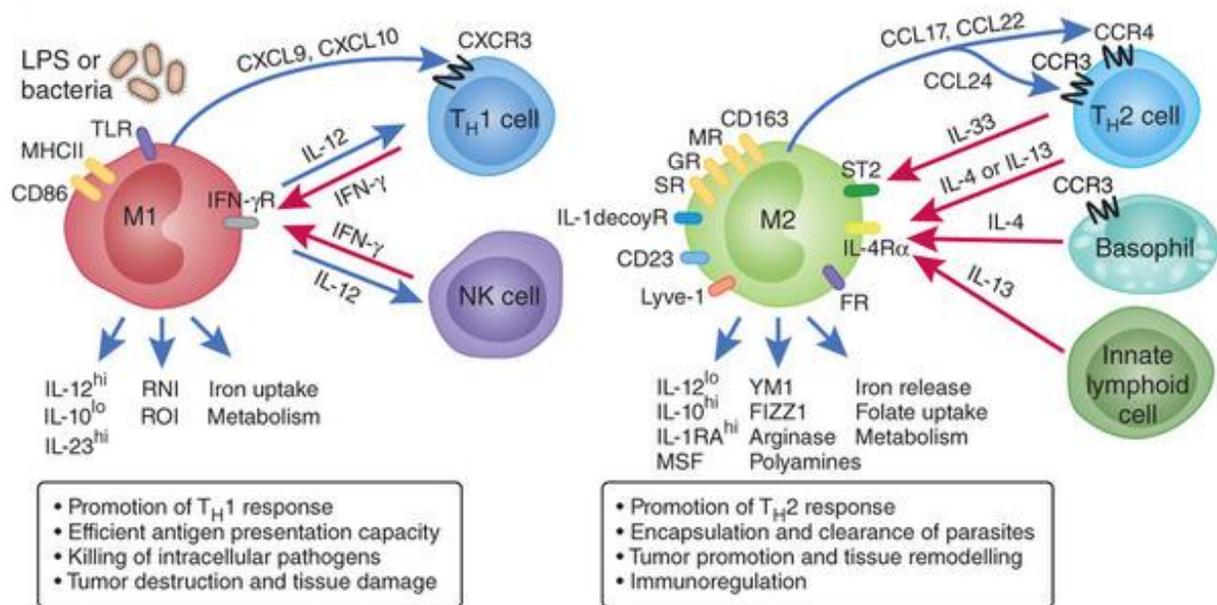


Figure 1 : Polarisation de macrophage vers un macrophage M1 ou M2.

La polarisation du macrophage dépend des différents signaux reçus. Il s'en suit un changement dans les signaux envoyés qui peuvent modifier la réponse immunitaire (adapté de (Biswas et Mantovani 2010)).

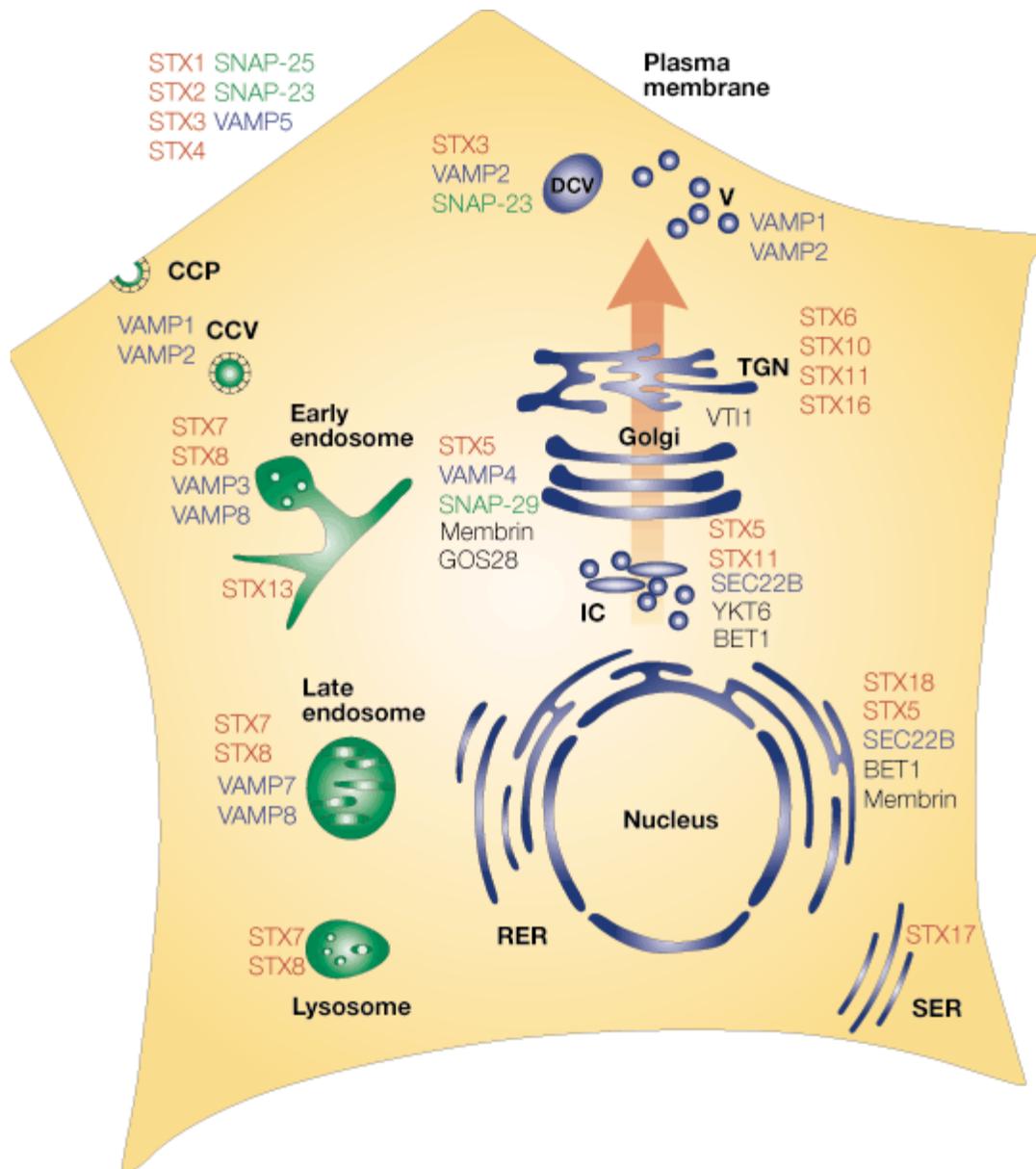
1.3 Phagocytose

La phagocytose est l'internalisation d'une particule d'au moins 0,5 µm de diamètre. Le processus phagocytaire est initié par la liaison aux récepteurs phagocytaires et l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire (O'Neill et Bowie 2007). Cela conduit à un réarrangement du cytosquelette d'actine et l'internalisation de la cible dans une vacuole connue comme un phagosome (Orth et McNiven 2003). Le phagosome acidifie et fusionne avec le lysosome ce qui conduit à la dégradation de la matière intériorisée (Gordon, Hart et al. 1980). Les récepteurs phagocytaires peuvent être divisés en deux catégories, opsonine-dépendante et opsonine-indépendante. Les récepteurs opsonine-dépendantes incluent les récepteurs d'anticorps (FcR), les récepteurs du complément (CR) et les intégrines (Underhill et Goodridge 2012). Les récepteurs opsonine indépendante comprennent les récepteurs éboueurs et les récepteurs de lectine de type C (Kerrigan et Brown 2009). De nombreux récepteurs opsonine-

indépendant se lie à des structures microbiennes conservées (Underhill et Ozinsky 2002). Cependant, il faut noter que la plupart des particules sont reconnues par plus d'un récepteur. En plus de cela, il a été suggéré qu'il y a beaucoup de récepteurs qui jouent un rôle dans la phagocytose qui doivent encore être identifiés (Linehan et Fitzgerald 2015). Le procédé de la phagocytose implique un réseau de signalisation complexe qui varie en fonction des récepteurs qui ont été activés (Flannagan, Cosio et al. 2009). Par exemple, la voie de signalisation initiée par la liaison d'IgG à FcγR utilise des motifs intracellulaires d'activation à base de tyrosine d'immunorécepteur (ITAM) dans leurs motifs queue cytoplasmique. Suite à la phosphorylation d'ITAM, dû à la reconnaissance de l'anticorps, il y a recrutement de la kinase Syk. Ceci active une cascade de phosphorylation qui conduit à la réorganisation de l'actine, l'activation de la NADPH oxydase, et la production de médiateurs pro-inflammatoires (Caron et Hall 1998).

Immédiatement après la liaison aux récepteurs apparentés et étant ensuite intériorisée, la cible phagocytaire réside dans une vacuole intracellulaire délimitée par une seule bicouche de la membrane, appelée phagosome naissant. La membrane du phagosome naissante est largement dérivée de la membrane plasmique et le contenu est semblable au milieu extracellulaire (Desjardins, Celis et al. 1994). C'est à travers d'une série de fusions membranaires séquentielles avec d'autres compartiments intracellulaires, y compris les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes que le phagosome mature afin de former le phagolysosome (Desjardins, Nzala et al. 1997). La conversion entre les stades de phagosome est médiée, en partie, par les GTPases de la famille de Rab. Rab5 facilite la fusion du phagosome naissant avec endosomes précoces par le recrutement du marqueur « Early endosome antigen 1 » (EEA1). Celui-ci recrute le PI3K qui, à son tour, génère des phosphatidylinositol 3-phosphate sur le feuillet cytosolique de la membrane du phagosome précoce (Bucci, Parton et al. 1992, Vieira, Botelho et al. 2001). Le phosphatidylinositol 3-phosphate collabore avec Rab5 en conservant EEA1 et favorise le recrutement et l'activation ultérieure d'un certain nombre de protéines impliquées dans la maturation du phagosome ainsi que Rab7, un marqueur des endosomes (Callaghan, Nixon et al. 1999). Lorsque la maturation se produit, Rab5 est perdu et Rab7 médie la fusion du phagosome avec endosomes tardifs et, finalement, les lysosomes (Vieira, Bucci et al. 2003). La fusion des vésicules est aussi médiée par les SNAREs (Stow, Manderson et al. 2006). La membrane supplémentaire qui est nécessaire pour la formation du phagolysosome est apportée par la fusion de certains organites intracellulaires avec la membrane plasmique. Les endosomes de recyclage, les endosomes

tardifs et le réticulum endoplasmique (ER) ont de grandes quantités de membranes et contiennent les SNAREs spécifiques à leur compartiment (Becker, Volchuk et al. 2005). La SNARE VAMP3 permet la fusion de la membrane d'endosomes de recyclage avec la membrane plasmique explicitement au phagosome naissant (Bajno, Peng et al. 2000). Les SNAREs STX4 et SNAP23, de la membrane plasmique, qui devient le phagosome, se lient à VAMP3 et permettent de fusionner les deux compartiments (Pagan, Wylie et al. 2003, Murray, Kay et al. 2005). Immédiatement après l'insertion d'endosomes de recyclage, VAMP7 règle la livraison d'endosomes tardifs, ce qui poursuit la maturation du phagosome (Braun, Fraisier et al. 2004). Les SNAREs potentielles pour interagir avec VAMP7 sont STX2, STX3 et/ou STX4 (Hackam, Rotstein et al. 1996). On ne détecte plus de VAMP3 sur les phagosomes 10 à 20 minutes après l'internalisation comparativement à VAMP7 qui reste associé aux phagosomes 60 minutes après l'internalisation (Bajno, Peng et al. 2000, Pryor, Mullock et al. 2004). Il aurait un rôle dans le fonctionnement de la fusion d'endosomes tardifs et de lysosomes au phagosome. Les SNAREs partenaires qui sont nécessaires pendant la maturation du phagosome doivent encore être identifiés. Toutefois, les SNAREs potentielles comprennent des complexes SNARE qui fonctionnent dans les voies d'endocytose dans d'autres types de cellules comme STX7 (Antonin, Holroyd et al. 2000). Comme le démontre la figure 2, les SNAREs à la surface des organites régulent les différentes fonctions du macrophage.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 2 : Distribution des SNAREs sur les différents compartiments endosomaux.

L'organisation de la cellule et de ces compartiments passe par l'organisation des SNAREs et autres molécules présentes à leur surface. (Rouge, la famille des Syntaxine, bleu, famille VAMP ; vert, famille des SNAP ; Noire, d'autres ; CCP, clathrin-coated pits ; CCV, clathrin-coated vesicles ; DCV, dense core vesicles ; IC, intermediate compartment ; RER, rough endoplasmic reticulum ; SER, smooth endoplasmic reticulum ; TGN, *trans*-Golgi network ; V, vesicles). (Chen et Scheller 2001)

La maturation implique généralement l'acidification du phagosome à un pH de 4.5 à 5.5 qui permet, à son tour, l'activation d'un certain nombre d'enzymes hydrolytiques, y compris diverses cathepsines. L'acidification du phagosome est due à l'accumulation progressive de V-ATPases sur la membrane du phagosome (Desjardins, Huber et al. 1994). La V-ATPase est un complexe de protéines multimères qui permet la translocation de protons dans un mode électrogène dans le phagosome au détriment de l'ATP cytosolique (Beyenbach et Wieczorek 2006). Il n'y a pas seulement le pH et les hydrolases, mais aussi les radicaux intermédiaires oxygénés et nitrogenés qui sont utiles à la dégradation. La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase permet la production de superoxyde. Le superoxyde est rapidement converti en H₂O₂ et d'autres espèces réactives de l'oxygène (ROS) essentielles pour la fonction microbicide du macrophage (Babior 2004). Ces étapes de maturation du phagosome sont illustrées à la figure 3.

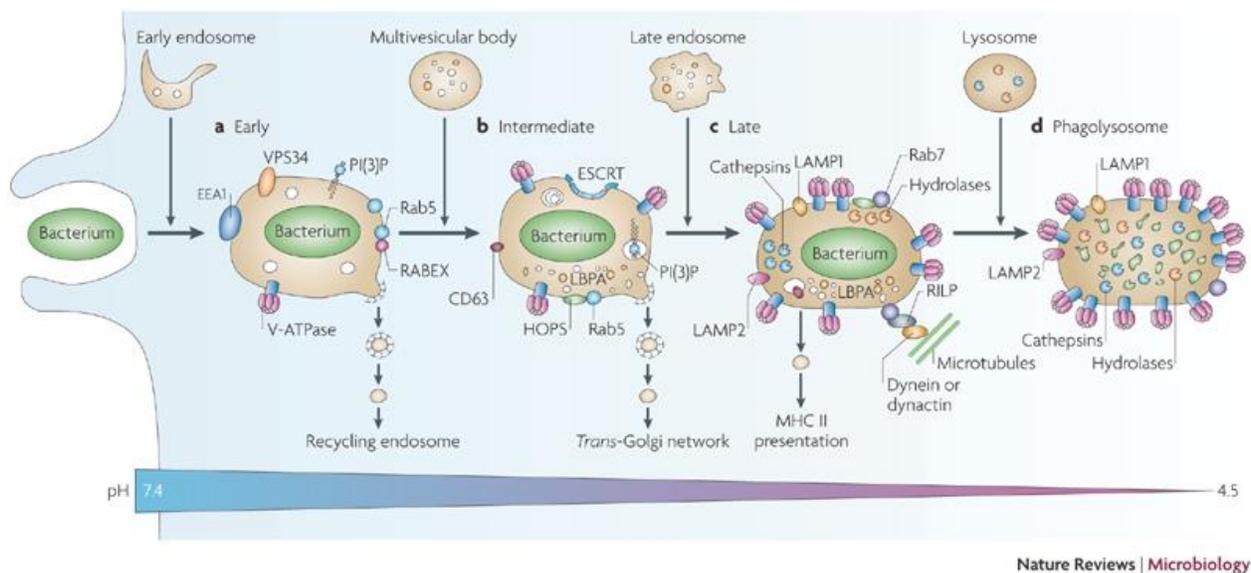


Figure 3 : Phagocytose d'un pathogène.

De l'entrée jusqu'à la lyse, la phagocytose est ordonné et implique une grande quantité d'éléments nécessaires pour y parvenir (Flannagan, Cosio et al. 2009).

1.4 Contournement de la phagocytose par les SNAREs

Il existe plusieurs maladies qui sont liées à un défaut de SNAREs spécifiques tel que l'infarctus du myocarde qui est causé par un mutant défectueux de VAMP8 (Shiffman, Rowland et al. 2006). En outre, selon l'implication séquentielle de SNAREs dans la maturation du phagosome, ils peuvent être de bonnes cibles pour certains agents pathogènes pour prévenir la biogenèse du phagolysosome et donc inhiber l'activité bactéricide et présentation de l'antigène (Figure 4).

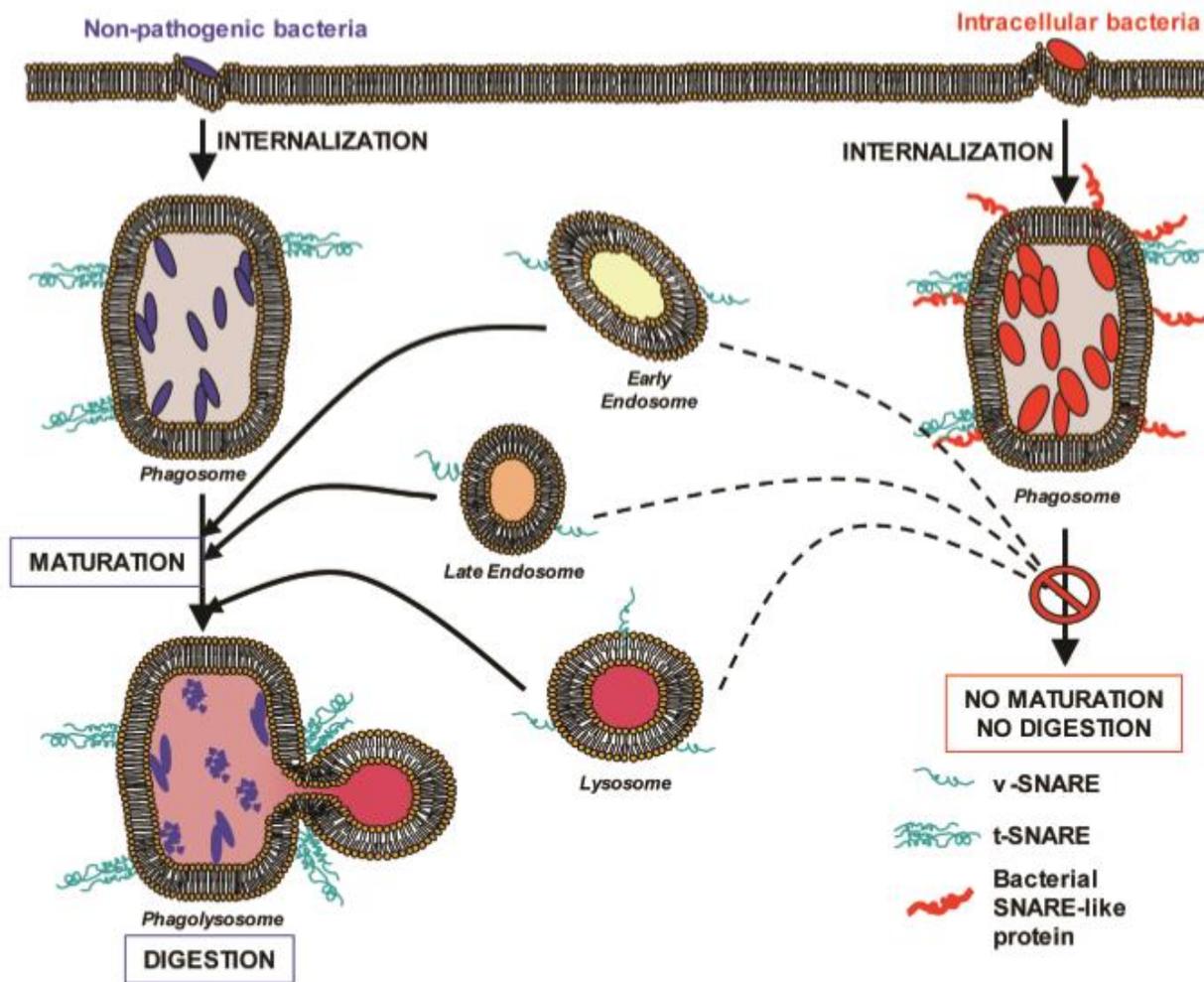


Figure 4 : L'impact de l'inhibition de SNAREs sur la phagocytose

En imitant ou inhibant les SNAREs de la phagocytose, les pathogènes inhibent la maturation du phagosome (Wesolowski et Paumet 2010).

Il y a plusieurs études qui montrent la dégradation de SNAREs spécifiques après l'infection. Par exemple, l'endopeptidase dépendante du zinc actif de la neurotoxine de *Clostridium* clive spécifiquement VAMP1, VAMP2 et VAMP3 et le sérotype A de la toxine botulique clive SNAP25 (Pellizzari, Rossetto et al. 1999). VAMP3 est un marqueur endosomale de recyclage et interagit avec syntaxin 6, qui est un marqueur de réseau trans-Golgi. Il joue un rôle dans le trafic trans-Golgi de la voie d'endocytose. Cette SNARE subit une dégradation protéolytique sur les phagosomes contenant *Mycobacterium tuberculosis*. VAMP3 joue un rôle dans la maturation du phagosome et c'est pourquoi il est ciblé par les mycobactéries. L'arrêt de la maturation du phagosome permet à *M. tuberculosis* de mieux survivre dans les macrophages (Fratti, Chua et al. 2002). Fait intéressant, certains agents pathogènes qui pénètrent dans les cellules hôtes à travers la membrane utilisent des composants moléculaires qui contiennent des répétitions heptanes. Ces répétitions se composent généralement de résidus hydrophobes et ils ont une structure similaire aux SNAREs. Ces protéines SNARE-like sont utilisés par les microorganismes afin de promouvoir ou de bloquer la fusion de la membrane dépendant de leur stratégie de survie (Wesolowski et Paumet 2010). Les micro-organismes intracellulaires tels que *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Chlamydia* ou *Legionella* bloquent les fusions de SNAREs défavorables à leur survie, mais de l'autre côté, ils créent de nouvelles voies de fusion rentables pour leur survie (Flannagan, Cosio et al. 2009). En conclusion, les SNAREs jouent un rôle essentiel dans le trafic des vésicules dans le système immunitaire et ceci explique pourquoi ils sont de bonnes cibles pour les différents agents pathogènes.

CHAPITRE 2 : *LEISHMANIA*

2.1 Leishmaniose

La leishmaniose est endémique dans 98 pays, dont 72 sont des pays sous-développés et sont considérés par l'Organisation mondiale de la santé comme une maladie tropicale négligée. Plus de 350 millions de personnes vivent dans des zones où la transmission du parasite est récurrente (Murray, Berman et al. 2005). Chaque année, on estime que 1,5 à 2 millions d'humains développent une maladie symptomatique, et qu'environ 50 000 meurent, la plupart étant des enfants (Desjeux 2004). Les changements climatiques et la mobilité de la population peuvent contribuer à l'augmentation de l'activité du vecteur et, par conséquent, de l'incidence de la maladie (Antinori, Schifanella et al. 2012).

L'infection provoquée par *Leishmania* peut conduire à diverses manifestations cliniques selon les interactions complexes entre le parasite et la réponse immunitaire de l'hôte. La maladie est généralement divisée en trois catégories principales : cutanées, muco-cutanées, et viscérales. La leishmaniose cutanée est la forme la plus étudiée de la maladie, généralement apparaissant comme un ulcère ou nodule sur la peau qui peuvent avoir besoin de plusieurs mois ou années à guérir (Cecilio, Perez-Cabezas et al. 2014). Dans certains cas, ces ulcères peuvent devenir chroniques (Kroidl, Kroidl et al. 2014). Parmi les parasites donnant cette pathologie, on note *L. major*, *L. amazonensis* et *L. mexicana*. La grande majorité des cas de leishmaniose cutanée se retrouve en Afghanistan, en Arabie Saoudite, en Iran, en Syrie au Brésil et au Pérou (Desjeux 2004). Alors que la plupart des espèces de *Leishmania* provoquent des lésions confinées à de petites zones de la peau, quelques-uns, tel que *L. braziliensis*, causent des lésions diffuses qui peuvent même s'étendre à des tissus muqueux menant à la forme muco-cutanée de la maladie (Strazzulla, Cocuzza et al. 2013). Enfin, la leishmaniose viscérale, forme de leishmaniose la plus grave, est causée par *L. donovani* et *L. infantum*. Elle est caractérisée par la fièvre, la cachexie, l'hépatosplénomégalie et l'hypergammaglobulinémie. Dans ce cas, l'infection est chronique et affecte le foie, la rate, les ganglions et la moelle osseuse (Ready 2014). Le taux de mortalité, si non traité, peut atteindre le 100% dans certains pays. Dans les pays endémiques, *Leishmania* a pris de l'importance comme un pathogène opportuniste chez les patients immunodéprimés et atteints du VIH. (Okwor et Uzonna 2013).

Le diagnostic de la leishmaniose s'est raffiné avec le temps. Il est maintenant possible de confirmer la présence du parasite par des techniques moléculaires et sérologiques comme l'analyse de l'ADN du kinétoplaste ou des isoenzymes et la détection d'antigènes de *Leishmania* ou d'anticorps spécifiques (Kalter 1994). Toutefois, les méthodes classiques comme l'identification du promastigote en culture et de l'amastigote par l'examen microscopique de frottis de lésions cutanées ou de biopsies des organes infectés lors de leishmaniose viscérale tels la rate, les ganglions ou la moelle osseuse sont encore utilisés (Gazozai, Iqbal et al. 2010). Il n'existe aucun vaccin humain disponible pour le moment (Stockdale et Newton 2013). Néanmoins, la prévention de l'infection par la vaccination semble être une option viable, car dans les zones endémiques, la majorité des personnes infectées ne développent pas de symptômes cliniques et l'infection précédente conduit à une immunité contre le parasite (Kubba, Al-Gindan et al. 1987). En l'absence de vaccin, le contrôle de la maladie repose sur la prophylaxie et le traitement. Les options de traitement sont limitées, toxiques et douloureuses, à l'exception du miltefosine qui s'administre oralement dans des conditions ambulatoires (van Griensven, Balasegaram et al. 2010). La résistance aux médicaments est aussi une limitation croissante de certaines thérapies contre *Leishmania* (Yasinzai, Khan et al. 2013).

2.2 Anatomie et cycle de vie

Leishmania est un parasite protozoaire de la famille des *Trypanosomatidae*. On dénombre, dans cette famille, 30 espèces, dont 11 qui ont une importance médicale et vétérinaire significative (Bates 2007). Comme les autres membres de son ordre, les *Kinetoplastida*, il possède un kinétoplaste et se déplace à l'aide d'un flagelle. Le kinétoplaste est un regroupement d'ADN à l'intérieur de l'unique mitochondrie de la cellule (Lukes, Skalicky et al. 2014). En plus du kinétoplaste et du flagelle, l'organisme unicellulaire contient aussi un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, un noyau ainsi qu'un système de vésicules complexes. Celui-ci est composé d'endosomes, de lysosomes, d'acidocalcisomes, de glycosomes et d'autophagosomes comme démontré à la figure 5 (Field, Natesan et al. 2007). Ces parasites ont un cycle de vie complexe biphasique, avec quelques particularités, nécessitant un hôte vertébré et un insecte vecteur (Lukes, Skalicky et al. 2014).

Le tube digestif de la femelle *Phlébotomus* et *Lutzomyia* est colonisé par la forme extracellulaire du parasite, flagellé et mobile : le promastigote. Les parasites endémiques dans l’Ancien Monde, soit l’Asie, l’Afrique, l’Europe de l’Est, l’Inde et le Moyen-Orient, sont transmis par *Phlébotomus*, tandis que *Lutzomyia* transporte ceux retrouvés au Nouveau Monde, soit l’Amérique Centrale et du Sud (Bates 2007). Dans l’intestin des insectes, *Leishmania* subit plusieurs changements de développement qui aboutissent à la forme infectieuse du parasite: le promastigote métacyclique (Bates et Rogers 2004). Un échange de fluide, lors du repas de l’insecte infecté, injecte des parasites à l’intérieur de l’hôte (Killick-Kendrick, Leaney et al. 1977). Plusieurs phénomènes, qui seront décrits dans la section interaction hôte-pathogène, surviennent afin d’amener le parasite au macrophage. Malgré la phagocytose par le macrophage, *Leishmania* se différencie en amastigote et prolifère à l’intérieur du phagocyte (Duclos et Desjardins 2000). Lorsqu’un macrophage ne peut plus supporter l’infection, il entre en apoptose alors qu’un nouveau macrophage viendrait éliminer la cellule-hôte. Il n’y aurait donc pas d’amastigote en circulation (Real, Florentino et al. 2014). Comme décrit à la figure 6, le cycle continue lorsque la mouche prend un repas sanguin et transporte le parasite vers de nouvelles cibles d’infections. À l’intérieur du tube digestif de l’arthropode, *Leishmania* passe par la métacyclogénèse pour revenir en promastigote (Kaye et Scott 2011).

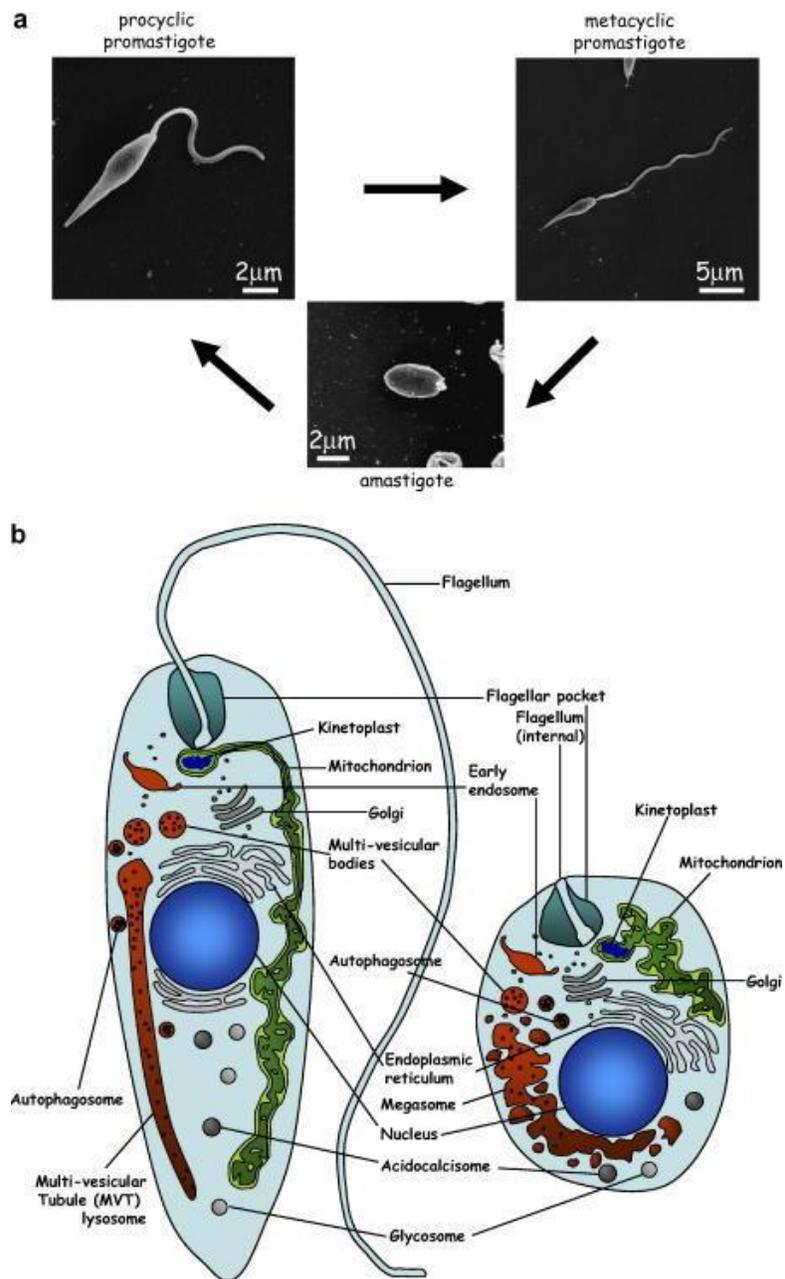


Figure 5 : Représentation du promastigote et de l'amastigote.

Suite à la différenciation du promastigote en amastigote, le parasite perd son flagelle (Besteiro, Williams et al. 2006).

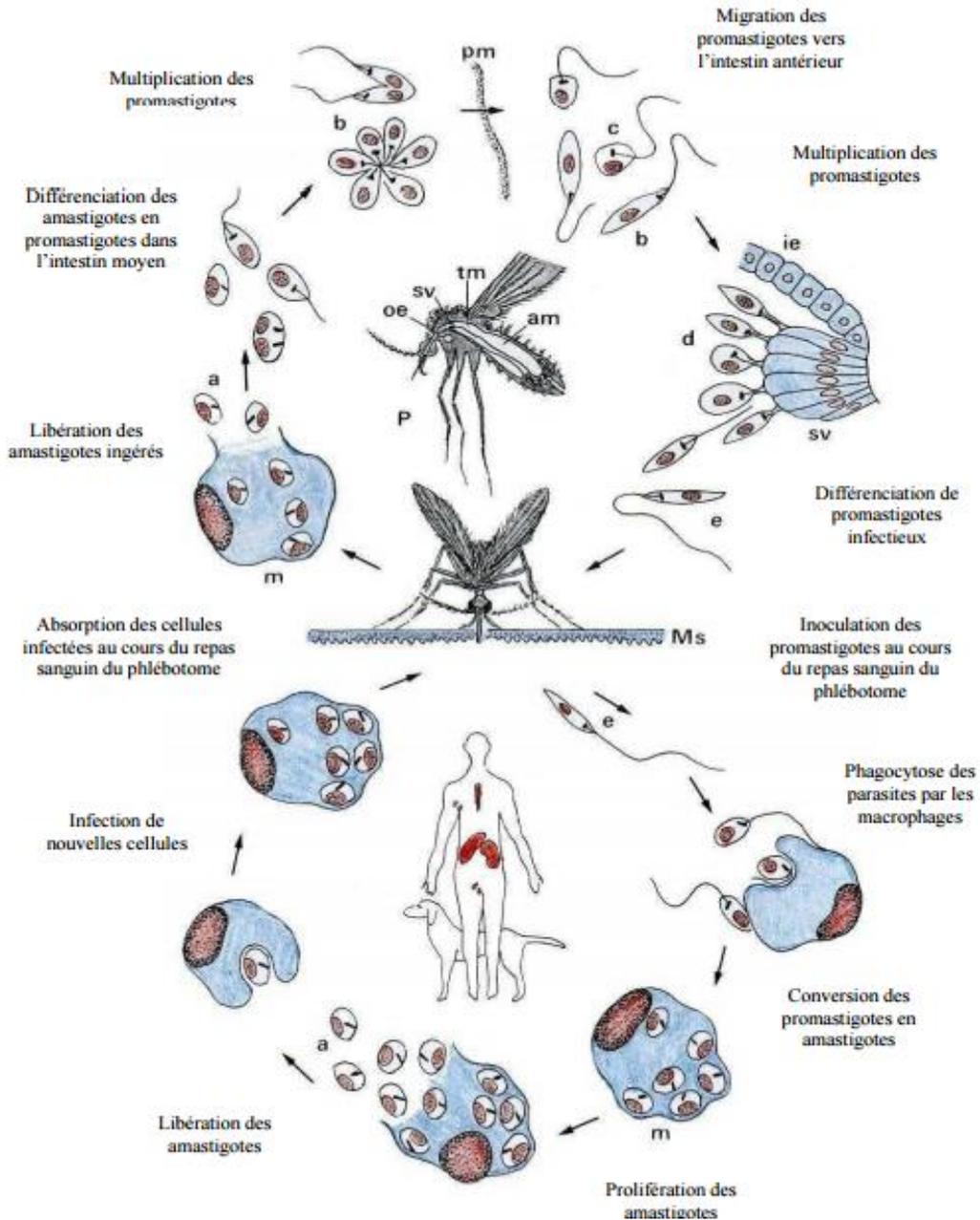


Figure 6 : Cycle de vie de *Leishmania*

Le parasite passe de l'amastigote au promastigote dans le vecteur et du promastigote à l'amastigote dans les macrophages de l'hôte (Rostan, Robert-Gangneux et al. 2013).

2.3 Facteurs de pathogénèse

2.3.1 LPG

Leishmania synthétise divers glycoconjugués associés à la virulence, le plus notable appartenant à la famille des phosphoglycans (Descoteaux, Luo et al. 1995). Ces phosphoglycans ont en commun une structure unique qui ne se retrouve pas chez les mammifères, à savoir le disaccharide-phosphate Gal(β 1,4)Man(α 1-PO₄→6) (Descoteaux et Turco 1999). Ces glycoconjugués uniques peuvent être soit sécrétés comme le phosphoglycan, le proteophosphoglycan et la phosphatase acide soit liés à la membrane comme le lipophosphoglycan (LPG) (Descoteaux et Turco 1999). Le LPG est le glycoconjugué le plus abondant de la surface, avec 5 millions de copies par cellule, et forme un glycocalyx dense en recouvrant la surface du parasite entier. Cette molécule est spécifique au stade promastigote (Turco et Sacks 1991). Structurellement, le LPG se compose d'un polymère d'unités répétées de Gal(β 1,4)Man(α 1-PO₄→6), lié par une ancre glycan à 1-O-alkyl-2-lyso-phosphatidyl(myo)inositol(PI) ou GPI (Descoteaux et Turco 1999). Le nombre d'unités de répétition varie de 16 à 30 par molécule de LPG en fonction du stade de développement promastigote (procyclique vs métacyclique) et des espèces (Moradin et Descoteaux 2012). L'ancre GPI est largement conservée parmi les espèces de *Leishmania* (McConville et Blackwell 1991)

Contrairement au type sauvage, les promastigotes de *L. donovani* sans LPG sont incapables de modifier la maturation des phagosomes (Desjardins et Descoteaux 1997). Ces résultats sont cohérents avec l'observation que l'amastigote, qui ne synthétise pas de LPG, est internalisé dans les compartiments qui acquièrent des caractéristiques lysosomales. D'autres études ont révélé l'importance de la longueur de la partie de l'unité de répétition de LPG. Par conséquent, un mutant chez *L. donovani* exprimant des formes tronquées de LPG avec seulement 3 à 5 motifs répétitifs est incapable d'inhiber la fusion phagosome-endosome (Desjardins et Descoteaux 1997). En revanche, le niveau de complexité structurelle de ce fragment, telle que la présence de chaînes latérales oligosaccharidiques, n'a aucune incidence sur les propriétés membranaires. En effet, un mutant de *L. major* sans chaîne latérale dans son LPG n'a pu nuire à la fusion entre phagosome et endosome à la même mesure que le type sauvage (Dermine,

Scianimanico et al. 2000). Son mécanisme d'action sera décrit dans la section *Interaction hôte-pathogène*.

2.3.2 GP63

La métalloprotéase à zinc nommé glycoprotéine 63 (GP63) ou leishmanolysin est retrouvée à la surface du parasite et a été découverte en 1980 (Olivier, Atayde et al. 2012). Elle est décrite génétiquement et biochimiquement comme un antigène de surface majeur exprimé sur des promastigotes de *Leishmania* à partir de diverses espèces et comme ayant une large gamme de substrats, y compris la caséine, la gélatine, l'albumine, l'hémoglobine, et le fibrinogène (Yao, Donelson et al. 2003). Cette protéase appartient à la classe de metzincin dont les membres comprennent un motif HExxHxxGxxH et un propeptide N-terminal qui rend la proenzyme inactive pendant la traduction qui est retirée lors de la maturation et l'activation (Schlagenhauf, Etges et al. 1998). Son pH optimal peut varier selon les espèces. Celle de *L. major* a une activité optimale à pH neutre à alcalin, tandis que celle de *L. mexicana* est plus active à pH acide (pH 4) (Bouvier, Schneider et al. 1990, Ip, Orn et al. 1990). Des résidus spécifiques ne sont pas strictement nécessaires, bien que GP63 a une préférence pour le clivage du côté amine d'un résidu hydrophobe en position P1 et un résidu d'acide aminé basique en P2. Un résidu de tyrosine est souvent présent sur le site de P1 (Bouvier, Bordier et al. 1989).

La GP63 est abondante dans les promastigotes, mais a été montrée pour être régulée à la baisse dans les amastigotes (Voth, Kelly et al. 1998). On estime qu'il y a plus de 500 000 molécules de GP63 sur la surface du promastigote de *L. mexicana* (Bouvier, Etges et al. 1985). Des études structurales indiquent que GP63 existe sous forme d'homodimère, et des formes à la fois amphiphiles et hydrophiles ont été trouvées (Bouvier, Bordier et al. 1989). Dans le cas de plusieurs espèces comme *L. chagasi*, *L. major* et *L. mexicana* plusieurs classes distinctes de leishmanolysin ont été identifiées. Celles-ci diffèrent principalement dans leurs régions codantes C-terminal, leurs régions non traduites en 3 '(UTR) et, dans certains cas, leur expression différentielle pendant le cycle de vie (Ramamoorthy, Donelson et al. 1992, Medina-Acosta, Karess et al. 1993, Voth, Kelly et al. 1998). La famille Trypanosomatidae a souvent une série de gènes en tandem codant pour des protéines abondantes. Les ARN précurseurs polycistroniques sont transformés en ARNm par des réactions couplées résultant d'un transépissage d'une séquence de 39 nucléotides en épingle à cheveux sur l'extrémité 5' du gène et la

polyadénylation de l'extrémité 3' du gène (Matthews, Tschudi et al. 1994, Hummel, Gillespie et al. 2000). Toutes les souches de *Leishmania* examinées à ce jour ont de multiples gènes en tandem codant la GP63. Toutefois, leur disposition dans le génome diffère entre les différentes souches comme démontré à la figure 7. Il y a au moins 18 gènes en tandem codant GP63 dans *L. chagasi* qui se répartissent en trois classes (MSPL, MSPS, MSPC) en fonction de leur 3'UTRs unique et expression différentielle pendant le cycle de vie du parasite (McCoy, Beetham et al. 1998).

Dans *L. mexicana*, un tandem de dix gènes GP63 tombe dans trois catégories (C1, C2 et C3) en fonction de leurs structures d'ADNc et 3'UTRs. Les groupes de gènes C1 et C2 contiennent cinq et quatre exemplaires, respectivement, tandis que C3 est un gène à copie unique (Medina-Acosta, Kares et al. 1993). Sous la forme promastigote, on retrouve l'ARNm des trois classes, alors que chez l'amastigote, on détecte seulement celui de la classe C1 (Yao, Donelson et al. 2003). Dans *L. major*, il y a sept gènes GP63. Les gènes 1 à 5 sont agencés dans un réseau en tandem, alors que le gène 6 est 8 kb en aval des autres et suivis par le septième gène (Joshi, Kelly et al. 2002). Ces gènes sont exprimés de façon différentielle au cours du cycle de vie du parasite. Les gènes 1 à 5 sont exprimés seulement dans le stade promastigote, le sixième est exprimé dans les deux, promastigotes et amastigotes, et l'expression du gène 7 prédomine dans l'amastigotes et en phase stationnaire tardive de la croissance du promastigote (Voth, Kelly et al. 1998). Ainsi, chaque *Leishmania* a de multiples gènes dans des tandems qui codent pour ses GP63.

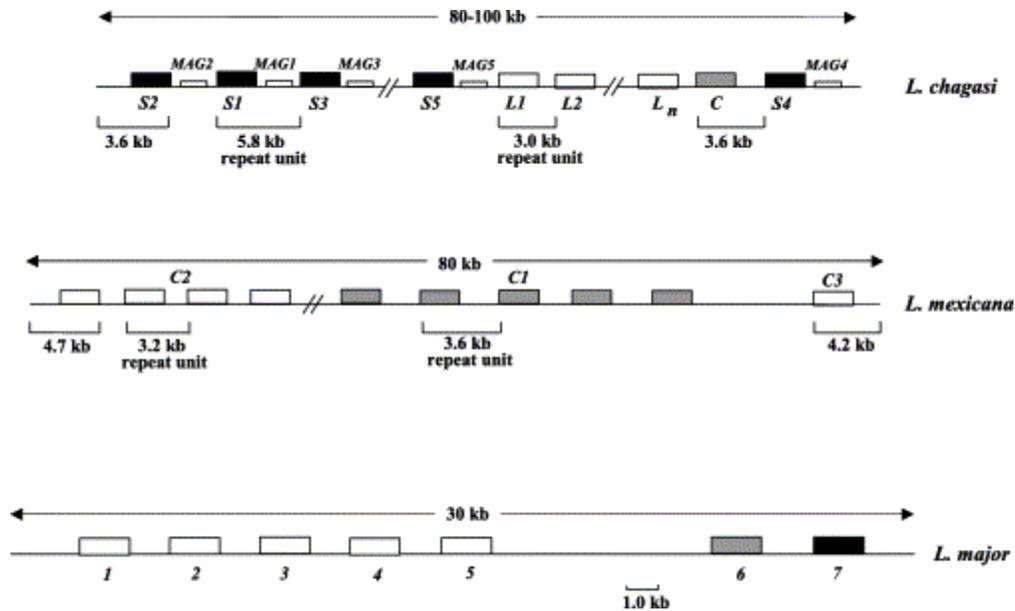


Figure 7 : Organisation génomique GP63 selon différentes espèces (Yao et al, 2003).

L'expression différentielle de GP63 dans les amastigotes par rapport aux promastigotes est régulée par des séquences uniques en aval des gènes de GP63. En effet, les UTR en aval et les régions intergéniques (RI) régulent souvent l'expression de gènes en tandem chez les protozoaires trypanosomatides (Yao, Donelson et al. 2003). Des études avec *L. major* ont démontré que les UTR et RI ont un rôle pour déterminer le moment d'expression du gène. Par exemple, lorsque qu'on interchange les régions UTR et RI du gène de GP63 numéro 3 et 6, le numéro 3 devient exprimé sous la forme promastigote et amastigote tandis que le numéro 6 devient seulement exprimé sous la forme promastigote (Kelly, Nelson et al. 2001).

Chez *L. chagasi*, les trois classes de gènes GP63 sont constitutivement transcrites tout au long de la croissance. L'abondance de chaque classe d'ARNm doit donc être régulée de façon post-transcriptionnelle (Ramamoorthy, Swihart et al. 1995). Cette augmentation d'expression se produit en améliorant la stabilité d'ARNm de MSPL, plutôt que d'augmenter le taux de transcription du gène. Les temps de demi-vie des ARNm de GP63 de phase logarithmique sont soumis à un raccourcissement progressif en fonction de la phase de croissance. En phase logarithmique, le temps de demi-vie est entre 65 et 105 minutes. En phase intermédiaire, le temps de demi-vie est entre 7 et 25 minutes, tandis qu'en phase stationnaire, l'ARNm est indétectable (Wilson, Paetz et al. 1993). Il y a au moins 2 mécanismes qui permettent de

contrôler la stabilité de l'ARNm de GP63. L'un est activé au cours de la croissance cellulaire et l'autre le serait avec une protéine labile qui régule négativement la stabilité de l'ARNm (Brittingham et al, 2001).

GP63 contient une séquence signal à l'extrémité N-terminale pour la cibler au RE pour sa synthèse. Cependant, moins de 1,5% du total de GP63 est retrouvé au RE et environ 75% sont sur la surface du parasite (Ellis, Sharma et al. 2002). Contrairement aux levures et plusieurs autres eucaryotes, la synthèse des sphingolipides en cours n'est pas requise pour le transport de protéine à ancre GPI à la surface des cellules. Toutefois, le transport est significativement réduit par une température basse (4 et 10 °C), ce qui suggère qu'un mécanisme de transport vésiculaire peut être impliqué (Ralton, Mullin et al. 2002). De plus, la glycoprotéine est concentrée dans les radeaux lipidiques (Denny, Field et al. 2001). Les vésicules excrétées de *L. donovani*, les exosomes, pourraient fusionner une fois dans le phagosome du macrophage et libérer son contenu dans le cytoplasme de cellules infectées. Par conséquent, le mouvement rapide de GP63 au sein du cytoplasme des macrophages pourrait provenir de ce phénomène et représente une autre voie d'entrée de GP63 dans l'environnement de macrophage (Silverman, Clos et al. 2010a). GP63 a un énorme impact sur la signalisation à l'intérieur du macrophage et la sécrétion de cytokines qui permettront au parasite d'infecter l'hôte (Olivier, Atayde et al. 2012). GP63 agit aussi à l'extérieur du macrophage. Par exemple, GP63 migre à la matrice extracellulaire et dégrade le collagène IV et la fibronectine (McGwire, Chang et al. 2003). Des études ont montré que GP63 clive Dicer1, qui est un processeur de pré-miARN, inhibant la formation de miRNP dans les cellules hépatiques infectées (Descoteaux, Moradin et al. 2013, Ghosh, Bose et al. 2013). L'expression de miR-122 est spécifique au foie et est un régulateur du métabolisme des acides gras. La restauration de miR-122 dans le foie de souris infectées augmente le cholestérol sérique et réduit la charge parasitaire du foie (Ghosh, Bose et al. 2013). Le mécanisme d'action sera décrit dans la section *Interaction hôte-pathogène*.

2.3.3 CPB

La cathepsine L est un membre de la superfamille de mammifère de la papaïne, qui comprend la plus grande famille de protéases à cystéine identifiée à ce jour (Berti et Storer 1995). La cathepsine L est généralement une protéine lysosomale impliquée dans la dégradation des protéines, bien que l'enzyme sécrétée ait été impliquée dans un certain nombre de processus

physiologiques, y compris la résorption osseuse, l'invasion tumorale et l'arthrite (Mottram, Frame et al. 1997). La protéine est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif qui est activé par l'élimination de l'extension propeptide NH₂-terminale dans le compartiment prélysosomal pour produire une enzyme mature à chaîne unique. Le propeptide est un puissant inhibiteur de l'activité de l'enzyme à travers sa liaison au site actif maintenant ainsi la protéinase sous une forme inactive pendant la traite vers le lysosome (Coulombe, Grochulski et al. 1996). Des cathepsines L-like ont été caractérisées à partir d'un large éventail d'eucaryotes, y compris quelques protistes qui sont censés former les premières branches de l'arbre eucaryote (Berti et Storer 1995). Il y a beaucoup de cathepsine L-like de cystéine dans les parasites protozoaires; souvent, elles sont très abondantes et, dans certains cas, elles se retrouvent dans des endroits cellulaires inhabituels comme à la surface ou même sécrétées (Robertson, Coombs et al. 1996). La forme mature de ces peptidases est principalement limitée aux grands lysosomes, appelés megasomes dans l'amastigotes, elles sont situées dans le tubule multivésiculaire du promastigote. Une étude sur les effets des inhibiteurs de protéases à cystéine sur *Trypanosoma cruzi* a montré qu'il y avait une accumulation de pro-enzyme dans des vésicules du « late-golgi », ce qui suggère que le clivage du pro-domaine est nécessaire pour un trafic réussi vers les lysosomes (Engel, Doyle et al. 1998). En outre, il a été montré que le pro-domaine est à la fois nécessaire et suffisante pour cibler l'enzyme au lysosome à la fois chez *Leishmania* et *T. cruzi* (Huete-Perez, Engel et al. 1999). Néanmoins, les mécanismes de transformation et le trafic des protéases à cystéine dans ces parasites restent incertains (Engel, Torres et al. 2000). Toutefois, le chemin vers la maturation et l'activation des CP de *L. mexicana* vers les lysosomes est inhabituel, impliquant la pochette flagellaire et la façon dont l'enzyme pourrait agir dans le cytoplasme reste inconnu (Brooks, Tetley et al. 2000).

À ce jour, la majorité des études sur les cystéines protéases (CP) de *Leishmania* ont concernées quelques enzymes, désignées CPA, CPB et CPC, qui sont tous de la superfamille des papaines et appartiennent au même groupe de CP désigné clan CA. La Famille C1 contient la CPA et la CPB, qui sont des cathepsines L-like et la CPC qui est une cathepsine B-like (Mottram, Coombs et al. 2004). La CPB se différencie des autres CP avec une extension de 100 acides aminés C-terminal et existe en plusieurs isoenzymes, qui sont codées par un réseau de gènes CPB similaires, situés dans un seul locus (19 gènes dans *L. mexicana* et 8 gènes dans *L. major*) comme démontré à la figure 8. (Brooks, Denise et al. 2001). Les deux premiers gènes, CPB1 et CPB2, diffèrent sensiblement des 17 copies restantes (CPB3 à CPB19) dans le fait

qu'ils sont exprimés sous la forme promastigote exclusivement et qu'ils n'ont pas le prolongement C-terminal (CTE) de 100 acides aminés. Lors des travaux de caractérisation de CPB chez *L. mexicana*, il a été impossible de différencier les copies 4 à 17. Par contre, ils sont tous d'une longueur de 2,8 kb et c'est pourquoi ils se nomment CPB2.8 (Mottram, Frame et al. 1997). Toutefois, seul un pH acide est nécessaire pour l'expression des copies sous la forme amastigote (Ke, Mauel et al. 1998). Les isoenzymes diffèrent dans les préférences de substrat et dans la capacité de restaurer la perte de la virulence associée à la délétion de CPB (Mottram, Frame et al. 1997). Tout comme GP63, les copies de CPB se suivent les unes aux autres et l'expression de ceux-ci dépend des régions intergéniques. Il est alors possible d'enlever les 19 copies de CPB afin d'étudier son rôle durant l'infection. Cette méthode a permis de voir que la CPB a un rôle dans la virulence de *Leishmania* (Mottram, Souza et al. 1996). Comme chez les grands eucaryotes, les cathepsines de *Leishmania* servent à l'autophagie. De plus, la metacyclogénèse a besoin de l'autophagie pour s'effectuer. C'est pourquoi les parasites sans CPB ne peuvent compléter leur cycle de différenciation en promastigote métacyclique. L'autophagie chez *Leishmania* lui permet aussi de résister à l'environnement hostile du macrophage (Williams, Tetley et al. 2006). La CPB a un impact sur la signalisation du macrophage par le clivage de NF- κ B afin de permettre au parasite d'infecter l'hôte (Mottram, Coombs et al. 2004). Dû à son importance dans l'infection, la CPB est une cible de choix pour la recherche. Puisqu'elle est régulée à la hausse sous la forme amastigote, plusieurs modèles de vaccin utilisant la CPB sont en développement. Plusieurs tests sont élaborés avec des vaccins à ADN du gène ou d'autres utilisent le gène couplé avec une nanoparticule de lipide (Doroud, Zahedifard et al. 2011). La CPB sert aussi pour le diagnostic de la leishmaniose. Il suffit de faire une réaction PCR contre CPB dans un échantillon de lésion et il est possible de déterminer non seulement s'il s'agit de leishmaniose, mais si oui, de quelle espèce il s'agit (Kuru, Janusz et al. 2011). Son mécanisme d'action sera décrit dans la section *Interaction hôte-pathogène*.

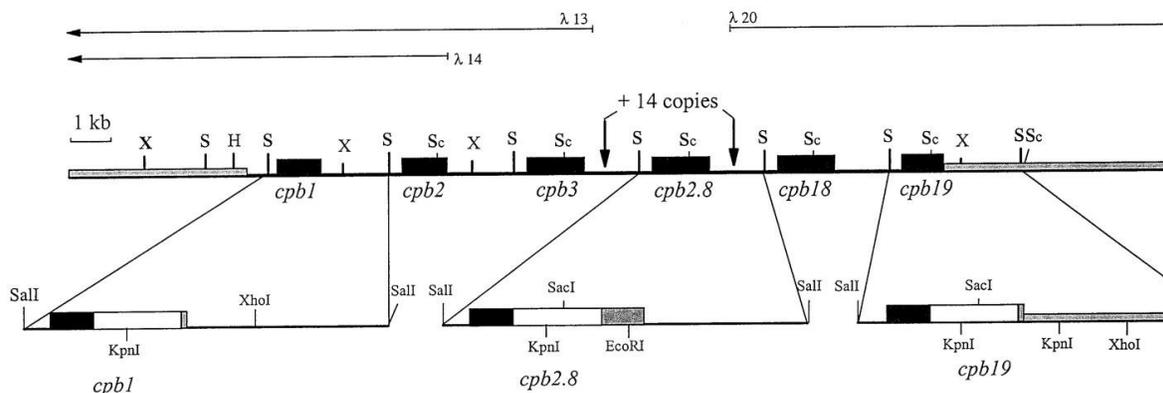


Figure 8 : Organisation génomique de CPB chez *L. mexicana* (Mottram et al, 1997)

Tableau 1. Rôle connu de différents facteurs de virulence

| Facteur de virulence | Espèces | Rôle | Mécanisme |
|---------------------------------------|--|--|---|
| LPG | <i>L. major</i> | Inhibition de la lyse médiée par le complément | Prévention de l'attachement du C5b-C9 au parasite |
| | <i>L. donovani</i> <i>L. mexicana</i> | Promotion de la phagocytose | Interaction avec les protéines C-réactive et liaison avec les récepteurs de phagocytose |
| | <i>L. donovani</i> | Retarde la maturation du phagolysosome | Inhibition du recrutement de la V-ATPase et blocage de la fusion avec les endosomes |
| | <i>L. donovani</i> <i>L. major</i> | Réduction des réactifs oxydatifs | Inhibition de la production de ROS Récupération des ROS |
| | GP63 | <i>L. major</i> <i>L. infantum</i> | Inhibition de la lyse médiée par le complément |
| <i>L. major</i> <i>L. donovani</i> | | Promotion de la phagocytose | Le produit de désactivation de C3b se colle au parasite et au récepteur de phagocytose |
| <i>L. major</i> | | Prévention de la lyse par le phagosome | Dégradation protéolytique des peptides antimicrobiens |
| <i>L. amazonensis</i> | | Réduction des réactifs oxydatifs | Inhibition de la production de ROS |
| <i>L. major</i> [*] | | Altération des fonctions du macrophage | Dégradation de molécules de signalisation comme MARCKS, CAS, mTOR et NF-κB |
| CPB | | <i>L. mexicana</i> [*] | Diminution de la réponse Th1 |
| | Augmentation de la réponse Th2 | | Clivage d'IL-2R et IgER et induction d'IL-4 et IgE |

Tiré de (Cecilio, Perez-Cabezas et al. 2014), ^{*}(Mottram, Coombs et al. 2004)^{*}(Olivier, Atayde et al. 2012)

CHAPITRE 3 : INTERACTION HÔTE-PATHOGÈNE

3.1 L'entrée

Lors de l'entrée du parasite dans les tissus de l'hôte, la présence de parasites morts est essentielle au développement de l'infection. Les souris BALB/c, normalement sensibles à l'infection par *Leishmania*, ne le sont plus lorsque seulement des parasites sont injectés de façon sous-cutanée (van Zandbergen, Bollinger et al. 2006). La nécessité de parasites morts dans l'inoculum infectieux est liée à l'exposition de la phosphatidylsérine (PS) dans le feuillet externe de la membrane cytoplasmique des parasites. L'exposition de ce phospholipide permet une invasion silencieuse, ce qui induit la production de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- β et l'IL-10 (Wanderley, Thorpe et al. 2013).

Même si le macrophage est la cellule hôte clé dans l'infection, le neutrophile de par sa présence et son abondance, est la première cellule immunitaire en contact avec le parasite. Deux heures après l'infection de souris C57BL/6 avec *L. major*, les neutrophiles y sont principalement trouvés (Peters, Egen et al. 2008). Cette infiltration de granulocytes a également été observée lors de l'infection soit intradermique de souris soit BALB/c ou C57BL/6 avec *L. infantum* et *L. major*, respectivement ainsi que sous-cutanée après l'infection par *L. amazonensis* ou *L. major* (Beil, Meinardus-Hager et al. 1992). Normalement, les neutrophiles en circulation ont un temps de vie de 6 à 8 heures, mais *Leishmania* est capable de retarder leur apoptose jusqu'à 24 heures de plus (Aga, Katschinski et al. 2002, Summers, Rankin et al. 2010). Le retard dans le processus d'apoptose des neutrophiles infectés est lié à une inhibition de la transformation de la pro-caspase-3, et la diminution consécutive de la caspase 3, un exécuteur de l'apoptose bien connu dans les neutrophiles (Aga, Katschinski et al. 2002). Aussi, il a été prouvé que *L. major*, en augmentant la phosphorylation d'ERK1/2, augmente la quantité de protéines anti-apoptotiques comme Bfl-1 et Bcl-2 et diminue l'activation des caspases (Sarkar, Aga et al. 2013). De plus, l'inhibition de la maturation de Bid ainsi que la répression de l'expression de Fas sont remarquées chez les neutrophiles infectés par *L. major*. Le retard de l'apoptose des neutrophiles pourrait protéger le parasite jusqu'à l'arrivée des cellules présentatrices d'antigènes soit le macrophage et la cellule dendritique (Sarkar, Aga et al. 2013). Suite à la mort du neutrophile, des chimiokines sont sécrétées par lui-même afin d'attirer le macrophage. Celui-ci,

phagocytant une cellule apoptotique sécrètera des cytokines anti-inflammatoires telles TGF- β et IL-10. Ce déséquilibre vers les cytokines anti-inflammatoires permettra aussi au parasite libre d'entrer par phagocytose sans déclencher un état d'alerte (van Zandbergen, Klinger et al. 2004). Toutefois, une très grande partie de l'entrée du parasite dans le macrophage se fait par une phagocytose classique. Plus précisément, le promastigote est reconnu par différents récepteurs soit : CR1, CR3, MFR, TLR2, TLR9, récepteur de fibronectine et autres récepteurs de glycoconjugué (Mosser et Rosenthal 1993, Martinez-Salazar, Berzunza-Cruz et al. 2008). Le reste de l'internalisation se produit comme décrit dans la section sur la phagocytose. Une fois entré dans le macrophage, le parasite pourra débuter sa transformation en amastigote. Pour ce faire, il aura besoin de prendre le contrôle du macrophage en modulant la maturation du phagosome et en maintenant le macrophage en vie (Moore et Matlashewski 1994). Ce prolongement de la survie du macrophage se fait de plusieurs façons. *L. amazonensis* prévient la cytolysse induite par l'ATP en relâchant la NdK, un nucléoside diphosphate kinase qui abaisse le niveau d'ATP extracellulaire. Comme chez le neutrophile, la voie ERK1/2 joue un rôle pour empêcher le macrophage de mourir par la voie de mort cellulaire programmée, l'apoptose (Kolli, Kostal et al. 2008). *Leishmania* possède un orthologue de MIF, « macrophage inhibiting factor », qui induit l'activation des kinases d'ERK1/2 (Kamir, Zierow et al. 2008). De plus, le parasite empêche l'activation de la caspase-3 et provoque la rétention du cytochrome C en désactivant Bad (Akarid, Arnoult et al. 2004). Le moyen demeure toujours inconnu, mais il a été démontré que le lipophosphoglycan est aussi impliqué dans le délai de l'apoptose (Donovan, Maciuba et al. 2009). Toutefois, l'apoptose reste inévitable. Chez *L. amazonensis*, il a été prouvé que le parasite se fait transférer du macrophage en voie de mort à un nouveau macrophage sans s'exposer au milieu extracellulaire (Real, Florentino et al. 2014). Les transferts des parasites par les cellules phagocytiques sont représentés à la figure 9.

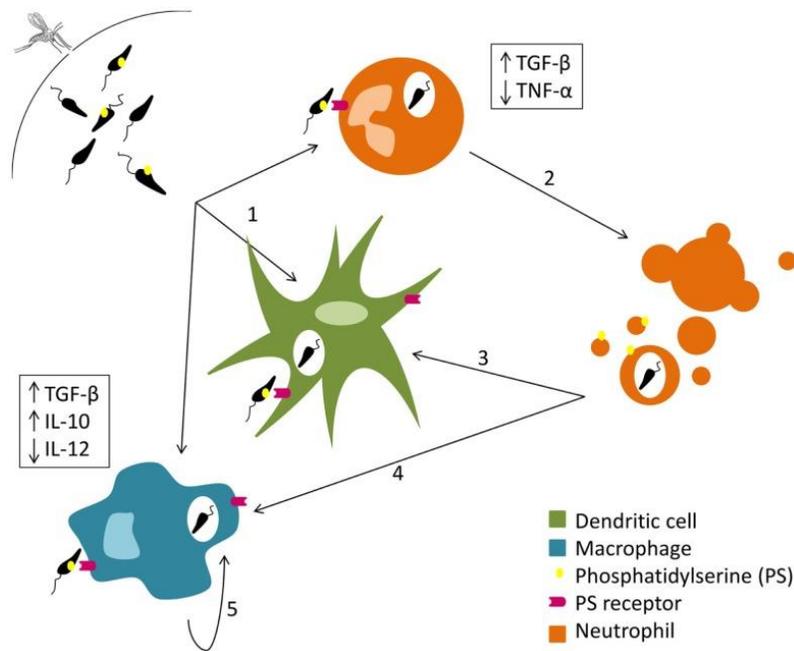


Figure 9. Schéma de l'entrée du parasite jusqu'au macrophage (Cecilio, Perez-Cabezas et al. 2014).

Bloquer l'apoptose est un grand atout pour la survie du parasite, par contre, le parasite doit empêcher sa destruction par le système immunitaire de l'hôte. Une fois entrée dans le sang du mammifère, *Leishmania* doit bloquer sa lyse par le complément (Naderer, Vince et al. 2004). Le LPG, qui est abondant sur la surface du promastigote, bloque physiquement l'attachement du complément sur le parasite (Spath, Garraway et al. 2003). En plus, GP63 clive C3b et l'empêche de former son complexe actif avec C5 (Joshi, Kelly et al. 2002). Sans ces deux facteurs de virulence, la majorité des parasites sont tués par le complément après 2,5 minutes (Dominguez, Moreno et al. 2002). Malgré tout, le meilleur moyen du parasite pour éviter le complément reste d'entrer dans les cellules phagocytiques. De plus, la partie clivée de C3b, l'iC3b, peut quand même se lier au parasite et ainsi agir d'opsonine pour favoriser sa phagocytose (Brittingham, Morrison et al. 1995). L'iC3b est toujours capable de se lier au récepteur du complément 3, le CR3. Cette liaison diminue la production IL-12 par le macrophage. Ce qui permet encore une fois de réduire l'alerte lors de l'entrée du parasite dans le macrophage (Marth et Kelsall 1997).

3.2 Survie intracellulaire

Une fois dans le phagosome, le parasite, toujours sous la forme promastigote, doit moduler la biogenèse du phagolysosome. Ce compartiment très acide et hydrolytique représente un autre défi afin de survivre. Le LPG présent sur *L. donovani* et *L. major* retient la small GTPase Cdc42, ce qui forme une accumulation d'actine périphagosomale et ainsi empêche la fusion avec les endosomes tardifs et les lysosomes (Desjardins et Descoteaux 1997). Aussi, en s'insérant dans les radeaux lipidiques du phagosome, le LPG bloque le recrutement de la PKC- α , dont la fonction est de dépolymériser l'actine (Holm, Tejle et al. 2001). Dans le cas de *L. donovani*, il a été montré que le LPG altère l'association de synaptotagmine V à la membrane du phagosome inhibant le recrutement de la V-ATPase et la prévention de l'acidification du phagosome (Vinet, Fukuda et al. 2009). Par contre, au niveau des vacuoles communes faites par *L. mexicana* et *L. amazonensis*, le rôle du LPG reste à prouver (Real, Mortara et al. 2010). Des études avec *L. amazonensis* ont révélé que les phagosomes contenant les promastigotes fusionnent avec les endosomes tardifs/lysosomes dans les 30 minutes après l'infection (Courret, Frehel et al. 2002). A ce stade, les parasites se trouvent dans les petits compartiments individuels. Entre 18 à 24 heures plus tard, on observe les vacuoles communes contenant plusieurs parasites. L'augmentation rapide de la taille de ces phagosomes nécessite une fusion avec les lysosomes secondaires, ce qui provoque l'épuisement de ces organites (Alexander et Vickerman 1975, Barbieri, Brown et al. 1985, Real, Pouchelet et al. 2008). La fusion homotypique entre les phagosomes contenant *L. amazonensis* se produit également, mais sa contribution à l'élargissement de la vacuole doit encore être étudiée (Real et Mortara 2012). Les fusions membranaires médiées par les SNAREs jouent un rôle important dans la phagocytose et la maturation du phagosome, en régulant les interactions entre phagosomes et organites d'endocytose (Stow, Manderson et al. 2006). Il est donc probable que des SNAREs d'endocytose soient impliquées dans la biogenèse et l'expansion des grandes vacuoles communes. Fait intéressant, les SNAREs associées au réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi sont présents sur les vacuoles contenant *L. amazonensis* et leur inhibition provoque la perte de la réplication du parasite et de l'élargissement de la vacuole (Ndjamen, Kang et al. 2010, Canton et Kima 2012, Canton, Ndjamen et al. 2012b). De plus, plusieurs avancent l'hypothèse que l'élargissement de la vacuole diminuerait assez la concentration des enzymes hydrolytiques pour permettre la survie du promastigote (Canton et Kima 2012). Il y a d'autres composants du système immunitaire inné que le parasite doit combattre et ceux-ci sont les peptides antimicrobiens apportés par les lysosomes. Ce sont des protéines cationiques qui

altèrent la membrane cellulaire des agents pathogènes pour mener à une lyse osmotique de ces derniers (Guani-Guerra, Santos-Mendoza et al. 2010). Par exemple, la cathelicidin peut éliminer jusqu'à 50% des parasites *L. major* et *L. amazonensis*. Heureusement pour *Leishmania* la métalloprotéase GP63 permet de cliver ces protéines antimicrobiennes (Kulkarni, McMaster et al. 2006).

Il n'y a pas seulement les peptides qui sont dangereux pour le promastigote. Les réactifs oxydants sont très importants pour le macrophage dans l'élimination des agents pathogènes. Les souris déficientes en NADPH-dépendante oxydase (NOX) sont plus susceptibles aux infections par *L. donovani* et *L. major* (Murray et Nathan 1999, Blos, Schleicher et al. 2003). L'oxyde nitrique (NO) synthétisé à partir de la conversion de l'arginine en citruline, par la nitric oxide synthase (NOS) est crucial dans la destruction du parasite (Gostner, Becker et al. 2013). Par conséquent, le parasite a besoin de neutraliser ces agents réactifs et/ou prévenir leur production pour éviter une mort par le stress oxydatif (Gostner, Becker et al. 2013). La cytokine inflammatoire TGF- β , produite par les phagocytes infectés par *Leishmania*, détourne le métabolisme de la L-arginine vers la production de la L-ornithine par l'activation de l'arginase (Boutard, Havouis et al. 1995). Ce changement métabolique conduit à une diminution de la production de NO favorisant la croissance intracellulaire de *Leishmania* (Inieta, Gomez-Nieto et al. 2002). Les composantes de surface peuvent également jouer un rôle dans la protection contre les ROS chez *Leishmania*. Le LPG empêche la génération de ROS par l'inhibition du recrutement de NOX à la membrane du phagosome (Lodge, Diallo et al. 2006). En plus, *Leishmania* utilise aussi des mécanismes antioxydants intrinsèques, dont les composants les plus importants sont la trypanothione synthase et la trypanothione réductase. Ce dernier est essentiel pour la lutte contre le ROS et NOS (Tovar, Cunningham et al. 1998). D'autres enzymes telles les peroxydases, la pteridine réductase et la superoxyde dismutase sont également nécessaires à la survie du parasite (Castro, Sousa et al. 2002).

3.3 Modulation de la réponse immunitaire

3.3.1 Cytokines

Les cytokines sont des médiateurs de signalisation cellulaire qui affectent la fonction des cellules de façon autocrine, paracrine ou endocrine. Interférer avec la production de cytokines est un moyen efficace que le parasite peut utiliser pour la modulation de la fonction immunitaire (Nylen et Gautam 2010). Il est généralement admis que la production d'IL-12, par les macrophages et les cellules dendritiques, est associée à la résistance contre *Leishmania* (Guler, Afshar et al. 2011). Cette cytokine induit la maturation des cellules T naïves vers un phénotype produisant des lymphocytes Th1 (résistantes à l'infection), qui induit l'activation des macrophages M1 et l'élimination des parasites (Diaz-Gandarilla, Osorio-Trujillo et al. 2013). Les cytokines Th2, à savoir l'IL-4 en ce qui concerne la leishmaniose cutanée et l'IL-10 et TGF- β dans le cas de maladie viscérale, ont été liées à une sensibilité et à une progression de la maladie. Ces cytokines induisent un phénotype de macrophage M2 (Mia, Warnecke et al. 2014). Par conséquent, les parasites semblent moduler la réponse immunitaire vers un phénotype Th2 (McMahon-Pratt et Alexander 2004). Le paradigme Th1 / Th2 indique que les cellules Th1 et Th2 se contre-régulent (Muraille et Leo 1998). Cela implique que la polarisation induite par *Leishmania* de la réponse immunitaire vers un phénotype Th2 supprimerait une réponse immunitaire de type Th1 (Nylen et Gautam 2010).

Étant un pathogène intracellulaire, *Leishmania* dépend du recrutement initial des cellules hôtes pour l'établissement et la progression de l'infection. Les chimiokines sont de petites protéines qui induisent et régulent la migration des cellules immunitaires (Teixeira, Teixeira et al. 2006). Par contre, leur expression est connue pour être modulée par *Leishmania*. Plusieurs études ont rapporté une régulation à la hausse de nombreuses chimiokines (RANTES / CCL5, MIP-1 α / CCL3, IP-10 / CXCL10, MCP-1 / CCL2, MIP-1 β / CCL4, MIP-2 / CXCL1, IL-8 et / CXCL8) après l'inoculation de *L. major*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. infantum* et *L. panamensis* (Cecilio, Perez-Cabezas et al. 2014). Par ailleurs, il a également été démontré que les lésions de la peau des souris infectées par *L. major* contenaient principalement des chimiokines attirant les cellules Th2 (Katzman et Fowell 2008). Par ailleurs, l'expression différentielle de chimiokines induites par les différentes souches de parasites conduit à diverses infections et les maladies. À titre d'exemple, l'infection humaine par *L. mexicana* peut conduire soit à une autoguérison ou à une non-

guérison, associée à l'expression accrue de CCL2 et CCL3, respectivement (Ritter, Moll et al. 1996). En plus de leurs fonctions chimiotactiques, CCL2 et CCL3 exercent une pléthore d'autres activités. CCL2 est plus polyvalent que CCL3 en induisant la libération de granules enzyme N-acétyl-8-D-glucosaminidase à partir des monocytes (Oppenheim, Zachariae et al. 1991). Plus important encore, CCL2, mais pas CCL3, stimule l'activité du « burst » oxydatif dans les macrophages, qui est un mécanisme important pour éliminer les amastigotes intracellulaires (Fahey, Tracey et al. 1992)

Bien que les cytokines soient importantes dans tout le processus infectieux de *Leishmania*, elles sont essentielles pendant la phase de l'immunité acquise. L'IL-12 est produite principalement par les cellules présentatrice d'antigène (APC), en particulier par les cellules dendritiques (Gorak, Engwerda et al. 1998). L'IL-12 est aussi en relation avec des cytokines importantes qui assurent la médiation des niveaux très différents d'infection par *Leishmania* tels que l'IFN- γ , IL-10 et IL-4 (Nylen et Gautam 2010). Par conséquent, l'interférence avec l'IL-12 est un phénomène récurrent dans l'infection par le parasite. *L. major* a été trouvé à diminuer le cholestérol, inhibant ainsi l'assemblage du complexe de signalisation du CD40-IL-12 et modifiant les fonctions effectrices des cellules (Rub, Dey et al. 2009). En outre, *L. mexicana* et *L. donovani* sont capables d'empêcher la production d'IL-12 induite par le LPS via clivage de NF- κ B par la cystéine protéase B (Cameron, McGachy et al. 2004). Les souris *Batf3^{-/-}*, qui ne produisent pas d'IL-12, ont une susceptibilité accrue à *L. major* à cause d'une diminution de l'IFN- γ et l'augmentation de l'IL-4 et de l'IL-10 (Ashok, Schuster et al. 2014). L'IFN- γ est libéré par les cellules Th1 déclenchant l'activité leishmanicide des macrophages par l'expression de NOS qui, à son tour, conduit à la mort du parasite (Wang, Reiner et al. 1994). Il a été décrit que les lymphocytes T régulateurs (Treg) peuvent jouer un rôle dans la diminution de l'IFN- γ , dans un modèle murin infecté avec *L. amazonensis* (Thiakaki, Kolli et al. 2006). En outre, le rôle des Treg dans la progression de l'infection et de la pathologie diverge en fonction de l'espèce de *Leishmania* infectante. Alors que les Tregs sont associés à l'exacerbation de la maladie et de la persistance des parasites dans le contexte de l'infection par *L. donovani* et *L. major*, respectivement (Mendez, Reckling et al. 2004, Martin, Agarwal et al. 2010). Par contre, chez *L. amazonensis* il a été démontré que les Tregs sont utiles à la résolution de la maladie (Ji, Masterson et al. 2005). L'immunosuppresseur IL-10 a longtemps été associé à la pathogenèse de la maladie viscérale étant non seulement important dans l'établissement de l'infection, mais aussi pendant la persistance du parasite par l'inhibition directe du développement des cellules

Th1, empêchant la résolution de l'infection (Nylen, Maurya et al. 2007). En effet, le blocage du récepteur de l'IL-10 ou un knock-out d'IL-10 chez la souris rend les animaux résistants à l'infection par *L. donovani* (Murphy, Wille et al. 2001). La principale source d'IL-10 dans la forme cutanée et viscérale est controversée. Certains proposent les Tregs et lymphocytes Th2 comme les principaux producteurs d'IL-10, tandis que d'autres affirment que les lymphocytes Th1 sont la principale source de l'IL-10 (Anderson, Oukka et al. 2007, Owens, Beattie et al. 2012). Nonobstant, le parasite peut également promouvoir la production d'IL-10 par d'autres cellules. Par exemple, la sécrétion d'IL-10 est médiée par la phagocytose des parasites opsonisés dans un modèle d'infection à faible dose *in vivo* par *L. major*, *L. amazonensis* et *L. mexicana* dans les macrophages (Padigel et Farrell 2005, Yang, Mosser et al. 2007, Buxbaum 2013). En dehors de l'IL-10, l'IL-4 induit également des réponses Th2 et est particulièrement impliqué dans la promotion de la leishmaniose cutanée (Himmelrich, Launois et al. 2000). Cette cytokine a été reconnue pour interférer avec la synergie de l'IFN- γ / FasL qui contribue à l'activation des macrophages et la mort de *L. major* (Chakour, Allenbach et al. 2009). D'autres cytokines ont été étudiées dans le contexte de l'infection par *Leishmania*. L'IL-17, par exemple, a été impliqué dans la formation de lésion de la leishmaniose cutanée (Bacellar, Faria et al. 2009). L'IL-1 β a également été montré à influencer sur l'évolution clinique de la leishmaniose et est liée à l'activation de l'inflammation. *Leishmania* peut, avec une lectine de type C (SIGNR3) empêcher l'activation d'IL-1 β par la caspase-1, ce qui favorise, par conséquent, la persistance du parasite (Lefevre, Lugo-Villarino et al. 2013). Plus récemment, l'infection de macrophages a révélé que la synaptotagmine XI (Syt XI) est dégradée par GP63, conduisant à la libération de TNF et d'IL-6 (Arango Duque, Fukuda et al. 2014). Pour mettre en évidence la pertinence de ces résultats dans un cadre *in vivo*, il a été démontré que l'injection intrapéritonéale de promastigotes exprimant GP63 induit la libération de TNF et d'IL-6 4 heures après l'inoculation (Arango Duque et Descoteaux 2015). Ces cytokines induisent l'expression du facteur d'adhérence et la libération de chimiokines (Hurst, Wilkinson et al. 2001, Griffin, Newton et al. 2012). De plus, il a été observé que GP63 favorise aussi l'infiltration des neutrophiles et des monocytes inflammatoires lors d'une infection précoce (Arango Duque et Descoteaux 2015).

3.3.2 TLR

Les récepteurs de type Toll reconnaissent une variété de motifs moléculaires associés à des pathogènes (PAMP) (Akira, Uematsu et al. 2006). Une fois le ligand reconnu, les TLR médient l'activation de différents facteurs de transcription, tels que le facteur nucléaire-kB (NF-kB) et les facteurs de régulation de l'interféron (IRF), conduisant à la production de cytokines inflammatoires (Broz et Monack 2013). Néanmoins, le parasite interfère avec la cascade de signalisation associée au TLR. *L. donovani* peut diminuer le rôle de TLR2 qui dirige le macrophage vers une réponse immunitaire de type Th2, avec une régulation négative de la production d'IL-12 dans les macrophages par l'inactivation de MAP kinase (Chandra et Naik 2008). En outre, l'interaction entre TLR2 et le LPG diminuent l'expression de TLR-9 conduisant à un profil inflammatoire moindre (Srivastava, Pandey et al. 2013). La capacité de *Leishmania* à interagir avec les protéines régulatrices de l'hôte peut également être pertinente pour moduler la signalisation par les TLR. À titre d'exemple, *L. donovani* exploite un régulateur négatif de TLR, l'enzyme A20, pour inhiber l'expression de gènes pro-inflammatoires médiés par le TLR2, par conséquent, supprimer la production de l'IL-12 et du TNF- α (Srivastav, Kar et al. 2012). Il a également été décrit que *L. donovani*, *L. mexicana* et *L. major* utilisent la tyrosine phosphatase SHP-1 du macrophage pour inactiver des kinases impliquées dans la signalisation des TLR (Abu-Dayyeh, Shio et al. 2008). Comme avec TLR2, *Leishmania* exploite les régulateurs de TLR pour contrer l'activation du TLR4. *L. donovani* modifie l'ubiquitination de TRAF3, empêchant sa dégradation, qui est nécessaire pour la translocation cytosolique efficace du complexe multiprotéique du TLR4. En conséquence, le NF-kB, réduit au silence, conduit à une régulation négative de l'IL-12 et la production de TNF- α (Gupta, Giri et al. 2014). En outre, *L. amazonensis* peut supprimer l'activation des TLR4 de cellules dendritiques via la dégradation rapide des protéines de signalisations intracellulaires JAK / STAT, NFKB et IRF conduisant à une diminution de la production d'IL-12 (Xin, Li et al. 2008). L'enzyme A20 a également un rôle dans l'inhibition de la réponse pro-inflammatoire du TLR4 (Das, Pandey et al. 2012). Ultiment, l'inhibition de la signalisation du TLR4 des macrophages induit un phénotype qui est en corrélation avec des niveaux plus élevés d'IL-10 et d'une réponse immunitaire de type Th2 (Faria, Reis et al. 2011). De plus, l'absence des gènes TLR2 ou TLR3 réduit l'internalisation de *L. donovani* par les macrophages ce qui démontre le rôle des TLR dans la modulation de la phagocytose (Flandin, Chano et al. 2006).

3.3.3 Présentation antigénique

Leishmania est capable de contrôler l'immunité acquise par l'altération de la fonction des cellules effectrices (Reiner, Ng et al. 1987). Le traitement et la présentation des antigènes par des APC sont nécessaires pour l'efficacité des cellules T effectrices qui, à leur tour, vont générer une réponse immunitaire dirigée et spécifique. En phagocytant des débris de parasites ou par la dégradation du parasite intracellulaire, les APC présentent des antigènes de *Leishmania* (Overath et Aebischer 1999). Le complexe majeur d'histocompatibilité CMH I et CMH II sont utilisés pour l'élimination de *Leishmania*, bien que seul le second soit essentiel pour l'élimination complète des parasites. *Leishmania* peut interférer avec le traitement de l'antigène et la présentation (Locksley, Reiner et al. 1993).

L. donovani diminue l'expression chez le macrophage des deux molécules du CMH (I et II) (Reiner, Ng et al. 1987). Les exosomes de *L. donovani* se sont révélés suffisants pour inhiber l'expression du CMH-II dans des cellules dendritiques dérivées de monocytes humains (Silverman, Clos et al. 2010b). En outre, à la fois *L. pifanoi* et *L. amazonensis* interfèrent avec le processus de traitement de l'antigène par les macrophages en séquestrant dans les vacuoles les antigènes de la voie du CMH II (Prina, Jouanne et al. 1993, Kima, Soong et al. 1996). Cependant, la prévention des complexes CMH de classe II-peptide exprimés en surface n'est pas le seul moyen par lequel le parasite nuit à la présentation des antigènes. *L. donovani* est capable d'interférer avec la présentation d'antigènes par le CMH II par les BMM au récepteur de lymphocyte T (TCR) (Meier, Svensson et al. 2003). Une augmentation de la fluidité de la membrane cellulaire par une diminution du cholestérol et de la céramide provoque cet engagement inefficace (Chakraborty, Banerjee et al. 2005). Des molécules d'adhésion sont également importantes dans le processus de présentation de l'antigène. Elles aident au contact entre les APC et les cellules T, qui est nécessaire pour la formation ultérieure de la synapse immunologique (Cecilio, Perez-Cabezas et al. 2014). Particulièrement les cellules T CD4+, mais aussi les cellules T CD8+ de patients atteints de leishmaniose viscérale provoquée par *L. donovani* expriment moins de CD2 que celles de sujets sains (Bimal, Singh et al. 2008). Les molécules de co-stimulation sont nécessaires pour la pleine activation des lymphocytes T par les APC, dont l'expression peut être régulée à la baisse par *Leishmania*. Par exemple, les BMM infectés par *L. donovani* expriment des niveaux inférieurs de molécules de co-stimulations B7 (Kaye, Rogers et al. 1994). Aussi, les cellules de Langerhans de souris BALB/c infectées par *L.*

major ont montré une régulation négative de B7 (Mbow, DeKrey et al. 2001). L'absence de molécules co-stimulatrices sur les APC est une autre stratégie de modulation immunitaire utilisée par *Leishmania*. Les parasites régulent de façon négative la transcription de CD40 et de CD86 ainsi que son expression à la surface BMDC par l'activation de la voie PI3K / Akt et la dégradation de NF-κB (Neves, Silvestre et al. 2010). *Leishmania* a également été associée à l'inefficacité des lymphocytes T. La production d'IFN-γ par les cellules T effectrices CD8+ est absente dans le cas de leishmaniose viscérale humaine. Ces cellules expriment des niveaux élevés de lymphocytes T cytotoxiques antigène 4 (CTLA-4) et de protéine de mort programmée (PD1) (Gautam, Kumar et al. 2014). Des résultats similaires ont également été signalés en ce qui concerne non seulement les cellules T CD8+, mais également les cellules T CD4+ (Esch, Juelsgaard et al. 2013). De plus, les phosphoglycans de *L. major* sont responsables de la diminution de la production d'IL-12p40 des DC infectées et de l'augmentation de la réponse des cellules Th1. Ainsi, en plus de leur rôle dans la subversion de la fonction des macrophages, les glycoconjugués de *Leishmania* ont un impact sur les voies initiales qui mènent à l'activation des cellules T effectrices, assurant ainsi la survie optimale des parasites dans l'hôte infecté (Liu, Kebaier et al. 2009).

Le rôle de la cystéine protéase B a été principalement décrit au niveau de la réponse immunitaire comme la diminution de la présentation par le CMH-II, le clivage de NF-κB et la polarisation vers une réponse Th1 au lieu de la réponse Th2. (De Souza Leao, Lang et al. 1995b, Buxbaum, Denise et al. 2003, Denise, McNeil et al. 2003). Cependant, bien peu est connu sur ce qu'elle fait à l'intérieur du macrophage. La survie diminue sans elle, mais aucune hypothèse n'a été vérifiée ni même annoncée. L'objectif principal de ce projet de recherche était donc d'analyser si la CPB a un rôle dans la modulation du phagosome.

SECTION 2: ARTICLE

ARTICLE

Cysteine peptidase B regulates *Leishmania mexicana* virulence through the modulation of GP63 expression

Pierre-André Casgrain¹, Caroline Martel², W. Robert McMaster³, Jeremy C. Mottram⁴, Martin Olivier², and Albert Descoteaux^{1*}

¹INRS- Institut Armand-Frappier and the Center for Host-Parasite Interactions, Laval, Canada

²The Research Institute of the McGill University Health Centre, Montréal, Canada.

³Immunity and Infection Research Centre, Vancouver Coastal Health Research Institute, Department of Medical Genetics, University of British Columbia, Vancouver, Canada

⁴Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology, Institute of Infection, Immunity and Inflammation, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom

*Corresponding author:

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

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Pierre-André Casgrain : Réalisation des manipulations pour les figures de l'article. Contribution dans la rédaction du manuscrit pour les sections abstract, introduction, materials and methods, results et discussion.

Caroline Martel : Réalisation des manipulations pour la figure 6b et 6c.

Martin Olivier : Réalisation des manipulations pour la figure 6b et 6c.

Robert McMaster : Donation du plasmide contenant GP63.

Jeremy Mottram : Donation des parasites *L. mexicana* (WT, Δcpb , et $\Delta cpb+CPB$)

Albert Descoteaux : Rédaction du manuscrit pour les sections abstract, introduction, materials and methods, results et discussion

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

La compréhension de la pathogénèse de *Leishmania* passe par LPG et par GP63. Ces deux facteurs de virulences sont étudiés depuis des décennies et leur rôle dans l'infection semble jusqu'à présent bien compris. Pour ce qui est de la CPB, bien peu de gens y consacrent leur effort. Parmi ces gens, le Dr Mottram et son équipe tentent d'élucider le rôle de la CPB durant l'infection depuis plusieurs années. Ils ont remarqué que les parasites sans CPB ne survivaient presque pas et formaient des lésions beaucoup plus petites que les parasites WT. Ils ont observé un effet considérable sur la modulation du système immunitaire tant sur la sécrétion de cytokines que par la polarisation des lymphocytes T. Toutefois, le rôle de la CPB dans l'infection du macrophage reste inconnu. Dans cet article, nous démontrons une nouvelle facette de la CPB qui redéfinit son rôle durant l'infection.

Tout d'abord, la présence de CPB est essentielle à l'expression de la GP63 et du LPG. Cette découverte marquante remet en question la façon dont *Leishmania* utilise la CPB. En comparant les parasites CPB « rescue » (RE) et GP63 « Add-back » (AB), nous avons été en mesure de démontrer que la CPB n'a pas de rôle ni dans la survie du parasite, ni sur la taille des vacuoles dans les macrophages infectés. Il s'agit plutôt du manque de la GP63 causé par l'absence de CPB chez les parasites CPB knock-out qui provoque la perte de survie de *Leishmania* chez le macrophage. De plus, lors de ces infections de macrophage *in vitro*, une meilleure survie était observée chez les parasites capables de cliver à court terme VAMP3 et VAMP8. Ce clivage est effectué à l'aide de la GP63. Les infections *in vivo* ont aussi mis en évidence que la CPB n'agit pas directement pour promouvoir l'infection, mais plutôt permet l'expression de GP63 qui est un facteur de virulence essentiel. Ces résultats dévoilent des rôles de CPB dans la virulence du parasite et ouvrent d'autres pistes quant à la régulation des facteurs de virulences de *Leishmania*.

ABSTRACT

Cysteine peptidases play a central role in the biology of *Leishmania*. In this work, we sought to further elucidate the mechanism(s) by which the cysteine peptidase CPB contributes to *L. mexicana* virulence. We initially examined the impact of *L. mexicana* infection on the trafficking of VAMP3 and VAMP8, two endocytic SNARE proteins associated with phagolysosome biogenesis and function. Using a CPB-deficient mutant, we found that both VAMP3 and VAMP8 were down-modulated in a CPB-dependent manner. We also discovered that expression of the virulence-associated GPI-anchored metalloprotease GP63 was inhibited in the absence of CPB. Expression of GP63 in the CPB-deficient mutant was sufficient to down-modulate VAMP3 and VAMP8. Similarly, episomal expression of GP63 enabled the CPB-deficient mutant to establish infection in macrophages, induce the formation large parasitophorous vacuoles, and cause lesions in mice. These findings implicate CPB in the regulation of GP63 expression and provide evidence that both GP63 and CPB are key virulence factors in *L. mexicana*.

INTRODUCTION

The protozoan *Leishmania* parasitizes macrophages and causes a spectrum of human diseases ranging from self-healing cutaneous lesions to a progressive visceral infection that can be fatal if left untreated. Infection is initiated when promastigote forms of the parasite are inoculated into the mammalian host by infected sand flies and are internalized by phagocytes. Inside macrophages, promastigotes differentiate into amastigotes to replicate within phagolysosomal compartments also known as parasitophorous vacuoles (PVs). Upon their internalization, *L. donovani* and *L. major* promastigotes arrest phagolysosomal biogenesis and create an intracellular niche favorable to the establishment of infection and to the evasion of the immune system (Moradin et Descoteaux 2012, Matheoud, Moradin et al. 2013). The abundant promastigote surface glycolipid lipophosphoglycan (LPG) plays a major role in this PV remodelling (Desjardins et Descoteaux 1997, Moradin et Descoteaux 2012). Hence, insertion of LPG into the PV membrane destabilizes lipid microdomains and causes exclusion of the membrane fusion regulator synaptotagmin V from the PV membrane (Vinet, Fukuda et al. 2009). In addition, the parasite GPI-anchored metalloprotease GP63 (Olivier, Atayde et al. 2012, Arango Duque et Descoteaux 2015) cleaves key Soluble NSF Attachment Protein Receptors (SNAREs) and synaptotagmins to impair phagosome functions including antigen cross-presentation (Matheoud, Moradin et al. 2013, Arango Duque, Fukuda et al. 2014). Disruption of the macrophage membrane fusion machinery may be part of the strategy used by promastigotes of those species to create the PV in which they will differentiate into amastigotes.

Whereas *L. major* and *L. donovani* multiply in tight individual PVs, parasites of the *L. mexicana* complex replicate within large communal PVs. Relatively little is known about the host and parasite factors involved in the biogenesis and expansion of those large communal PVs. Studies with *L. amazonensis* revealed that phagosomes containing promastigotes fuse with late endosomes/lysosomes within 30 minutes post-infection (Courret, Frehel et al. 2002). At that stage, parasites are located within small individual compartments and by 18 to 24 hours large PVs containing several parasites are observed. The rapid increase in the size of those PVs requires extensive fusion with secondary lysosomes, which causes depletion of those organelles (Alexander et Vickerman 1975, Barbieri, Brown et al. 1985, Real, Pouchelet et al. 2008). Homotypic fusion between *L. amazonensis*-containing PVs also occurs, but its contribution to PV

enlargement remains to be further investigated (Real et Mortara 2012). SNARE-mediated membrane fusion events play an important role in phagocytosis and phagosome maturation, by regulating interactions between the phagosome and endocytic organelles (Stow, Manderson et al. 2006). It is thus likely that endocytic SNAREs are involved in the biogenesis and expansion of large communal PVs. Of interest, SNAREs associated with the endoplasmic reticulum and Golgi were found to be present on PVs hosting *L. amazonensis* and their inhibition resulted in the inhibition of parasite replication and PV enlargement (Ndjamen, Kang et al. 2010, Canton et Kima 2012, Canton, Ndjamen et al. 2012a).

The identity of the *Leishmania*-derived molecules involved in the expansion of the communal PVs remains to be elucidated. LPG and other phosphoglycans do not play a significant role in *L. mexicana* promastigote virulence and PV formation (Ilg 2000), in contrast to *L. major* and *L. donovani* (Moradin et Descoteaux 2012). Cysteine peptidases (CP) are a large family of papain-like enzymes that play important roles in the biology of *Leishmania* (Mottram, Coombs et al. 2004). Three members of these papain-like proteases are expressed by *L. mexicana* and the generation of CP-deficient mutants revealed that CPB contributes to the ability to infect macrophages and to induce lesions in BALB/c mice (Mottram, Souza et al. 1996, Denise, McNeil et al. 2003, Cameron, McGachy et al. 2004). The precise mechanism(s) by which CPB participates in the virulence of *L. mexicana* is poorly understood. Previous studies revealed that CPB traffics within and outside infected macrophages (Mottram, Coombs et al. 2004). In infected macrophages, CPB alters signal transduction and gene expression through the activation of the protein tyrosine phosphatase PTP-1B and the cleavage of transcription factors responsible for the expression of genes involved in host defense and immunity (Cameron, McGachy et al. 2004, Abu-Dayyeh, Hassani et al. 2010). The observation that CPs interfere with the host immune response through the degradation of MHC class II molecules and invariant chains present in PVs housing *L. amazonensis* (De Souza Leao, Lang et al. 1995a), raises the possibility that CPB participates in the modulation of PV composition and function.

In this study, we sought to gain insight into the mechanism by which CPB contributes to *L. mexicana* virulence, with a focus on the PV. We provide evidence that CPB participates in PV biogenesis and virulence through the regulation of GP63 expression.

RESULTS

CPB enables *L. mexicana* to down-modulate VAMP3 and VAMP8. Formation and expansion of communal PVs hosting *L. mexicana* involve fusion between PVs and endocytic organelles, as well as homotypic fusion among PVs (Barbieri, Brown et al. 1985, Real, Pouchelet et al. 2008, Real et Mortara 2012). To identify the host and parasite factors involved in this process, we embarked on a study to elucidate the fate of endosomal SNAREs during infection of macrophages with *L. mexicana*. Given the requirement of CPB for *L. mexicana* to replicate normally inside macrophages (Mottram, Souza et al. 1996), we included a *L. mexicana* CPB-deficient mutant (Δcpb) in our investigation. We infected BMM with either WT or Δcpb *L. mexicana* promastigotes for 2 h and we assessed the distribution of the endosomal SNAREs VAMP3 and VAMP8 by confocal immunofluorescence microscopy. As previously observed during infection with *L. major* promastigotes (Matheoud, Moradin et al. 2013), we found a notable reduction in the staining intensity for both VAMP3 (Figure 1A) and VAMP8 (Figure 1B) in BMM infected with WT *L. mexicana*, but this was not observed with Δcpb . This reduction in staining intensity correlated with a down-modulation of VAMP3 and VAMP8 proteins in BMM infected with WT *L. mexicana*, compared to cells infected with Δcpb (Figure 1C). These results suggested that *L. mexicana* causes the reduction of VAMP3 and VAMP8 levels in infected BMM through the action of CPB. However, we considered the possibility that CPB acted indirectly on VAMP3 and VAMP8 because we previously found that GP63 targets those SNAREs in *L. major*-infected BMM (Matheoud, Moradin et al. 2013). We therefore ensured that similar levels of GP63 were present in lysates of BMM infected with WT and Δcpb *L. mexicana* promastigotes. As a control, we included lysates of BMM infected with *L. amazonensis*, which also induces communal PVs. As shown in Figure 2, GP63 was detected in lysates of BMM infected with WT *L. mexicana* and *L. amazonensis* up to 72 h post-infection, when the parasites replicate as amastigotes. Surprisingly, we found that GP63 was barely detectable in BMM infected with Δcpb at all time points tested. This observation raised the possibility that in Δcpb the lack of VAMP3 and VAMP8 down-regulation was due to defective expression of GP63.

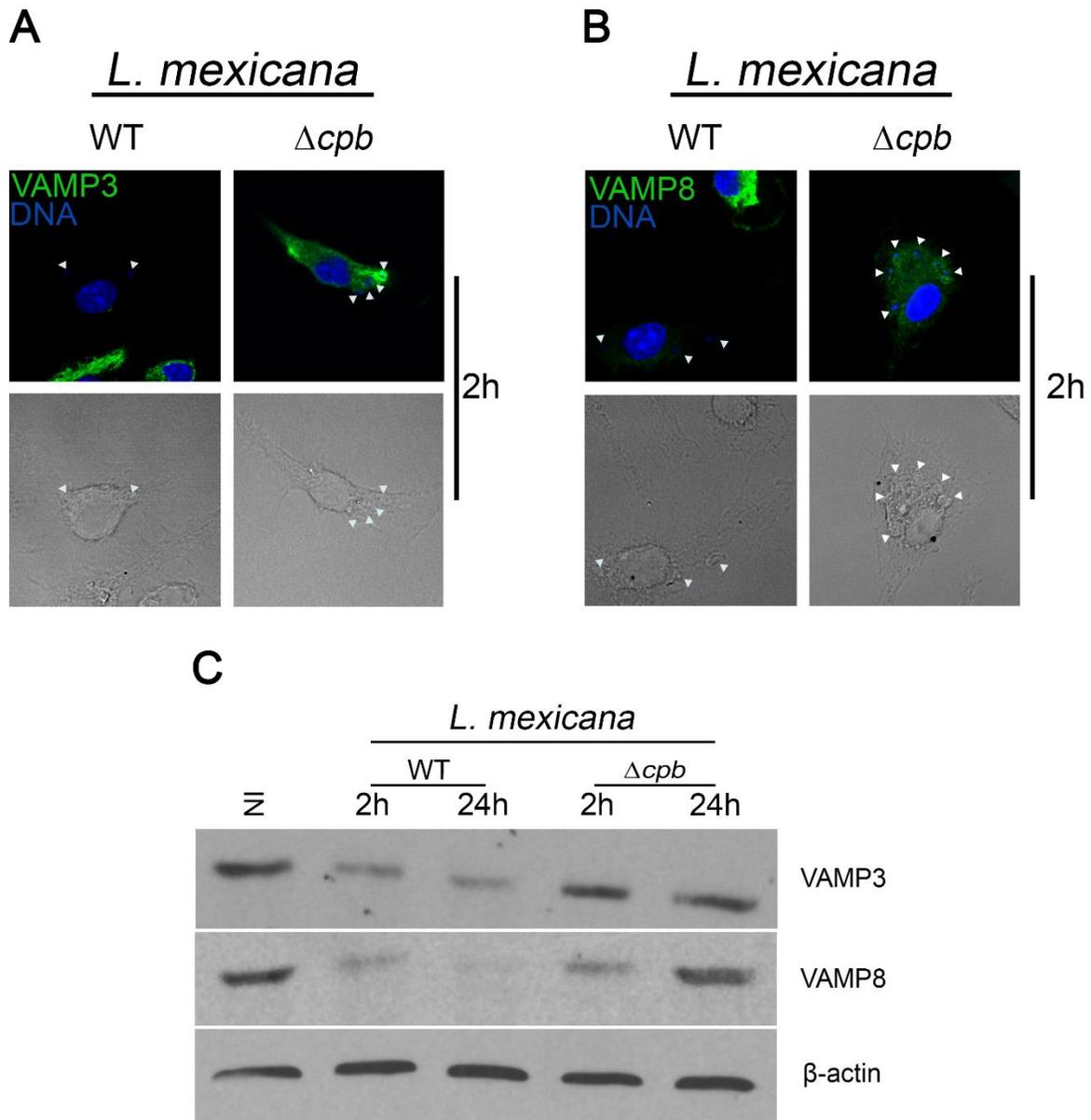


Figure 1. Down-modulation of VAMP3 and VAMP8 by *L. mexicana*. BMM were infected with serum-opsonized stationary phase *L. mexicana* (WT and Δcpb) promastigotes for 2 h. VAMP3 (**A**) and VAMP8 (**B**) levels (green) were then visualized by confocal microscopy. Macrophage and parasite nuclei are shown in blue (DAPI). Internalized parasites are denoted by white arrowheads. In (**C**), VAMP3 and VAMP8 levels in total cell extracts were assessed by Western blot analysis. Each immunofluorescence assay was done on 300 phagosomes on triplicate coverslips in two independent experiments and Western blot analyses were performed twice in two independent experiments. Original magnification X63.

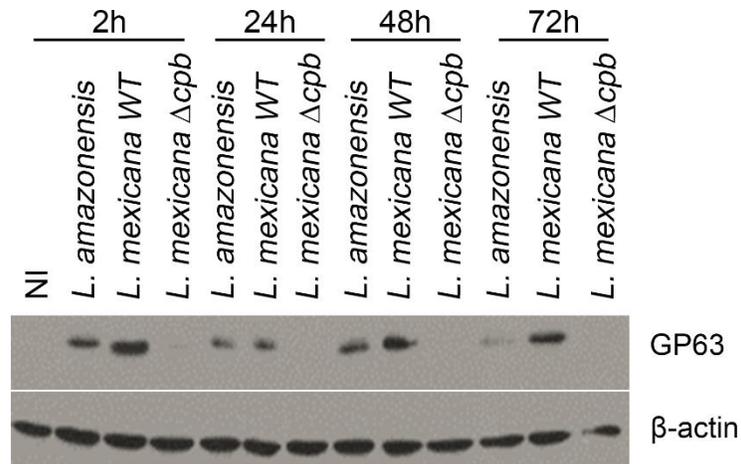


Figure 2. GP63 is down-modulated in the *L. mexicana* Δ *cpb* mutant. BMM were infected with serum-opsonized stationary phase *L. amazonensis* and *L. mexicana* (WT and Δ *cpb*) promastigotes for 2 h, 24 h, 48 h and 72 h. Total cell extracts were assayed for GP63 levels by Western blot analysis. Similar results were obtained in two experiments.

CPB is required for GP63 expression. To address the issue of GP63 down-regulation in *L. mexicana* Δ *cpb*, we first determined whether complementation of Δ *cpb* with the *CPB* gene array (Δ *cpb*+*CPB*) restores wild type GP63 levels. As shown in Figure 3, GP63 levels and activity are down-modulated in the Δ *cpb* mutant, and complementation with the *CPB* array restored GP63 levels and activity similar to those observed in WT parasites. It was previously reported that expression of the cell surface glycolipid LPG and of GP63 may share common biosynthetic steps (Garami et Ilg 2001a, Garami et Ilg 2001b, Garami, Mehlert et al. 2001, Descoteaux, Avila et al. 2002). We therefore evaluated the levels of LPG in lysates of WT, Δ *cpb*, Δ *cpb*+*CPB*, and Δ *cpb*+*GP63* parasites by Western blot analysis. Strikingly, similar to GP63, LPG levels were also down-modulated in the Δ *cpb* mutant and complementation with either the *CPB* array or *gp63* restored wild type LPG levels. These results obtained with the restoration of CPB expression in the Δ *cpb* mutant suggest that CPB may be part of a pathway involved in the expression of both GP63 and LPG. Our results also raised the possibility that down-modulation of GP63 in the Δ *cpb* mutant may have accounted for the inability of Δ *cpb* to down-regulate VAMP3 and VAMP8. The finding that expression of GP63 in Δ *cpb* restored LPG levels was unexpected and suggested a role for GP63 in the expression of LPG in *L. mexicana*. Since LPG does not play a major role in the virulence of *L. mexicana* (Ilg 2000), the Δ *cpb* mutant

expressing exogenous GP63 provides a unique opportunity to address the impact of GP63 on SNARE cleavage, as well as on the *in vitro* and *in vivo* virulence of *L. mexicana*.

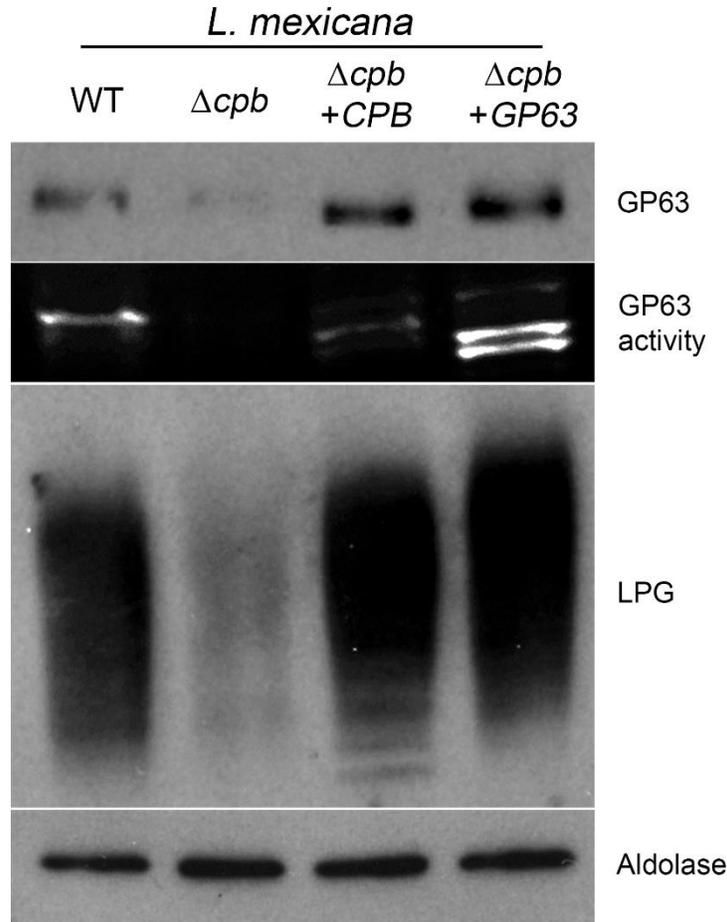


Figure 3. Expression of GP63 and LPG is impaired in the absence of CPB. Stationary phase promastigotes were lysed and total cell extracts were analysed by Western blotting and zymography for GP63 levels and activity and for LPG levels. Aldolase was used as a loading control. Similar results were obtained in three independent experiments.

GP63 is responsible for the cleavage of VAMP3 and VAMP8 by *L. mexicana*. We next assessed the impact of GP63 on VAMP3 and VAMP8 during *L. mexicana* infection. To this end, we infected BMM with either WT, Δcpb , $\Delta cpb + CPB$, or $\Delta cpb + GP63$ *L. mexicana* promastigotes for various time points, and we assessed VAMP3 and VAMP8 levels and intracellular distribution. Figure 4A shows that GP63 is present at high levels in lysates of BMM infected for 2 h with WT, $\Delta cpb + CPB$, and $\Delta cpb + GP63$ promastigotes. At 72 h post-infection, GP63 levels are reduced in BMM infected with WT and $\Delta cpb + CPB$, whereas they remain elevated in BMM

infected with the $\Delta cpb+GP63$ (Figure 4A) (Medina-Acosta, Karess et al. 1989). Western blot analyses revealed that down-regulation of VAMP3 and VAMP8 correlated with GP63 levels expressed by the parasites. Consistently, the staining intensity of VAMP3 and VAMP8 was reduced in BMM infected with GP63-expressing parasites, as assessed by confocal immunofluorescence microscopy (Figure 4D and E). These results suggest that GP63 is responsible for the down-modulation of the endosomal SNAREs VAMP3 and VAMP8 in *L. mexicana*-infected BMM. Interestingly, we observed recruitment of VAMP3 to PVs containing *L. mexicana* parasites at later time points, when promastigotes have differentiated into amastigotes, with the exception of $\Delta cpb+GP63$ *L. mexicana* promastigotes (Figure 4B). In contrast, we found that VAMP8 is excluded from *L. mexicana*-containing PVs both at early and later time points post-infection, independently of GP63 levels, suggesting that additional mechanisms regulate VAMP8 recruitment to *L. mexicana* PVs.

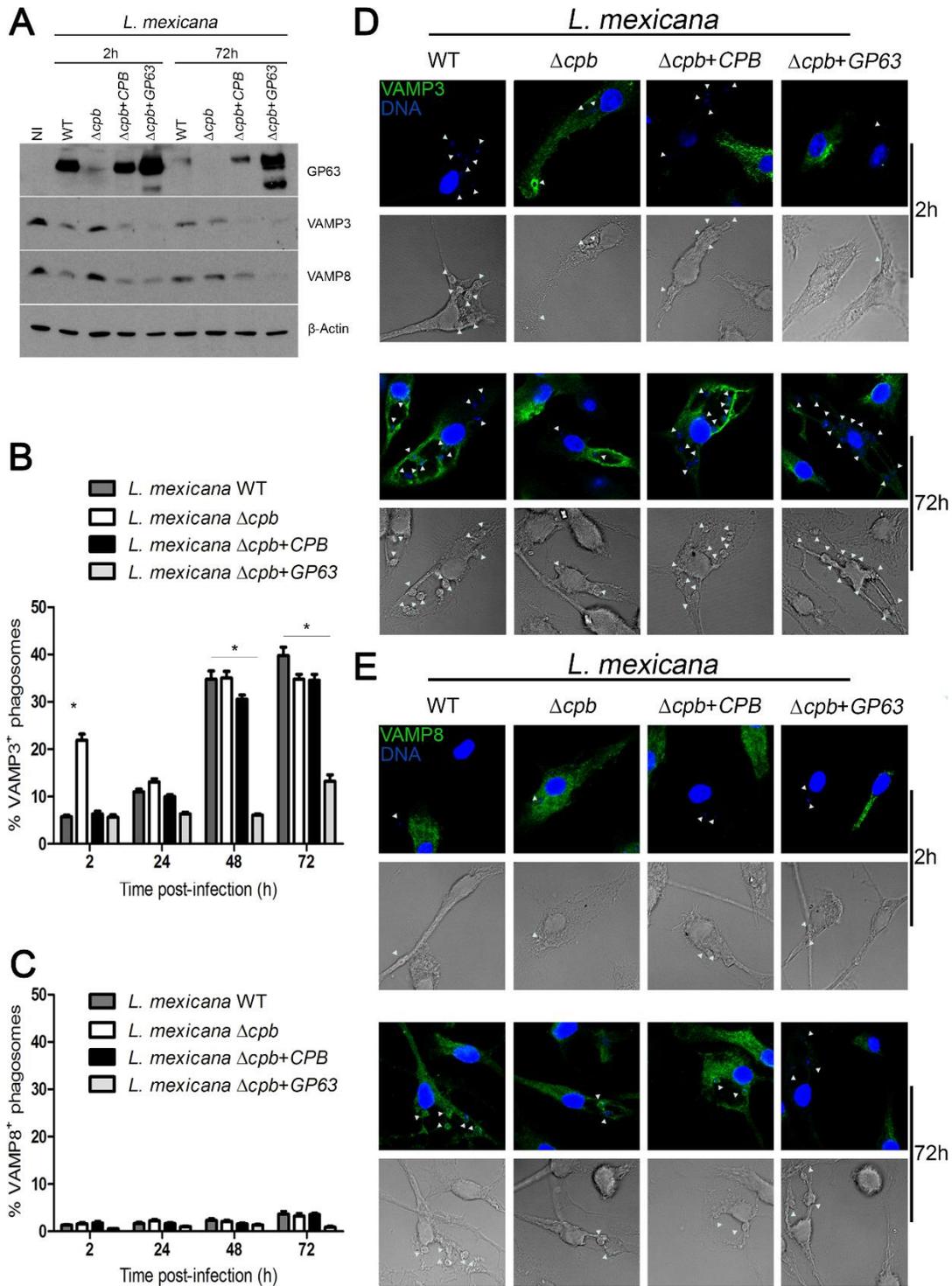


Figure 4. GP63 is responsible for the down-modulation of VAMP3 and VAMP8 in *L. mexicana*-infected macrophages. BMM were infected with serum-opsionized stationary phase *L. mexicana* (WT, Δcpb , $\Delta cpb+CPB$ and $\Delta cpb+GP63$) promastigotes for 2 h and 72 h. Total cell extracts were analysed by Western blot (A). VAMP3 and VAMP8 recruitment to the phagosome

was visualized by immunofluorescence microscopy and quantified for 300 phagosomes on triplicate coverslips (**B and C**). Representative pictures from each condition are shown (**D and E**). Immunofluorescence assays were performed on 300 phagosomes on triplicate coverslips for three independent experiments. * $p < 0.0001$.

GP63 expression restores virulence of Δcpb . Since GP63 was shown to contribute to *L. major* virulence (Joshi, Kelly et al. 2002), we next sought to determine whether expression of GP63 is sufficient to restore the ability of Δcpb to replicate inside macrophages and to cause lesions in mice (Mottram, Souza et al. 1996). To this end, we first infected BMM with either WT, Δcpb , $\Delta cpb+CPB$, and $\Delta cpb+GP63$ stationary phase promastigotes and we assessed parasite burden and PV surface area at various time points post-infection. We found that Δcpb had an impaired capacity to replicate inside macrophages and to induce the formation of large communal PVs compared to WT and $\Delta cpb+CPB$ parasites (Figure 5A, B, C). Strikingly, expression GP63 in Δcpb restored its ability to replicate in macrophages and to induce large communal PVs up to 72 h post-infection. These results underline the role of GP63 in the ability of *L. mexicana* to infect and replicate in macrophages, even in the absence of CPB. Following inoculation inside the mammalian host, promastigotes are exposed to complement and GP63 confers resistance to complement-mediated lysis (Joshi, Kelly et al. 2002). *L. mexicana* promastigotes were therefore analyzed for their sensitivity to complement-mediated lysis in the presence of fresh human serum. As shown in Figure 6A, over 40% of Δcpb was killed after 30 min in the presence of 20% serum, whereas $\Delta cpb+CPB$, and $\Delta cpb+GP63$ were more resistant to serum lysis at 14% and 10%, respectively. Finally, to assess the impact of GP63 on the ability of Δcpb to cause lesions, we used a mouse model of cutaneous leishmaniasis. Susceptible BALB/c mice were infected in the hind footpad with either WT, Δcpb , $\Delta cpb+CPB$, or $\Delta cpb+GP63$ promastigotes and disease progression was monitored for 9 weeks. Consistent with its reduced capacity to replicate inside macrophages, Δcpb failed to cause significant lesions compared to WT parasites (Mottram, Souza et al. 1996) and Δcpb complemented with CPB (Figure 6B). Remarkably, expression of GP63 in Δcpb restored its capacity to cause lesions, albeit to a lower level than Δcpb complemented with CPB. Lesion size correlated with parasite burden, as measured at 9 weeks post-infection (Figure 6C). Collectively, these results indicate that expression of GP63 is sufficient to restore virulence of Δcpb .

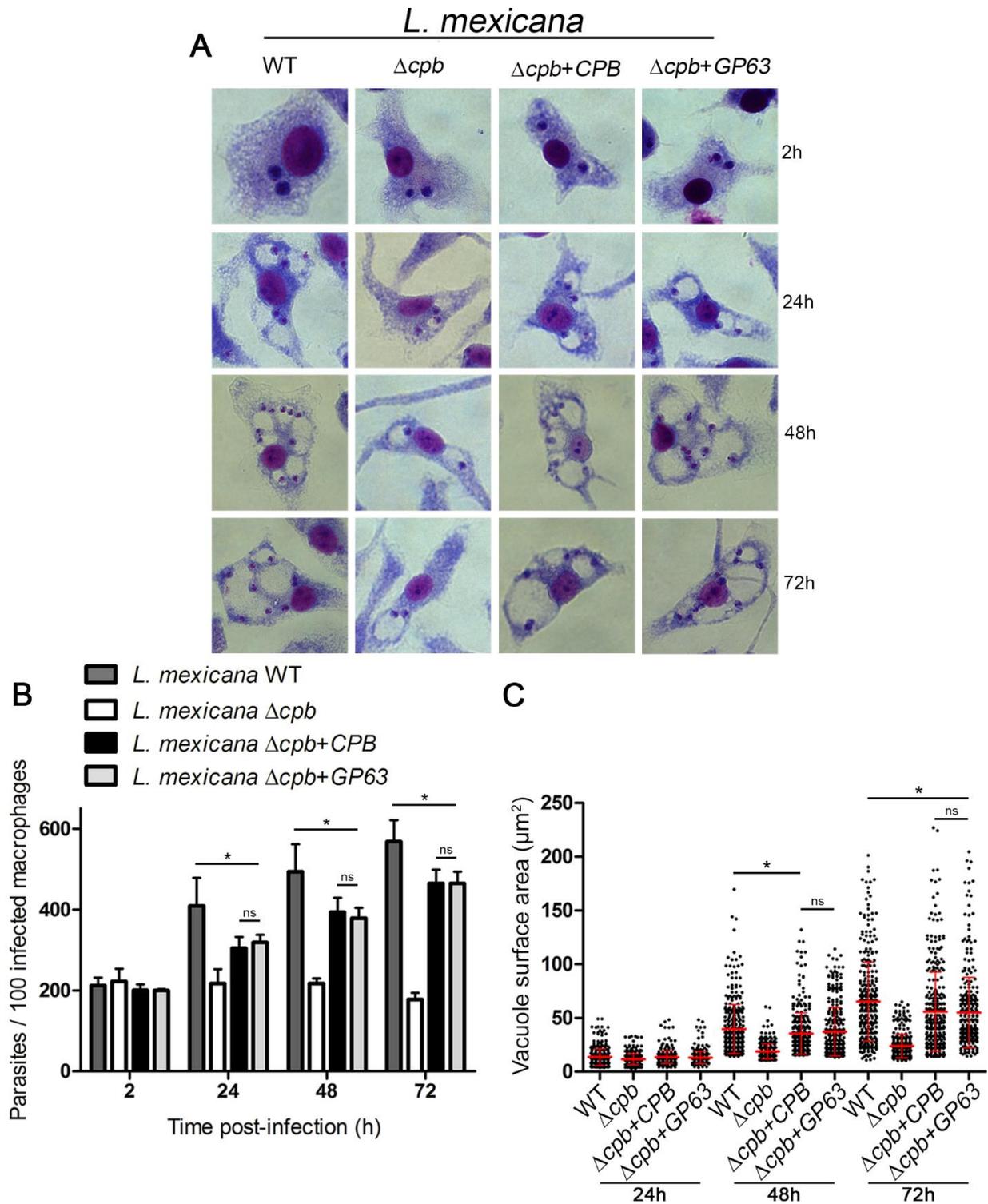


Figure 5. GP63 enables *L. mexicana* Δcpb to infect macrophages and induce large PVs. BMM were infected with stationary phase serum-opsonized *L. mexicana* (WT, Δcpb , $\Delta cpb+cpb$ and $\Delta cpb+GP63$) promastigotes for 2 h, 24 h, 48 h and 72 h. Macrophages were stained with the HEMA 3™ kit. Representative pictures from each condition are shown (A) Parasites were

counted in 300 macrophages on triplicate coverslips **(B)**. Macrophages were stained with the LAMP1 antibody and vacuole sizes were measured with the ZEN 2012 software **(C)**. Parasitemia and vacuole size was determined on 300 phagosomes in triplicate in three independent experiments. * $p < 0.0001$.

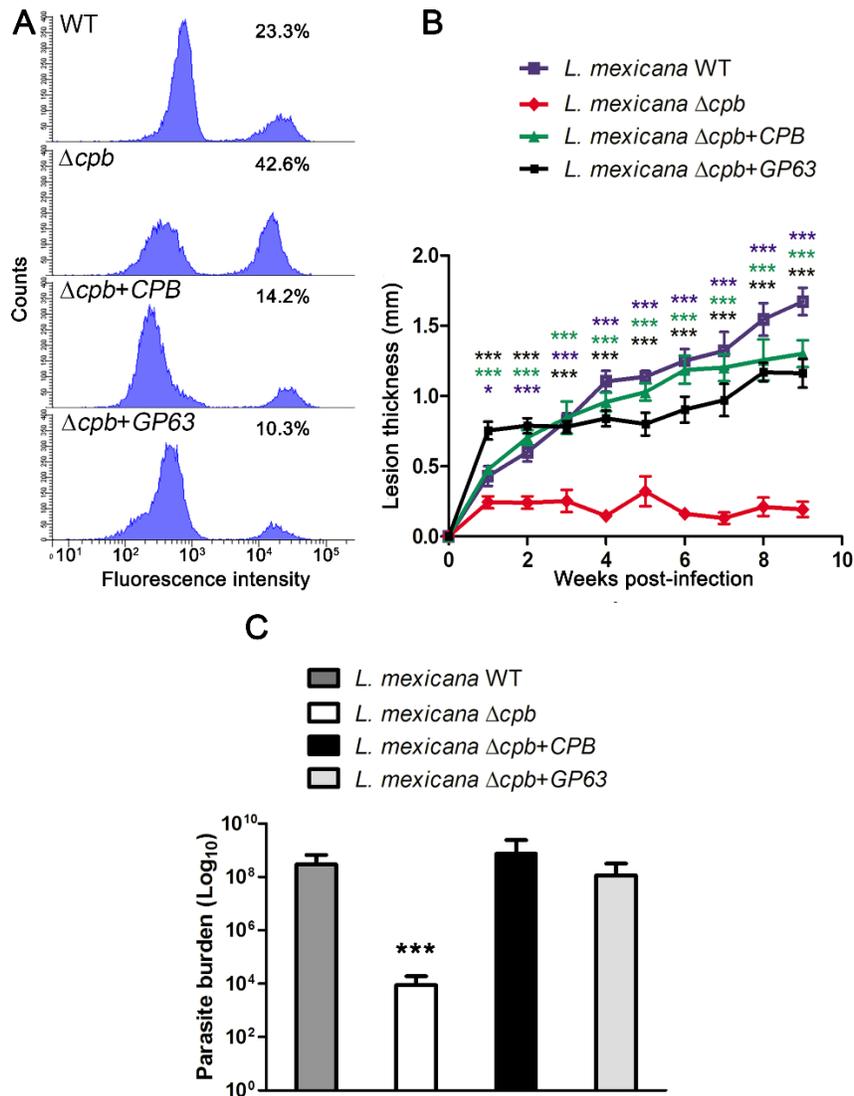


Figure 6. GP63 confers virulence to *L. mexicana* Δcpb . Stationary phase *L. mexicana* (WT, Δcpb , $\Delta cpb+cpb$ and $\Delta cpb+GP63$) promastigotes were incubated in the presence of 20% human serum for 30 min, stained with a fixable viability dye, and then subjected to flow cytometry **(A)**. Mice were challenged with 5×10^6 late-stationary phase *L. mexicana* (WT, Δcpb , $\Delta cpb+cpb$ and $\Delta cpb+GP63$) promastigotes that were injected subcutaneously into the hind footpad. Disease progression was monitored at weekly intervals, by measuring the thickness of the infected footpad and the contralateral uninfected footpad. **(B)**. Parasite burden was obtained by limiting

dilution assay from infected homogenized footpads 9 weeks after inoculation **(C)**. Human serum lysates were performed in two independent experiments and six mice per group were used for the determination of lesion formation and parasite burden. Each data point represents the average \pm SEM of 6 mice per group, and statistical significance was denoted by * $p \leq 0.01$, and *** $p \leq 0.0001$.

DISCUSSION

This study was aimed at investigating the mechanism(s) by which CPB contributes to *L. mexicana* virulence. To this end, we initially examined PV biogenesis by assessing the impact of *L. mexicana* infection on the trafficking of VAMP3 and VAMP8, two endocytic SNAREs associated with phagosome biogenesis and function (Murray, Kay et al. 2005, Matheoud, Moradin et al. 2013). We found that both SNAREs were down-modulated in a CPB-dependent manner, which hampered VAMP3 recruitment to PVs. We also discovered that expression of GP63, which we previously showed to be responsible for cleaving SNAREs in *L. major*-infected macrophages (Matheoud, Moradin et al. 2013), was down-modulated in the *L. mexicana* Δcpb . Strikingly, restoration of GP63 expression in Δcpb bypassed the need for CPB for SNARE cleavage. Similarly, episomal expression of GP63 enabled the Δcpb mutant to establish infection in macrophages, induce larger PVs and cause lesions in mice. These findings imply that CPB contributes to *L. mexicana* virulence in part through the regulation of GP63 expression, and provide evidence that GP63 is a key virulence factor for *L. mexicana*.

Insight into the possible mechanism(s) by which CPB regulates GP63 and LPG expression may be deduced from a recent study on the role of cathepsin B in *L. donovani*, which is homologous to the *L. mexicana* CPC (Gerbaba et Gedamu 2013). Similar to *L. mexicana* Δcpb , *L. donovani* $\Delta catB$ displays reduced virulence in macrophages. To investigate the role of cathepsin B in virulence, the authors performed quantitative proteome profiling of wild type and $\Delta catB$ parasites and identified 83 proteins whose expression is altered in the absence of cathepsin B, with the majority being down-modulated (Gerbaba et Gedamu 2013). Among those, LPG3 was identified as the most down-modulated protein in $\Delta catB$ parasites. Interestingly, we previously identified *LPG3* as a LPG biosynthetic gene in *L. donovani* (Descoteaux, Avila et al. 2002). In addition to defective LPG biosynthesis, $\Delta lpg3$ mutants show defects in GPI-anchored protein expression, including GP63. Whether expression of *LPG3* or other protein(s) involved in the synthesis of GPI-anchored proteins is impaired in the *L. mexicana* Δcpb mutant is an important issue that will deserve further investigation. Alternatively, the down-modulation of GP63 and LPG expression observed in Δcpb may be related to the reduced expression of proteins involved in the post-transcriptional regulation of gene expression (RNA stability, processing, translation), as described for *L. donovani* $\Delta catB$ (Gerbaba et Gedamu

2013). In support to this possibility, we found that GP63 mRNA levels were reduced in Δcpb and substantially increased in $\Delta cpb+CPB$ parasites (Figure S1). Clearly, a detailed analysis of wild-type and Δcpb parasites may provide the information required to understand the extent of the impact of CBP on the synthesis of virulence factors and the exact role of CPB in *L. mexicana* virulence. The observation that episomal expression of GP63 in Δcpb restored LPG synthesis is an intriguing issue, as it suggests that in the absence of CPB, GP63 acts on a LPG biosynthetic step. This role for GP63 is likely redundant, since *L. major* $\Delta gp63$ expresses LPG levels similar to that of wild type parasites (not shown).

It has been proposed that expansion of the PVs hosting parasites of the *L. mexicana* complex leads to the dilution of the microbicidal effectors to which the parasites are exposed, thereby contributing to parasite survival (Sacks et Sher 2002). Both host and parasite factors may be involved in the control of PV enlargement. On the host side, it has been previously reported that *L. amazonensis* cannot survive in cells overexpressing *LYST*, a host gene that restricts *Leishmania* growth by counteracting PV expansion (Wilson, Huynh et al. 2008). Similarly, disrupting the fusion between PVs housing *L. amazonensis* and the endoplasmic reticulum resulted in limited PV expansion and inhibition of parasite replication (Canton et Kima 2012, Canton, Ndjamen et al. 2012a). On the parasite side, virulence of *L. amazonensis* isolates was shown to correlate with the ability to induce larger PVs (Franca-Costa, Wanderley et al. 2012). Our results indicate that the inability of Δcpb to multiply inside macrophages is associated with smaller PV size, and that expression of GP63 is sufficient to restore the capacity of Δcpb to survive within macrophages and to induce PV expansion. How does GP63 modulate *L. mexicana* virulence and PV expansion? In addition to the numerous macrophage proteins known to be targeted by GP63, it is possible that SNARE cleavage is one of the factors associated with *L. mexicana* virulence and PV expansion. For instance, we previously reported that VAMP8 is required for phagosomal oxidative activity (Matheoud, Moradin et al. 2013). One may envision that its degradation by GP63 is part of a strategy used by *L. mexicana* to establish infection in an environment devoid of oxidants, thereby contributing to parasite survival. The *LYST* protein is a regulator of lysosome size and its absence leads to further PV expansion and enhanced *L. amazonensis* replication (Wilson, Huynh et al. 2008). It is interesting to note that *LYST* was proposed to function as an adaptor protein that juxtaposes proteins such as SNAREs that mediate intracellular membrane fusion reactions (Tchernev, Mansfield et al. 2002). In this context, cleavage of SNAREs that interact with *LYST* may interfere with its function and promote

PV expansion. Further studies will be necessary to clarify these issues, including the potential role of VAMP3 and VAMP8 in PV biogenesis and expansion.

Previous studies using Δcpb parasites led to the conclusion that CPB enables *L. mexicana* to alter host cell signaling and gene expression through the cleavage of various host proteins (Cameron, McGachy et al. 2004, Abu-Dayyeh, Hassani et al. 2010). Hence, CPB-dependent cleavage of PTP-1B, NF- κ B, STAT1, and AP1 in *L. mexicana*-infected macrophages was associated with the inhibition of IL-12 expression and generation of nitric oxide, both of which are important for initiation of a host immune response and parasite killing, respectively. Our finding that GP63 expression is down-modulated in the Δcpb mutant raises the possibility that cleavage of those transcription factors may actually be mediated by GP63. Indeed, GP63 cleaves numerous host macrophage effectors, including PTP-1B, NF- κ B, STAT1, and AP1 (Isnard, Shio et al. 2012). Revisiting the role of CPB in the context of GP63 expression will be necessary to elucidate whether, and to which extent, CPB is acting directly on the host cell proteome.

In sum, we discovered that CPB contributes to *L. mexicana* virulence in part through the regulation of GP63 expression. Complementation of the Δcpb mutant revealed the importance of GP63 for the virulence of *L. mexicana*, as it participates in the survival of intracellular parasites, PV expansion, and the formation of cutaneous lesions.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

Experiments involving mice were done as prescribed by protocol 1406-02, which was approved by the *Comité Institutionnel de Protection des Animaux* of the INRS-Institut Armand-Frappier. *In vivo* infections were performed as per Animal Use Protocol #4859, which was approved by the Institutional Animal Care and Use Committees at McGill University. These protocols respect procedures on good animal practice provided by the Canadian Council on Animal Care (CCAC).

Antibodies

The mouse anti-GP63 monoclonal antibody was previously described (Button, Wilson et al. 1993). The mouse anti-phosphoglycans CA7AE monoclonal antibody (Tolson, Turco et al. 1989) was from Cedarlane and the rabbit polyclonal anti-aldolase was a gift from Dr. A. Jardim (McGill University). Rabbit polyclonal antibodies for VAMP3 and VAMP8 were obtained from Synaptic Systems.

Cell culture

Bone marrow-derived macrophages (BMM) were differentiated from the bone marrow of 6- to 8-week-old female 129XB6 mice (Charles River Laboratories) as previously described (Descoteaux et Matlashewski 1989). Cells were cultured for 7 days in complete medium (DMEM [Life Technologies] supplemented with L-glutamine [Life Technologies], 10% heat-inactivated FBS [PAA Laboratories], 10 mM HEPES at pH 7.4, and antibiotics) containing 15% v/v L929 cell-conditioned medium as a source of M-CSF. Macrophages were kept at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. To render BMM quiescent prior to experiments, cells were transferred to 6- or 24-well tissue culture microplates (TrueLine) and kept for 16 h in complete DMEM without L929 cell-conditioned medium.

Promastigotes of *L. mexicana* wild-type strain (MNYC/BZ/62/M379) and *L. amazonensis* (MPRO/BR/72/M 1841-LV-79) were grown at 26°C in *Leishmania* medium (Medium 199 supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 40 mM HEPES pH 7.4, 100 µM hypoxanthine, 5 µM hemin, 3 µM biopterin, 1 µM biotin, and antibiotics). The isogenic *L. mexicana* CPB-deficient mutant Δcpb^{pac} (thereafter referred to as Δcpb) and its complemented counterpart

Δcpb^{pac} [pGL263] (thereafter referred to as $\Delta cpb+CPB$) were described previously (Denise, McNeil et al. 2003). *L. mexicana* Δcpb promastigotes were electroporated as described (Descoteaux, Garraway et al. 1994) with the pLEXNeoGP63.1 plasmid (Joshi, Kelly et al. 2002) to generate $\Delta cpb+GP63$ parasites. *L. mexicana* $\Delta cpb+CPB$ and $\Delta cpb+GP63$ promastigotes were grown in the presence of 50 μ g/ml hygromycin or 50 μ g/ml G418, respectively.

Synchronized phagocytosis assays

Prior to macrophage infections, promastigotes in late stationary phase were opsonized with DBA/2 mouse serum. For synchronized phagocytosis using parasites, macrophages and parasites were incubated at 4°C for 10 min and spun at 167 *g* for 1 min, and internalization was triggered by transferring cells to 34°C. Macrophages were washed twice after 2h with complete DMEM to remove the non-internalized parasites and were further incubated at 34°C for the required times. Cells were then washed with PBS and stained using the Hema 3™ Fixative and Solutions kit (Fisher HealthCare), or prepared for confocal immunofluorescence microscopy.

Confocal immunofluorescence microscopy

Macrophages on coverslips were fixed with 2% paraformaldehyde (Canemco and Mirvac) for 40 min and blocked/permeabilized for 17 min with a solution of 0.05% saponin, 1% BSA, 6% skim milk, 2% goat serum, and 50% FBS. This was followed by a 2 h incubation with primary antibodies diluted in PBS. Macrophages were then incubated with a suitable combination of secondary antibodies (anti-rabbit Alexa Fluor 488 and anti-rat 568; Molecular Probes) and DAPI (Life technologies). Coverslips were washed three times with PBS after every step. After the final washes, Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates) was used to mount coverslips on glass slides, and coverslips were sealed with nail polish (Sally Hansen). Macrophages were imaged with the 63X objective of an LSM780 microscope (Carl Zeiss Microimaging), and images were taken in sequential scanning mode. Image analysis and vacuole size measurements were performed with the ZEN 2012 software.

Electrophoresis, Western blotting, and zymography.

Prior to lysis, macrophages were placed on ice and washed with PBS containing 1 mM sodium orthovanadate and 5 mM 1,10-phenanthroline (Roche). Cells were scraped in the presence of lysis buffer containing 1% Nonidet P-40 (Caledon), 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) (Bioshop), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8), 5 mM 1,10-phenanthroline, and phosphatase and protease inhibitors (Roche). Parasites were washed twice with PBS and lysed in the presence of lysis buffer containing 0.5% Nonidet P-40 (Caledon), 100mM Tris-HCl (Bioshop) and 150 mM NaCl at -70° C. Lysates were thawed on ice and centrifuged for 10 min to remove insoluble matter. After protein quantification, protein samples were boiled (100°C) for 6 min in SDS sample buffer and migrated in 12% or 15% SDS-PAGE gels. Three micrograms and 15 µg of protein were loaded for parasite and infected macrophage lysates, respectively. Proteins were transferred onto Hybond-ECL membranes (Amersham Biosciences), blocked for 1h in TBS 1X-0.1% Tween containing 5% skim milk, incubated with primary antibodies (diluted in TBS 1X-0.1% Tween containing 5% BSA) overnight at 4°C, and thence with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. Then, membranes were incubated in ECL (GE Healthcare), and immunodetection was achieved via chemiluminescence. Membranes were washed 3 times between each step. For zymography, 2 µg of lysate were incubated at RT for 6 min in sample buffer without DTT and then migrated in 12% SDS-PAGE gels with 0.2% gelatin (Sigma). Gels were incubated for 1 h in the presence of 50 mM Tris pH 7.4, 2,5% Triton X-100, 5 mM CaCl₂ and 1µM ZnCl₂ and incubated overnight in the presence of 50 mM Tris pH 7.4, 5 mM CaCl₂, 1µM ZnCl₂ and 0,01% NaN₃ at 37°C (Hassani, Shio et al. 2014).

FACS analysis

Late stationary phase promastigotes were incubated for 30 min in complete DMEM medium with 20% human serum from healthy donors. Parasites were then incubated in LIVE/DEAD® Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Life technologies) and fixed in 2% paraformaldehyde. Flow cytometric analysis was carried out using the LSRFortessa cytometer (Special Order Research Product; BD Biosciences), and the BD FACSDiva Software (version 6.2) was used for data acquisition and analysis.

Mouse infections

Male BALB/c mice (6 to 8 weeks old) were purchased from Charles River Laboratories and infected in the right hind footpad with 5×10^6 stationary phase *L. mexicana* promastigotes as described (Gomez, Contreras et al. 2009). Disease progression was monitored by measuring footpad swelling weekly with a metric caliper, for up to 9 weeks post-infection. Footpads were then processed to calculate parasite burden using the limiting dilution assay.

Limiting dilution assay

After 9 weeks of infection, mice were euthanized under CO₂ asphyxiation and subsequently by cervical dislocation. The infected footpads were surface-sterilized with a chlorine dioxide based disinfectant followed by ethanol 70% for 5 min. Footpads were washed in PBS, lightly sliced, transferred to a glass tissue homogenizer containing 6 ml of PBS, and manually homogenized. The last step was repeated two to three times, until complete tissue disruption was achieved. Final homogenate was then centrifuged at $3,000 \times g$ for 5 minutes and resuspended in the appropriate volume of PBS. 100 μ l of homogenate were added in duplicates to 96-well plates containing 100 μ l of complete Schneider's medium in each well (twenty-four 2-fold dilutions for each duplicate). Plates were incubated at 28°C. After 7-10 days, the number of viable parasites was determined from the highest dilutions at which promastigotes were observed using an inverted microscope (Lima, Bleyenbergh et al. 1997).

Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

Total RNA was extracted from mid-logarithmic promastigote parasite using the TRIzol reagent (Invitrogen Life Technology, Carlsbad, CA) and reverse transcribed. One-tenth of the resulting cDNA was amplified by PCR on a DNA thermal cycler, version 2.3 (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT), with the following primer pairs: for the *L. mexicana gp63* C-1 ACCGTCTGAGAGTCGGA ACT (forward), GTAGTCCAGGAATGGCGAGT (reverse); and for α -tubulin CTATCTGCATCCACATTGGC (forward), ACTTGTCAGAGGGCATGGA (reverse). The PCR products were analyzed by electrophoresis on a 3% (wt/vol) agarose gel, and the pictures were taken using AlphaMager 3400 imaging software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA).

Statistical analyses

Statistically significant differences were analyzed by ANOVA followed by the Tukey post-hoc test using the Graphpad Prism program (version 5.0). For the limiting dilution assay, the non-parametric Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test was used. Values starting at $P < 0.05$ were considered statistically significant. All data are presented as mean \pm SEM.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Armando Jardim (McGill University) for providing the anti-aldolase antiserum, Jessy Tremblay for assistance in immunofluorescence experiments, and Guillermo Arango Duque for critical comments. This work was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grants MOP-125990 to AD and MOP-12671 to MO and the Medical Research Council (MR/K019384) to JCM. The Centre for Host-Parasite Interactions is supported by the Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies (Regroupement Stratégique). The Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology is supported by core funding from the Wellcome Trust [104111].

SUPPORTING INFORMATION

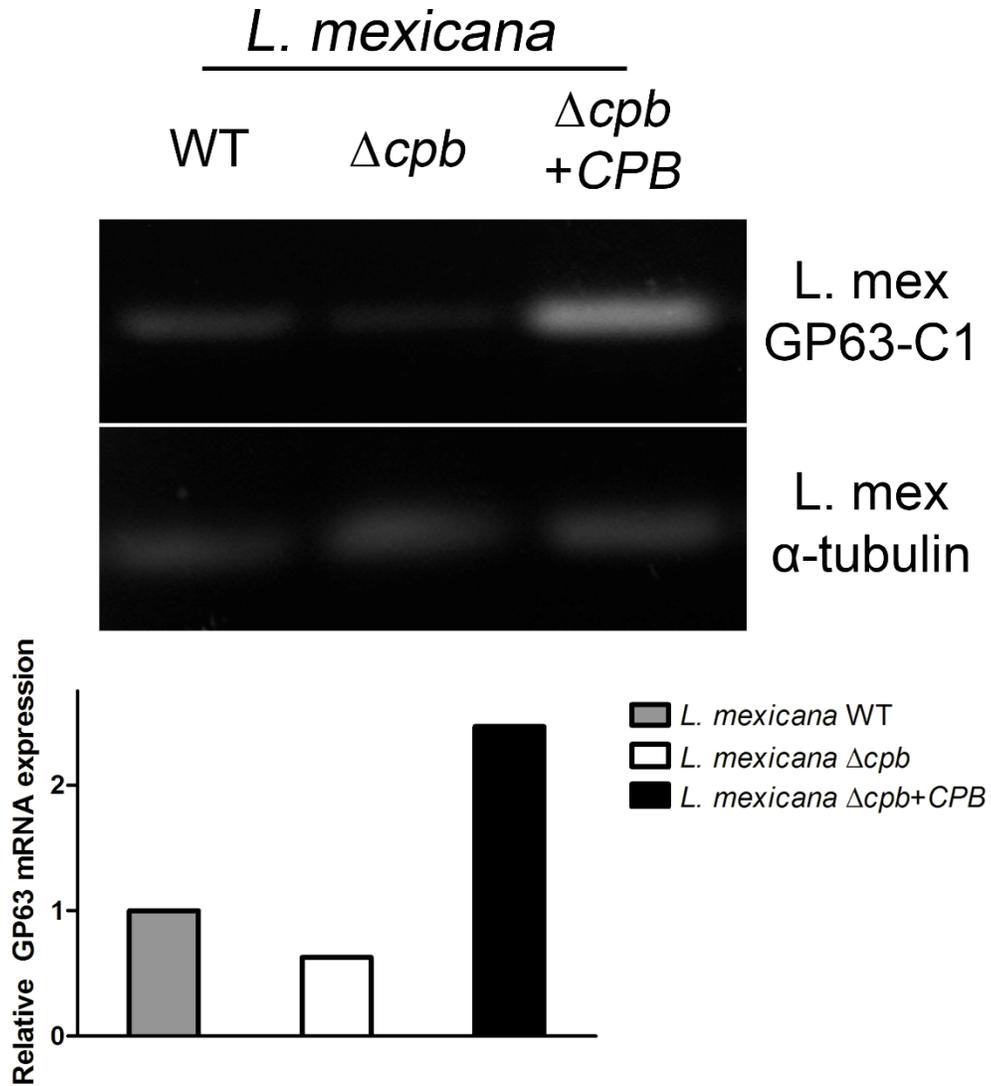


Figure S1. GP63 mRNA levels are reduced in Δcpb . RNA was extracted from mid-logarithmic phase promastigotes. Then, reverse transcription followed by PCR was done to assess mRNA levels. Relative RNA levels were determined via densitometric analysis of band intensities normalized to the α -tubulin housekeeping gene.

SECTION 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION ET CONCLUSION

Comme plusieurs agents pathogènes intracellulaires, la survie de *Leishmania* chez le mammifère dépend de sa capacité à survivre dans le macrophage. Cette étape est cruciale afin d'infecter l'hôte. Jusqu'à présent les recherches sur la CPB démontrent une importance de celle-ci dans la balance de la réponse Th1 vs Th2. Ce décalage vers une réponse Th2 permet au parasite de mieux survivre à l'intérieur du macrophage *in vivo*. Toutefois, ceci n'explique pas la diminution de la survie chez le macrophage *in vitro*. Lorsqu'il n'y a que le parasite et le macrophage, la CPB a aussi un impact sur la survie.

Pour commencer, nous avons cherché à analyser le rôle de CPB sur les SNAREs VAMP3 et VAMP8 qui sont impliquées dans la maturation du phagosome. Chez *L. major*, le clivage de ces SNAREs, permet au parasite de retarder la fusion avec les endosomes et lysosomes. Même si *L. mexicana* force la fusion de vésicule pour accroître la grosseur de sa vacuole, nous voulions voir si ces mêmes SNAREs étaient aussi clivées. À notre grand étonnement, le clivage de VAMP3 et VAMP8 était présent chez la souche sauvage (WT), mais pas chez la souche sans CPB (KO). Nous nous attendions à voir soit un clivage ou l'absence de clivage selon la SNAREs puisque la survie de parasite nécessite la fusion de vésicules, mais pas à une différence entre les deux souches. CPB n'est pas connu pour être capable de cliver des SNAREs.

Puisque GP63 est connu pour dégrader ces SNAREs, nous avons comparé le niveau de GP63 durant l'infection. Le niveau de GP63 dans le KO était très inférieur au WT. Cette différence explique pourquoi les parasites knock-out de CPB ne sont pas capables de cliver VAMP3 et VAMP8, qui sont habituellement clivés par GP63. Ceci démontre que même si *L. mexicana* force la fusion entre les vésicules, il doit y avoir un certain contrôle, puisqu'en clivant VAMP3 et VAMP8, le parasite retarde la fusion avec les endosomes et lysosomes. Donc le parasite tente tout de même de se protéger des agents microbicides du macrophage.

Depuis plusieurs années, Mottram décrit CPB comme un facteur de virulence important puisque les souches de *L. mexicana* sans CPB ont une nette diminution de survie et de formation de lésion au site d'inoculation. Le fait que CPB module GP63 explique cette diminution de

virulence. Il a été prouvé, à l'aide de la protéine CPB2.8 recombinante, que CPB clive NF- κ B et une panoplie d'autres protéines de l'hôte. En fin de compte, ces clivages mènent à une réponse de type Th2 au lieu d'une réponse de type Th1 (Saravia, Escorcia et al. 2006). Toutefois, suite à cette découverte sur la perte de GP63, les affirmations sur la survie *in vitro* et *in vivo* ainsi que de la formation de lésion sont à vérifier. Il est déjà connu que GP63 est essentiel à la survie du parasite chez l'hôte et dans le macrophage. C'est pourquoi des comparaisons plus approfondies ont été nécessaires à la confirmation de l'importance de CPB dans l'infection.

Pour ce faire, nous avons utilisé une souche KO dans laquelle un plasmide a été ajouté. Le premier contenant les 19 copies de CPB de *L. mexicana* obtenu par le laboratoire de Mottram et le deuxième, la première copie de GP63 de *L. major*, obtenu par le laboratoire de McMaster pour créer le « rescue » de CPB (RE) et le « add-back » de GP63 (AB) respectivement. Suite à l'analyse des protéines des différentes souches, il nous a été possible d'affirmer que nous avons les parasites nécessaires pour étudier le rôle de CPB et de GP63 dans l'infection de *L. mexicana*. La souche WT, RE et AB expriment GP63 tandis qu'il y a une forte diminution chez la souche KO. Ce qui démontre que le parasite a besoin de CPB pour l'exprimer puisque le RE, qui possède les mêmes caractéristiques que le KO à l'exception de la présence de CPB, produit de la GP63. Étrangement, le LPG est aussi affecté par la délétion de CPB. De plus, l'ajout de CPB ou de GP63 est suffisant pour restaurer le LPG chez la souche KO.

Il a déjà été démontré que des délétions de cathepsines chez *Leishmania* menaient à une dérégulation de nombreux gènes. Suite au knock-out de la cathepsine B de *L. donovani*, il a été constaté que le protéome et sécrétome du parasite a changé comparé au type sauvage (Gerbaba et Gedamu 2013). Il a eu un impact sur l'expression de 83 protéines, dont LPG3, une protéine liée à la biosynthèse du LPG (Gerbaba et Gedamu 2013). Fait intéressant, il a été remarqué que lorsqu'il y a un défaut dans la synthèse du LPG, par une délétion de LPG3, l'expression d'autres protéines à ancre GPI comme GP63 est aussi défectueuse (Descoteaux, Avila et al. 2002). Il serait important de voir si la CPB, une autre cathepsine de *Leishmania* pourrait avoir un rôle semblable dans le cas de *L. mexicana*. Dans un autre angle, la régulation de l'expression des gènes est complexe chez *Leishmania*. Lorsque la transcription est enclenchée, le chromosome au complet se fait transcrire. La régulation se produit à un niveau post-transcriptionnel (Spath, Drini et al. 2015). Aussi, parmi les 83 changements dans l'expression de protéines observées suite à la délétion de la cathepsine B de *L. donovani*, des

protéines de liaison à l'ARN ont été dénombrées. L'effet de la cathepsine B de *L. donovani* sur l'expression des protéines de liaison d'ARN est intéressant et peut expliquer comment une protéase de cystéine pourrait avoir un rôle dans la régulation des gènes. En somme, la cystéine protéase a une incidence sur la protéine de liaison d'ARN qui augmente la stabilité de l'ARN. Une meilleure stabilité de l'ARN permet un plus grand nombre de protéines synthétisé par la traduction comme pour LPG et GP63. Les niveaux différentiels d'ARNm de GP63 retrouvé ainsi que le niveau d'expression de LPG chez les différentes souches de *L. mexicana* démontrent que cette hypothèse est valable et qu'elle doit être vérifiée.

Une autre manière comment une cathepsine peut avoir un impact sur l'expression de GP63 et de LPG passe par la voie de l'autophagie (Williams, Tetley et al. 2006). Les cathepsines se trouvent dans les compartiments lysosomaux.(Mottram, Robertson et al. 1992). Ils sont utilisés par *Leishmania* pour dégrader leurs propres protéines durant la voie de l'autophagie (Besteiro, Williams et al. 2006). Il a été démontré que, sans CPB, l'autophagie chez *L.mexicana* est altérée. La voie de l'autophagie est très active au cours de la différenciation en amastigote et de la métacyclogenèse (Williams, Tetley et al. 2006). L'expression de GP63 et de LPG est à leur apogée dans les promastigotes métacycliques (Turco et Sacks 1991, Yao, Donelson et al. 2003). Alors, il se pourrait que les parasites sans CPB aient un problème lors de la métacyclogenèse et que les parasites ne puissent pas compléter leur différenciation et donc d'avoir des défauts qui leur causeraient une diminution dans leurs gènes de virulence comme LPG et GP63.

Toutefois, la manière dont GP63 est régulé n'a pas été examinée au cours de ce projet, mais cela fait partie des perspectives d'expériences futures. De plus, le LPG n'a pas d'effet sur la survie et la formation de lésions chez *L. mexicana*. C'est pourquoi le projet de recherche ne s'est pas dirigé vers le LPG, mais plus vers GP63 et CPB. Ces deux protéases sont connues pour être nécessaires à l'infection.

Pour la suite du projet, nous avons comparé le clivage de VAMP3 et de VAMP8 une autre fois, mais maintenant avec les quatre souches (WT, KO, RE et AB). Les résultats ont permis de confirmer que le clivage de ces SNAREs est effectué par GP63 et non CPB. De plus, le recrutement de VAMP3 et non de VAMP8 au niveau de la vacuole contenant les parasites démontre que le parasite exerce un certain contrôle sur le trafic intracellulaire du macrophage. Aussi, cette expérience démontre que le GP63 exprimé par le RE et l'AB est fonctionnel en infection.

Une fois la démonstration que les nouveaux parasites, RE et AB, sont efficaces durant les infections, nous avons vérifié la survie et la taille des vacuoles des macrophages infectés par *Leishmania*. Comme ce qu'il a été noté par le laboratoire du Dr Mottram, les parasites CPB knock-out survivent moins bien que le WT dans les macrophages. De plus, les parasites RE et AB sont capables de survivre et de se multiplier dans le macrophage. Aussi, la taille des vacuoles s'étend bien pour tous les parasites sauf le CPB knock-out. Donc contrairement à ce qui a été démontré, CPB, qui est absent dans l'AB, n'a pas de rôle dans la survie dans le macrophage. Au niveau de la taille des vacuoles, il a déjà été démontré que l'extension de la vacuole est essentielle à la survie du parasite. En raison de cela, il est possible de croire que GP63 permet au parasite d'étendre la vacuole afin de diminuer la concentration des agents microbicides pour ainsi survivre dans le macrophage.

Une fois la survie *in vitro* évaluée, nous avons poursuivi les expériences à la survie *in vivo*. Avant de faire les expériences *in vivo*, nous avons procédé à un test de lyse par le complément. Les parasites doivent passer par le sang pour se rendre jusqu'aux macrophages. Toutefois, le sang est un milieu nuisible au parasite avec le complément. Par contre, le parasite possède le LPG comme barrière physique et le GP63 pour inhiber le complément. Les résultats obtenus dans ce projet le confirment. Une fois inoculée dans la souris, la souche AB a restauré la taille des lésions ainsi que la parasitémie. Ce qui prouve qu'*in vivo* aussi GP63 a une importance pour la virulence et non CPB.

Les résultats de ce projet de recherche démontrent que CPB n'est pas un facteur de virulence, mais influence l'expression de GP63 et LPG, qui eux sont des facteurs de virulence importants pour l'infection. Dans le cas de *L. mexicana*, il n'a pas besoin d'utiliser le LPG pour empêcher la fusion des vésicules. Toutefois, le LPG pourrait être utile pour se protéger du complément, favoriser la phagocytose et réduire les ROS comme c'est le cas chez *L. major* (Puentes, Da Silva et al. 1990, Spath, Garraway et al. 2003). De plus, le GP63 permet de se protéger du complément, dégrader les peptides antimicrobiens, inhiber la production de ROS, modifier la sécrétion de cytokine. Aussi, de ce que nous avons vu lors de nos recherches, GP63 pourrait avoir un effet sur la taille des vacuoles pour améliorer la survie du parasite. De plus, puisque la CPB se situe dans les compartiments lysosomaux, il serait important de voir comment elle peut avoir un impact sur le niveau d'ARNm. Il serait d'ailleurs intéressant d'utiliser la souche avec l'enzyme dont le site actif a été muté afin de voir si ces effets sont dus à l'activité enzymatique de celle-ci (Brooks, Tetley et al. 2000). Ces résultats permettent de rectifier le rôle de CPB chez *L. mexicana*. Mais au-delà de cela, ils amènent des pistes afin de mieux comprendre comment les vacuoles communes se forment, comment *Leishmania* régule l'expression de gènes et pourquoi les traitements avec des inhibiteurs de CPB fonctionnent pour le traitement des infections par *Leishmania*.

Liste des références

- Abu-Dayyeh, I., K. Hassani, E. R. Westra, J. C. Mottram and M. Olivier (2010). "Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions." Infect Immun **78**(6): 2438-2445.
- Abu-Dayyeh, I., M. T. Shio, S. Sato, S. Akira, B. Cousineau and M. Olivier (2008). "Leishmania-induced IRAK-1 inactivation is mediated by SHP-1 interacting with an evolutionarily conserved KTIM motif." PLoS Negl Trop Dis **2**(12): e305.
- Aga, E., D. M. Katschinski, G. van Zandbergen, H. Laufs, B. Hansen, K. Muller, W. Solbach and T. Laskay (2002). "Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*." J Immunol **169**(2): 898-905.
- Akarid, K., D. Arnoult, J. Micic-Polianski, J. Sif, J. Estaquier and J. C. Ameisen (2004). "Leishmania major-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c." J Leukoc Biol **76**(1): 95-103.
- Akbar, A. N. and J. M. Fletcher (2005). "Memory T cell homeostasis and senescence during aging." Curr Opin Immunol **17**(5): 480-485.
- Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Alexander, J. and K. Vickerman (1975). "Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages." J Protozool **22**(4): 502-508.
- Anderson, C. F., M. Oukka, V. J. Kuchroo and D. Sacks (2007). "CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis." J Exp Med **204**(2): 285-297.
- Antinori, S., L. Schifanella and M. Corbellino (2012). "Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **31**(2): 109-118.
- Antonin, W., C. Holroyd, D. Fasshauer, S. Pabst, G. F. Von Mollard and R. Jahn (2000). "A SNARE complex mediating fusion of late endosomes defines conserved properties of SNARE structure and function." EMBO J **19**(23): 6453-6464.
- Arango Duque, G. and A. Descoteaux (2015). "Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means." Curr Opin Microbiol **26**: 32-40.
- Arango Duque, G., M. Fukuda, S. J. Turco, S. Stager and A. Descoteaux (2014). "Leishmania promastigotes induce cytokine secretion in macrophages through the degradation of synaptotagmin XI." J Immunol **193**(5): 2363-2372.

- Ashok, D., S. Schuster, C. Ronet, M. Rosa, V. Mack, C. Lavanchy, S. F. Marraco, N. Fasel, K. M. Murphy, F. Tacchini-Cottier and H. Acha-Orbea (2014). "Cross-presenting dendritic cells are required for control of *Leishmania major* infection." Eur J Immunol **44**(5): 1422-1432.
- Babior, B. M. (2004). "NADPH oxidase." Curr Opin Immunol **16**(1): 42-47.
- Bacellar, O., D. Faria, M. Nascimento, T. M. Cardoso, K. J. Gollob, W. O. Dutra, P. Scott and E. M. Carvalho (2009). "Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis." J Infect Dis **200**(1): 75-78.
- Bajno, L., X. R. Peng, A. D. Schreiber, H. P. Moore, W. S. Trimble and S. Grinstein (2000). "Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation." J Cell Biol **149**(3): 697-706.
- Barbieri, C. L., K. Brown and M. Rabinovitch (1985). "Depletion of secondary lysosomes in mouse macrophages infected with *Leishmania mexicana amazonensis*: a cytochemical study." Z Parasitenkd **71**(2): 159-168.
- Bates, P. A. (2007). "Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies." Int J Parasitol **37**(10): 1097-1106.
- Bates, P. A. and M. E. Rogers (2004). "New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*." Curr Mol Med **4**(6): 601-609.
- Becker, T., A. Volchuk and J. E. Rothman (2005). "Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774 macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(11): 4022-4026.
- Beil, W. J., G. Meinardus-Hager, D. C. Neugebauer and C. Sorg (1992). "Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice." J Leukoc Biol **52**(2): 135-142.
- Berti, P. J. and A. C. Storer (1995). "Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases." J Mol Biol **246**(2): 273-283.
- Besteiro, S., R. A. Williams, L. S. Morrison, G. H. Coombs and J. C. Mottram (2006). "Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*." J Biol Chem **281**(16): 11384-11396.
- Beyenbach, K. W. and H. Wiczorek (2006). "The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation." J Exp Biol **209**(Pt 4): 577-589.
- Bimal, S., S. K. Singh, S. Sinha, K. Pandey, P. K. Sinha, A. Ranjan, S. K. Bhattacharya and P. Das (2008). "*Leishmania donovani*: role of CD2 on CD4⁺ T-cell function in Visceral Leishmaniasis." Exp Parasitol **118**(2): 238-246.
- Biswas, S. K. and A. Mantovani (2010). "Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm." Nat Immunol **11**(10): 889-896.

- Blos, M., U. Schleicher, F. J. Soares Rocha, U. Meissner, M. Rollinghoff and C. Bogdan (2003). "Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase." *Eur J Immunol* **33**(5): 1224-1234.
- Boutard, V., R. Havouis, B. Fouqueray, C. Philippe, J. P. Moulinoux and L. Baud (1995). "Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity." *J Immunol* **155**(4): 2077-2084.
- Bouvier, J., C. Bordier, H. Vogel, R. Reichelt and R. Etges (1989). "Characterization of the promastigote surface protease of *Leishmania* as a membrane-bound zinc endopeptidase." *Mol Biochem Parasitol* **37**(2): 235-245.
- Bouvier, J., R. J. Etges and C. Bordier (1985). "Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes." *J Biol Chem* **260**(29): 15504-15509.
- Bouvier, J., P. Schneider, R. Etges and C. Bordier (1990). "Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*." *Biochemistry* **29**(43): 10113-10119.
- Braun, V., V. Fraiser, G. Raposo, I. Hurbain, J. B. Sibarita, P. Chavrier, T. Galli and F. Niedergang (2004). "TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages." *EMBO J* **23**(21): 4166-4176.
- Brittingham, A., C. J. Morrison, W. R. McMaster, B. S. McGwire, K. P. Chang and D. M. Mosser (1995). "Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis." *J Immunol* **155**(6): 3102-3111.
- Brooks, D. R., H. Denise, G. D. Westrop, G. H. Coombs and J. C. Mottram (2001). "The stage-regulated expression of *Leishmania mexicana* CPB cysteine proteases is mediated by an intercistronic sequence element." *J Biol Chem* **276**(50): 47061-47069.
- Brooks, D. R., L. Tetley, G. H. Coombs and J. C. Mottram (2000). "Processing and trafficking of cysteine proteases in *Leishmania mexicana*." *J Cell Sci* **113** (Pt 22): 4035-4041.
- Broz, P. and D. M. Monack (2013). "Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens." *Nat Rev Immunol* **13**(8): 551-565.
- Bucci, C., R. G. Parton, I. H. Mather, H. Stunnenberg, K. Simons, B. Hoflack and M. Zerial (1992). "The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway." *Cell* **70**(5): 715-728.
- Button, L. L., G. Wilson, C. R. Astell and W. R. McMaster (1993). "Recombinant *Leishmania* surface glycoprotein GP63 is secreted in the baculovirus expression system as a latent metalloproteinase." *Gene* **134**(1): 75-81.
- Buxbaum, L. U. (2013). "*Leishmania mexicana* infection induces IgG to parasite surface glycoinositol phospholipids that can induce IL-10 in mice and humans." *PLoS Negl Trop Dis* **7**(5): e2224.

- Buxbaum, L. U., H. Denise, G. H. Coombs, J. Alexander, J. C. Mottram and P. Scott (2003). "Cysteine protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity." J Immunol **171**(7): 3711-3717.
- Callaghan, J., S. Nixon, C. Bucci, B. H. Toh and H. Stenmark (1999). "Direct interaction of EEA1 with Rab5b." Eur J Biochem **265**(1): 361-366.
- Cameron, P., A. McGachy, M. Anderson, A. Paul, G. H. Coombs, J. C. Mottram, J. Alexander and R. Plevin (2004). "Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway." J Immunol **173**(5): 3297-3304.
- Canton, J. and P. E. Kima (2012). "Targeting host syntaxin-5 preferentially blocks *Leishmania* parasitophorous vacuole development in infected cells and limits experimental *Leishmania* infections." Am J Pathol **181**(4): 1348-1355.
- Canton, J., B. Ndjamen, K. Hatsuzawa and P. E. Kima (2012a). "Disruption of the fusion of *Leishmania* parasitophorous vacuoles with ER vesicles results in the control of the infection." Cell Microbiol.
- Canton, J., B. Ndjamen, K. Hatsuzawa and P. E. Kima (2012b). "Disruption of the fusion of *Leishmania* parasitophorous vacuoles with ER vesicles results in the control of the infection." Cell Microbiol **14**(6): 937-948.
- Caron, E. and A. Hall (1998). "Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases." Science **282**(5394): 1717-1721.
- Castro, H., C. Sousa, M. Santos, A. Cordeiro-da-Silva, L. Flohe and A. M. Tomas (2002). "Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*." Free Radic Biol Med **33**(11): 1552-1562.
- Cecilio, P., B. Perez-Cabezas, N. Santarem, J. Maciel, V. Rodrigues and A. Cordeiro da Silva (2014). "Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite." Front Immunol **5**: 480.
- Chakour, R., C. Allenbach, F. Desgranges, M. Charmoy, J. Mauel, I. Garcia, P. Launois, J. Louis and F. Tacchini-Cottier (2009). "A new function of the Fas-FasL pathway in macrophage activation." J Leukoc Biol **86**(1): 81-90.
- Chakraborty, D., S. Banerjee, A. Sen, K. K. Banerjee, P. Das and S. Roy (2005). "*Leishmania donovani* affects antigen presentation of macrophage by disrupting lipid rafts." J Immunol **175**(5): 3214-3224.
- Chandra, D. and S. Naik (2008). "*Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism." Clin Exp Immunol **154**(2): 224-234.
- Chen, Y. A. and R. H. Scheller (2001). "SNARE-mediated membrane fusion." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 98-106.

- Cooper, M. D. and M. N. Alder (2006). "The evolution of adaptive immune systems." Cell **124**(4): 815-822.
- Coulombe, R., P. Grochulski, J. Sivaraman, R. Menard, J. S. Mort and M. Cygler (1996). "Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment." EMBO J **15**(20): 5492-5503.
- Courret, N., C. Frehel, N. Gouhier, M. Pouchelet, E. Prina, P. Roux and J. C. Antoine (2002). "Biogenesis of Leishmania-harboring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites." J Cell Sci **115**(Pt 11): 2303-2316.
- Das, S., K. Pandey, A. Kumar, A. H. Sardar, B. Purkait, M. Kumar, S. Kumar, V. N. Ravidas, S. Roy, D. Singh and P. Das (2012). "TGF-beta1 re-programs TLR4 signaling in *L. donovani* infection: enhancement of SHP-1 and ubiquitin-editing enzyme A20." Immunol Cell Biol **90**(6): 640-654.
- De Souza Leao, S., T. Lang, E. Prina, R. Hellio and J. C. Antoine (1995a). "Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells." J Cell Sci **108**(Pt 10): 3219-3231.
- De Souza Leao, S., T. Lang, E. Prina, R. Hellio and J. C. Antoine (1995b). "Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells." J Cell Sci **108** (Pt 10): 3219-3231.
- Denise, H., K. McNeil, D. R. Brooks, J. Alexander, G. H. Coombs and J. C. Mottram (2003). "Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo." Infect Immun **71**(6): 3190-3195.
- Denny, P. W., M. C. Field and D. F. Smith (2001). "GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in Kinetoplastida." FEBS Lett **491**(1-2): 148-153.
- Dermine, J. F., S. Scianimanico, C. Prive, A. Descoteaux and M. Desjardins (2000). "Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis." Cell Microbiol **2**(2): 115-126.
- Descoteaux, A., H. A. Avila, K. Zhang, S. J. Turco and S. M. Beverley (2002). "Leishmania LPG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability." Embo J **21**(17): 4458-4469.
- Descoteaux, A., L. A. Garraway, K. A. Ryan, L. K. Garrity, S. J. Turco and S. M. Beverley (1994). Identification of genes by functional complementation in protozoan parasite *Leishmania*. Methods in Molecular Genetics (Molecular Microbiology Techniques). K. W. Adolph. San Diego, Academic Press. **3**: 22-48.
- Descoteaux, A., Y. Luo, S. J. Turco and S. M. Beverley (1995). "A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*." Science **269**(5232): 1869-1872.
- Descoteaux, A. and G. Matlashewski (1989). "c-fos and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages." Mol Cell Biol **9**(11): 5223-5227.

- Descoteaux, A., N. Moradin and G. Arango Duque (2013). "Leishmania dices away cholesterol for survival." Cell Host Microbe **13**(3): 245-247.
- Descoteaux, A. and S. J. Turco (1999). "Glycoconjugates in Leishmania infectivity." Biochim Biophys Acta **1455**(2-3): 341-352.
- Desjardins, M., J. E. Celis, G. van Meer, H. Dieplinger, A. Jahraus, G. Griffiths and L. A. Huber (1994). "Molecular characterization of phagosomes." J Biol Chem **269**(51): 32194-32200.
- Desjardins, M. and A. Descoteaux (1997). "Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan." J Exp Med **185**(12): 2061-2068.
- Desjardins, M., L. A. Huber, R. G. Parton and G. Griffiths (1994). "Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus." J Cell Biol **124**(5): 677-688.
- Desjardins, M., N. N. Nzala, R. Corsini and C. Rondeau (1997). "Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes." J Cell Sci **110 (Pt 18)**: 2303-2314.
- Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **27**(5): 305-318.
- Diaz-Gandarilla, J. A., C. Osorio-Trujillo, V. I. Hernandez-Ramirez and P. Talamas-Rohana (2013). "PPAR Activation Induces M1 Macrophage Polarization via cPLA(2)-COX-2 Inhibition, Activating ROS Production against Leishmania mexicana." Biomed Research International.
- Dominguez, M., I. Moreno, M. Lopez-Trascasa and A. Torano (2002). "Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum." J Exp Med **195**(4): 451-459.
- Donovan, M. J., B. Z. Maciuba, C. E. Mahan and M. A. McDowell (2009). "Leishmania infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner." Exp Parasitol **123**(1): 58-64.
- Doroud, D., F. Zahedifard, A. Vatanara, A. R. Najafabadi and S. Rafati (2011). "Cysteine proteinase type I, encapsulated in solid lipid nanoparticles induces substantial protection against Leishmania major infection in C57BL/6 mice." Parasite Immunol **33**(6): 335-348.
- Duclos, S. and M. Desjardins (2000). "Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens." Cell Microbiol **2**(5): 365-377.
- Elliott, M. R. and K. S. Ravichandran (2010). "Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease." J Cell Biol **189**(7): 1059-1070.
- Ellis, M., D. K. Sharma, J. D. Hilley, G. H. Coombs and J. C. Mottram (2002). "Processing and trafficking of Leishmania mexicana GP63. Analysis using GP18 mutants deficient in glycosylphosphatidylinositol protein anchoring." J Biol Chem **277**(31): 27968-27974.

- Engel, J. C., P. S. Doyle, I. Hsieh and J. H. McKerrow (1998). "Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection." J Exp Med **188**(4): 725-734.
- Engel, J. C., C. Torres, I. Hsieh, P. S. Doyle and J. H. McKerrow (2000). "Upregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant *Trypanosoma cruzi*." J Cell Sci **113 (Pt 8)**: 1345-1354.
- Esch, K. J., R. Juelsgaard, P. A. Martinez, D. E. Jones and C. A. Petersen (2013). "Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function." J Immunol **191**(11): 5542-5550.
- Fahey, T. J., 3rd, K. J. Tracey, P. Tekamp-Olson, L. S. Cousens, W. G. Jones, G. T. Shires, A. Cerami and B. Sherry (1992). "Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function." J Immunol **148**(9): 2764-2769.
- Faria, M. S., F. C. Reis, R. L. Azevedo-Pereira, L. S. Morrison, J. C. Mottram and A. P. Lima (2011). "Leishmania inhibitor of serine peptidase 2 prevents TLR4 activation by neutrophil elastase promoting parasite survival in murine macrophages." J Immunol **186**(1): 411-422.
- Field, M. C., S. K. Natesan, C. Gabernet-Castello and V. L. Koumandou (2007). "Intracellular trafficking in the trypanosomatids." Traffic **8**(6): 629-639.
- Flandin, J. F., F. Chano and A. Descoteaux (2006). "RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages." Eur J Immunol **36**(2): 411-420.
- Flannagan, R. S., G. Cosio and S. Grinstein (2009). "Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies." Nat Rev Microbiol **7**(5): 355-366.
- Franca-Costa, J., J. L. Wanderley, P. Deolindo, J. B. Zarattini, J. Costa, L. Soong, M. A. Barcinski, A. Barral and V. M. Borges (2012). "Exposure of phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity." PLoS One **7**(5): e36595.
- Fratti, R. A., J. Chua and V. Deretic (2002). "Cellubrevin alterations and Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest." J Biol Chem **277**(19): 17320-17326.
- Garami, A. and T. Ilg (2001a). "Disruption of mannose activation in *Leishmania mexicana*: GDP-mannose pyrophosphorylase is required for virulence, but not for viability." EMBO J **20**(14): 3657-3666.
- Garami, A. and T. Ilg (2001b). "The role of phosphomannose isomerase in *Leishmania mexicana* glycoconjugate synthesis and virulence." J Biol Chem **276**(9): 6566-6575.
- Garami, A., A. Mehlert and T. Ilg (2001). "Glycosylation defects and virulence phenotypes of *Leishmania mexicana* phosphomannomutase and dolicholphosphate-mannose synthase gene deletion mutants." Mol Cell Biol **21**(23): 8168-8183.
- Gautam, S., R. Kumar, N. Singh, A. K. Singh, M. Rai, D. Sacks, S. Sundar and S. Nysten (2014). "CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis." J Infect Dis **209**(2): 290-299.

- Gazozai, S., J. Iqbal, I. Bukhari and S. Bashir (2010). "Comparison of diagnostic methods in cutaneous Leishmaniasis (histopathology compared to skin smears)." Pak J Pharm Sci **23**(4): 363-366.
- Gerbaba, T. K. and L. Gedamu (2013). "Cathepsin B gene disruption induced Leishmania donovani proteome remodeling implies cathepsin B role in secretome regulation." PLoS One **8**(11): e79951.
- Ghosh, J., M. Bose, S. Roy and S. N. Bhattacharyya (2013). "Leishmania donovani targets Dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection." Cell Host Microbe **13**(3): 277-288.
- Gomez, M. A., I. Contreras, M. Halle, M. L. Tremblay, R. W. McMaster and M. Olivier (2009). "Leishmania GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases." Sci Signal **2**(90): ra58.
- Gorak, P. M., C. R. Engwerda and P. M. Kaye (1998). "Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following Leishmania donovani infection." Eur J Immunol **28**(2): 687-695.
- Gordon, A. H., P. D. Hart and M. R. Young (1980). "Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages." Nature **286**(5768): 79-80.
- Gordon, S. (2008). "Elie Metchnikoff: father of natural immunity." Eur J Immunol **38**(12): 3257-3264.
- Gordon, S. and F. O. Martinez (2010). "Alternative activation of macrophages: mechanism and functions." Immunity **32**(5): 593-604.
- Gostner, J. M., K. Becker, D. Fuchs and R. Sucher (2013). "Redox regulation of the immune response." Redox Rep **18**(3): 88-94.
- Griffin, G. K., G. Newton, M. L. Tarrío, D. X. Bu, E. Maganto-García, V. Azcutia, P. Alcaide, N. Gräbe, F. W. Luscinskas, K. J. Croce and A. H. Lichtman (2012). "IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation." J Immunol **188**(12): 6287-6299.
- Guani-Guerra, E., T. Santos-Mendoza, S. O. Lugo-Reyes and L. M. Teran (2010). "Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease." Clin Immunol **135**(1): 1-11.
- Guler, R., M. Afshar, B. Arendse, S. P. Parihar, M. Revaz-Breton, M. Leitges, A. Schwegmann and F. Brombacher (2011). "PKC delta regulates IL-12p40/p70 production by macrophages and dendritic cells, driving a type 1 healer phenotype in cutaneous leishmaniasis." European Journal of Immunology **41**(3): 706-715.
- Gupta, P., J. Giri, S. Srivastav, A. G. Chande, R. Mukhopadhyaya, P. K. Das and A. Ukil (2014). "Leishmania donovani targets tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 3 for impairing TLR4-mediated host response." FASEB J **28**(4): 1756-1768.
- Hackam, D. J., O. D. Rotstein, M. K. Bennett, A. Klip, S. Grinstein and M. F. Manolson (1996). "Characterization and subcellular localization of target membrane soluble NSF attachment

- protein receptors (t-SNAREs) in macrophages. Syntaxins 2, 3, and 4 are present on phagosomal membranes." J Immunol **156**(11): 4377-4383.
- Hassani, K., M. T. Shio, C. Martel, D. Faubert and M. Olivier (2014). "Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of Leishmania exosomes." PLoS One **9**(4): e95007.
- Himmelrich, H., P. Launois, I. Maillard, T. Biedermann, F. Tacchini-Cottier, R. M. Locksley, M. Rocken and J. A. Louis (2000). "In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease." J Immunol **164**(9): 4819-4825.
- Holm, A., K. Tejle, K. E. Magnusson, A. Descoteaux and B. Rasmusson (2001). "*Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation." Cell Microbiol **3**(7): 439-447.
- Huete-Perez, J. A., J. C. Engel, L. S. Brinen, J. C. Mottram and J. H. McKerrow (1999). "Protease trafficking in two primitive eukaryotes is mediated by a prodomain protein motif." J Biol Chem **274**(23): 16249-16256.
- Hummel, H. S., R. D. Gillespie and J. Swindle (2000). "Mutational analysis of 3' splice site selection during trans-splicing." J Biol Chem **275**(45): 35522-35531.
- Hurst, S. M., T. S. Wilkinson, R. M. McLoughlin, S. Jones, S. Horiuchi, N. Yamamoto, S. Rose-John, G. M. Fuller, N. Topley and S. A. Jones (2001). "IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation." Immunity **14**(6): 705-714.
- Ilg, T. (2000). "Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*." EMBO J **19**(9): 1953-1962.
- Iniesta, V., L. C. Gomez-Nieto, I. Molano, A. Mohedano, J. Carcelen, C. Miron, C. Alonso and I. Corraliza (2002). "Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites." Parasite Immunol **24**(3): 113-118.
- Ip, H. S., A. Orn, D. G. Russell and G. A. Cross (1990). "*Leishmania mexicana mexicana* gp63 is a site-specific neutral endopeptidase." Mol Biochem Parasitol **40**(2): 163-172.
- Isnard, A., M. T. Shio and M. Olivier (2012). "Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling." Front Cell Infect Microbiol **2**: 72.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2010). "Regulation of adaptive immunity by the innate immune system." Science **327**(5963): 291-295.
- Ji, J., J. Masterson, J. Sun and L. Soong (2005). "CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection." J Immunol **174**(11): 7147-7153.
- 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**(1): 33-40.

- Kalter, D. C. (1994). "Laboratory tests for the diagnosis and evaluation of leishmaniasis." Dermatol Clin **12**(1): 37-50.
- Kamir, D., S. Zierow, L. Leng, Y. Cho, Y. Diaz, J. Griffith, C. McDonald, M. Merk, R. A. Mitchell, J. Trent, Y. Chen, Y. K. Kwong, H. Xiong, J. Vermeire, M. Cappello, D. McMahon-Pratt, J. Walker, J. Bernhagen, E. Lolis and R. Bucala (2008). "A Leishmania ortholog of macrophage migration inhibitory factor modulates host macrophage responses." J Immunol **180**(12): 8250-8261.
- Katzman, S. D. and D. J. Fowell (2008). "Pathogen-imposed skewing of mouse chemokine and cytokine expression at the infected tissue site." J Clin Invest **118**(2): 801-811.
- Kawai, T. and S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." Nat Immunol **11**(5): 373-384.
- Kaye, P. and P. Scott (2011). "Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface." Nat Rev Microbiol **9**(8): 604-615.
- Kaye, P. M., N. J. Rogers, A. J. Curry and J. C. Scott (1994). "Deficient expression of co-stimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages." Eur J Immunol **24**(11): 2850-2854.
- Ke, G., J. Mauel and D. Rivier (1998). "Leishmania mexicana: extracellular proton concentration is a key regulator of cysteine proteinase CPb expression." Exp Parasitol **90**(1): 58-64.
- Kelly, B. L., T. N. Nelson and W. R. McMaster (2001). "Stage-specific expression in Leishmania conferred by 3' untranslated regions of L. major leishmanolysin genes (GP63)." Mol Biochem Parasitol **116**(1): 101-104.
- Kerrigan, A. M. and G. D. Brown (2009). "C-type lectins and phagocytosis." Immunobiology **214**(7): 562-575.
- Killick-Kendrick, R., A. J. Leaney, P. D. Ready and D. H. Molyneux (1977). "Leishmania in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of Leishmania mexicana amazonensis to hamsters by the bite of experimentally infected Lutzomyia longipalpis." Proc R Soc Lond B Biol Sci **196**(1122): 105-115.
- Kima, P. E., L. Soong, C. Chicharro, N. H. Ruddle and D. McMahon-Pratt (1996). "Leishmania-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4+ T cells." Eur J Immunol **26**(12): 3163-3169.
- Kolli, B. K., J. Kostal, O. Zaborina, A. M. Chakrabarty and K. P. Chang (2008). "Leishmania-released nucleoside diphosphate kinase prevents ATP-mediated cytolysis of macrophages." Mol Biochem Parasitol **158**(2): 163-175.
- Kroidl, A., I. Kroidl, G. Bretzel and T. Loscher (2014). "Non-healing old world cutaneous leishmaniasis caused by L. infantum in a patient from Spain." BMC Infect Dis **14**: 206.
- Kubba, R., Y. Al-Gindan, A. M. el-Hassan and A. H. Omer (1987). "Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis (oriental sore)." J Am Acad Dermatol **16**(6): 1183-1189.

- Kulkarni, M. M., W. R. McMaster, E. Kamysz, W. Kamysz, D. M. Engman and B. S. McGwire (2006). "The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing." Mol Microbiol **62**(5): 1484-1497.
- Kuru, T., N. Janusz, E. Gadisa, L. Gedamu and A. Aseffa (2011). "Leishmania aethiopica: development of specific and sensitive PCR diagnostic test." Exp Parasitol **128**(4): 391-395.
- Lefevre, L., G. Lugo-Villarino, E. Meunier, A. Valentin, D. Olganier, H. Authier, C. Duval, C. Dardenne, J. Bernad, J. L. Lemesre, J. Auwerx, O. Neyrolles, B. Pipy and A. Coste (2013). "The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to *Leishmania infantum*." Immunity **38**(5): 1038-1049.
- Lima, H. C., J. A. Bleyenbergh and R. G. Titus (1997). "A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals." Parasitol Today **13**(2): 80-82.
- Linehan, E. and D. C. Fitzgerald (2015). "Ageing and the immune system: focus on macrophages." Eur J Microbiol Immunol (Bp) **5**(1): 14-24.
- Liu, D., C. Kebaier, N. Pakpour, A. A. Capul, S. M. Beverley, P. Scott and J. E. Uzonna (2009). "Leishmania major phosphoglycans influence the host early immune response by modulating dendritic cell functions." Infect Immun **77**(8): 3272-3283.
- Locksley, R. M., S. L. Reiner, F. Hatam, D. R. Littman and N. Killeen (1993). "Helper T-Cells without Cd4 - Control of Leishmaniasis in Cd4-Deficient Mice." Science **261**(5127): 1448-1451.
- Lodge, R., T. O. Diallo and A. Descoteaux (2006). "Leishmania donovani lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane." Cell Microbiol **8**(12): 1922-1931.
- Lukes, J., T. Skalicky, J. Tyc, J. Votycka and V. Yurchenko (2014). "Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates." Mol Biochem Parasitol **195**(2): 115-122.
- Marth, T. and B. L. Kelsall (1997). "Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling." J Exp Med **185**(11): 1987-1995.
- Martin, S., R. Agarwal, G. Murugaiyan and B. Saha (2010). "CD40 expression levels modulate regulatory T cells in *Leishmania donovani* infection." J Immunol **185**(1): 551-559.
- Martinez-Salazar, B., M. Berzunza-Cruz and I. Becker (2008). "[*Leishmania mexicana* DNA activates murine macrophages and increases their TLR9 expression]." Gac Med Mex **144**(2): 99-104.
- Matheoud, D., N. Moradin, A. Bellemare-Pelletier, M. T. Shio, W. J. Hong, M. Olivier, E. Gagnon, M. Desjardins and A. Descoteaux (2013). "Leishmania evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8." Cell Host Microbe **14**(1): 15-25.
- Matthews, K. R., C. Tschudi and E. Ullu (1994). "A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes." Genes Dev **8**(4): 491-501.

- Matzinger, P. (2002). "An innate sense of danger." Ann N Y Acad Sci **961**: 341-342.
- Mbow, M. L., G. K. DeKrey and R. G. Titus (2001). "Leishmania major induces differential expression of costimulatory molecules on mouse epidermal cells." Eur J Immunol **31**(5): 1400-1409.
- McConville, M. J. and J. M. Blackwell (1991). "Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids." J Biol Chem **266**(23): 15170-15179.
- McCoy, J. J., J. K. Beetham, D. E. Ochs, J. E. Donelson and M. E. Wilson (1998). "Regulatory sequences and a novel gene in the msp (GP63) gene cluster of *Leishmania chagasi*." Mol Biochem Parasitol **95**(2): 251-265.
- McGwire, B. S., K. P. Chang and D. M. Engman (2003). "Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63." Infect Immun **71**(2): 1008-1010.
- McMahon-Pratt, D. and J. Alexander (2004). "Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease?" Immunol Rev **201**: 206-224.
- Medina-Acosta, E., R. E. Karess and D. G. Russell (1993). "Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated." Mol Biochem Parasitol **57**(1): 31-45.
- Medina-Acosta, E., R. E. Karess, H. Schwartz and D. G. Russell (1989). "The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage." Mol Biochem Parasitol **37**(2): 263-273.
- Meier, C. L., M. Svensson and P. M. Kaye (2003). "Leishmania-induced inhibition of macrophage antigen presentation analyzed at the single-cell level." J Immunol **171**(12): 6706-6713.
- Mendez, S., S. K. Reckling, C. A. Piccirillo, D. Sacks and Y. Belkaid (2004). "Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity." J Exp Med **200**(2): 201-210.
- Mia, S., A. Warnecke, X. M. Zhang, V. Malmstrom and R. A. Harris (2014). "An optimized Protocol for Human M2 Macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF-beta Yields a Dominant Immunosuppressive Phenotype." Scandinavian Journal of Immunology **79**(5): 305-314.
- Moore, K. J. and G. Matlashewski (1994). "Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis." J Immunol **152**(6): 2930-2937.
- Moradin, N. and A. Descoteaux (2012). "Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages." Front Cell Infect Microbiol **2**: 121.
- Mosser, D. M. and L. A. Rosenthal (1993). "Leishmania-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses." Semin Cell Biol **4**(5): 315-322.

- Mottram, J. C., G. H. Coombs and J. Alexander (2004). "Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania." Curr Opin Microbiol **7**(4): 375-381.
- Mottram, J. C., M. J. Frame, D. R. Brooks, L. Tetley, J. E. Hutchison, A. E. Souza and G. H. Coombs (1997). "The multiple cpb cysteine proteinase genes of Leishmania mexicana encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences." J Biol Chem **272**(22): 14285-14293.
- Mottram, J. C., C. D. Robertson, G. H. Coombs and J. D. Barry (1992). "A developmentally regulated cysteine proteinase gene of Leishmania mexicana." Mol Microbiol **6**(14): 1925-1932.
- Mottram, J. C., A. E. Souza, J. E. Hutchison, R. Carter, M. J. Frame and G. H. Coombs (1996). "Evidence from disruption of the lmcpcb gene array of Leishmania mexicana that cysteine proteinases are virulence factors." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 6008-6013.
- Muraille, E. and O. Leo (1998). "Revisiting the Th1/Th2 paradigm." Scand J Immunol **47**(1): 1-9.
- Murphy, M. L., U. Wille, E. N. Villegas, C. A. Hunter and J. P. Farrell (2001). "IL-10 mediates susceptibility to Leishmania donovani infection." Eur J Immunol **31**(10): 2848-2856.
- Murray, H. W., J. D. Berman, C. R. Davies and N. G. Saravia (2005). "Advances in leishmaniasis." Lancet **366**(9496): 1561-1577.
- Murray, H. W. and C. F. Nathan (1999). "Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral Leishmania donovani." J Exp Med **189**(4): 741-746.
- Murray, R. Z., J. G. Kay, D. G. Sangermani and J. L. Stow (2005). "A role for the phagosome in cytokine secretion." Science **310**(5753): 1492-1495.
- Naderer, T., J. E. Vince and M. J. McConville (2004). "Surface determinants of Leishmania parasites and their role in infectivity in the mammalian host." Curr Mol Med **4**(6): 649-665.
- Naito, M. (2008). "Macrophage differentiation and function in health and disease." Pathol Int **58**(3): 143-155.
- Ndjamen, B., B. H. Kang, K. Hatsuzawa and P. E. Kima (2010). "Leishmania parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments." Cell Microbiol **12**(10): 1480-1494.
- Neves, B. M., R. Silvestre, M. Resende, A. Ouaiissi, J. Cunha, J. Tavares, I. Loureiro, N. Santarem, A. M. Silva, M. C. Lopes, M. T. Cruz and A. Cordeiro da Silva (2010). "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and impairment of nuclear factor-kappaB: molecular mechanisms behind the arrested maturation/activation state of Leishmania infantum-infected dendritic cells." Am J Pathol **177**(6): 2898-2911.
- Nylen, S. and S. Gautam (2010). "Immunological perspectives of leishmaniasis." J Glob Infect Dis **2**(2): 135-146.

- Nylen, S., R. Maurya, L. Eidsmo, K. D. Manandhar, S. Sundar and D. Sacks (2007). "Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis." J Exp Med **204**(4): 805-817.
- O'Neill, L. A. and A. G. Bowie (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **7**(5): 353-364.
- Okwor, I. and J. E. Uzonna (2013). "The immunology of Leishmania/HIV co-infection." Immunol Res **56**(1): 163-171.
- Olivier, M., V. D. Atayde, A. Isnard, K. Hassani and M. T. Shio (2012). "Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63." Microbes Infect **14**(15): 1377-1389.
- Oppenheim, J. J., C. O. Zachariae, N. Mukaida and K. Matsushima (1991). "Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family." Annu Rev Immunol **9**: 617-648.
- Orth, J. D. and M. A. McNiven (2003). "Dynamin at the actin-membrane interface." Curr Opin Cell Biol **15**(1): 31-39.
- Overath, P. and T. Aebischer (1999). "Antigen presentation by macrophages harboring intravesicular pathogens." Parasitology Today **15**(8): 325-332.
- Owens, B. M., L. Beattie, J. W. Moore, N. Brown, J. L. Mann, J. E. Dalton, A. Maroof and P. M. Kaye (2012). "IL-10-producing Th1 cells and disease progression are regulated by distinct CD11c(+) cell populations during visceral leishmaniasis." PLoS Pathog **8**(7): e1002827.
- Padigel, U. M. and J. P. Farrell (2005). "Control of infection with Leishmania major in susceptible BALB/c mice lacking the common gamma-chain for FcR is associated with reduced production of IL-10 and TGF-beta by parasitized cells." J Immunol **174**(10): 6340-6345.
- Pagan, J. K., F. G. Wylie, S. Joseph, C. Widberg, N. J. Bryant, D. E. James and J. L. Stow (2003). "The t-SNARE syntaxin 4 is regulated during macrophage activation to function in membrane traffic and cytokine secretion." Curr Biol **13**(2): 156-160.
- Palm, N. W. and R. Medzhitov (2009). "Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity." Immunol Rev **227**(1): 221-233.
- Pellizzari, R., O. Rossetto, G. Schiavo and C. Montecucco (1999). "Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **354**(1381): 259-268.
- 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**(5891): 970-974.
- Prina, E., C. Jouanne, S. de Souza Lao, A. Szabo, J. G. Guillet and J. C. Antoine (1993). "Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with Leishmania amazonensis amastigotes." J Immunol **151**(4): 2050-2061.

- Pryor, P. R., B. M. Mullock, N. A. Bright, M. R. Lindsay, S. R. Gray, S. C. Richardson, A. Stewart, D. E. James, R. C. Piper and J. P. Luzio (2004). "Combinatorial SNARE complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events." EMBO Rep **5**(6): 590-595.
- 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**(12): 4311-4316.
- Ralton, J. E., K. A. Mullin and M. J. McConville (2002). "Intracellular trafficking of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins and free GPIs in *Leishmania mexicana*." Biochem J **363**(Pt 2): 365-375.
- Ramamoorthy, R., J. E. Donelson, K. E. Paetz, M. Maybodi, S. C. Roberts and M. E. Wilson (1992). "Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of *Leishmania donovani* chagasi promastigotes to an infectious form." J Biol Chem **267**(3): 1888-1895.
- Ramamoorthy, R., K. G. Swihart, J. J. McCoy, M. E. Wilson and J. E. Donelson (1995). "Intergenic regions between tandem gp63 genes influence the differential expression of gp63 RNAs in *Leishmania chagasi* promastigotes." J Biol Chem **270**(20): 12133-12139.
- Ready, P. D. (2014). "Epidemiology of visceral leishmaniasis." Clin Epidemiol **6**: 147-154.
- Real, F., P. T. Florentino, L. C. Reis, E. M. Ramos-Sanchez, P. S. Veras, H. Goto and R. A. Mortara (2014). "Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions." Cell Microbiol **16**(10): 1549-1564.
- Real, F. and R. A. Mortara (2012). "The diverse and dynamic nature of *Leishmania* parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging." PLoS Negl Trop Dis **6**(2): e1518.
- Real, F., R. A. Mortara and M. Rabinovitch (2010). "Fusion between *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major* Parasitophorous Vacuoles: Live Imaging of Coinfected Macrophages." Plos Neglected Tropical Diseases **4**(12).
- Real, F., M. Pouchelet and M. Rabinovitch (2008). "*Leishmania* (L.) *amazonensis*: fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone-marrow derived mouse macrophages." Exp Parasitol **119**(1): 15-23.
- Reiner, N. E., W. Ng and W. R. McMaster (1987). "Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products." J Immunol **138**(6): 1926-1932.
- Ritter, U., H. Moll, T. Laskay, E. Brocker, O. Velazco, I. Becker and R. Gillitzer (1996). "Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis." J Infect Dis **173**(3): 699-709.
- Robertson, C., G. Coombs, M. North and J. Mottram (1996). "Parasite cysteine proteinases." Perspectives in Drug Discovery and Design **6**(1): 99-118.

- Rostan, O., F. Robert-Gangneux, M. Lambert, M. Samson and J. P. Gangneux (2013). "Human hepatic stellate cells in primary culture are safe targets for *Leishmania donovani*." Parasitology **140**(4): 471-481.
- Rub, A., R. Dey, M. Jadhav, R. Kamat, S. Chakkaramakkil, S. Majumdar, R. Mukhopadhyaya and B. Saha (2009). "Cholesterol depletion associated with *Leishmania major* infection alters macrophage CD40 signalosome composition and effector function." Nat Immunol **10**(3): 273-280.
- Sacks, D. and A. Sher (2002). "Evasion of innate immunity by parasitic protozoa." Nat Immunol **3**(11): 1041-1047.
- Saravia, N. G., B. Escorcía, Y. Osorio, L. Valderrama, D. Brooks, L. Arteaga, G. Coombs, J. Mottram and B. L. Travi (2006). "Pathogenicity and protective immunogenicity of cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana* in non-murine models." Vaccine **24**(19): 4247-4259.
- Sarkar, A., E. Aga, U. Bussmeyer, A. Bhattacharyya, S. Moller, L. Hellberg, M. Behnen, W. Solbach and T. Laskay (2013). "Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis." Med Microbiol Immunol **202**(1): 25-35.
- Schlagenhauf, E., R. Etges and P. Metcalf (1998). "The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63)." Structure **6**(8): 1035-1046.
- Shiffman, D., C. M. Rowland, J. Z. Louie, M. M. Luke, L. A. Bare, J. I. Bolonick, B. A. Young, J. J. Catanese, C. F. Stiggins, C. R. Pullinger, E. J. Topol, M. J. Malloy, J. P. Kane, S. G. Ellis and J. J. Devlin (2006). "Gene variants of VAMP8 and HNRPUL1 are associated with early-onset myocardial infarction." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(7): 1613-1618.
- Silverman, J. M., J. Clos, C. C. De'Oliveira, O. Shirvani, Y. Fang, C. Wang, L. J. Foster and N. E. Reiner (2010a). "An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages." Journal of Cell Science **123**(6): 842-852.
- Silverman, J. M., J. Clos, E. Horakova, A. Y. Wang, M. Wiesgigl, I. Kelly, M. A. Lynn, W. R. McMaster, L. J. Foster, M. K. Levings and N. E. Reiner (2010b). "*Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells." J Immunol **185**(9): 5011-5022.
- Spath, G. F., S. Drini and N. Rachidi (2015). "A touch of Zen: post-translational regulation of the *Leishmania* stress response." Cell Microbiol **17**(5): 632-638.
- 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**(16): 9536-9541.
- Srivastav, S., S. Kar, A. G. Chande, R. Mukhopadhyaya and P. K. Das (2012). "*Leishmania donovani* exploits host deubiquitinating enzyme A20, a negative regulator of TLR signaling, to subvert host immune response." J Immunol **189**(2): 924-934.

- Srivastava, S., S. P. Pandey, M. K. Jha, H. S. Chandel and B. Saha (2013). "Leishmania expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses." Clin Exp Immunol **172**(3): 403-409.
- Stockdale, L. and R. Newton (2013). "A review of preventative methods against human leishmaniasis infection." PLoS Negl Trop Dis **7**(6): e2278.
- Stow, J. L., A. P. Manderson and R. Z. Murray (2006). "SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system." Nat Rev Immunol **6**(12): 919-929.
- Strazzulla, A., S. Cocuzza, M. R. Pinzone, M. C. Postorino, S. Cosentino, A. Serra, B. Cacopardo and G. Nunnari (2013). "Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease." Biomed Res Int **2013**: 805108.
- Summers, C., S. M. Rankin, A. M. Condliffe, N. Singh, A. M. Peters and E. R. Chilvers (2010). "Neutrophil kinetics in health and disease." Trends Immunol **31**(8): 318-324.
- Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." Cell **140**(6): 805-820.
- Tchernev, V. T., T. A. Mansfield, L. Giot, A. M. Kumar, K. Nandabalan, Y. Li, V. S. Mishra, J. C. Detter, J. M. Rothberg, M. R. Wallace, F. S. Southwick and S. F. Kingsmore (2002). "The Chediak-Higashi protein interacts with SNARE complex and signal transduction proteins." Mol Med **8**(1): 56-64.
- Teixeira, M. J., C. R. Teixeira, B. B. Andrade, M. Barral-Netto and A. Barral (2006). "Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis." Trends Parasitol **22**(1): 32-40.
- Thiakaki, M., B. Kolli, K. P. Chang and K. Soteriadou (2006). "Down-regulation of gp63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice." Microbes Infect **8**(6): 1455-1463.
- Tolson, D. L., S. J. Turco, R. P. Beecroft and T. W. Pearson (1989). "The immunochemical structure and surface arrangement of *Leishmania donovani* lipophosphoglycan determined using monoclonal antibodies." Mol Biochem Parasitol **35**(2): 109-118.
- Tovar, J., M. L. Cunningham, A. C. Smith, S. L. Croft and A. H. Fairlamb (1998). "Down-regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a trans-dominant mutant homologue: effect on parasite intracellular survival." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5311-5316.
- Turco, S. J. and D. L. Sacks (1991). "Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes." Mol Biochem Parasitol **45**(1): 91-99.
- Underhill, D. M. and H. S. Goodridge (2012). "Information processing during phagocytosis." Nat Rev Immunol **12**(7): 492-502.
- Underhill, D. M. and A. Ozinsky (2002). "Phagocytosis of microbes: complexity in action." Annu Rev Immunol **20**: 825-852.

- van Griensven, J., M. Balasegaram, F. Meheus, J. Alvar, L. Lynen and M. Boelaert (2010). "Combination therapy for visceral leishmaniasis." Lancet Infect Dis **10**(3): 184-194.
- van Zandbergen, G., A. Bollinger, A. Wenzel, S. Kamhawi, R. Voll, M. Klinger, A. Muller, C. Holscher, M. Herrmann, D. Sacks, W. Solbach and T. Laskay (2006). "Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(37): 13837-13842.
- 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**(11): 6521-6525.
- Vieira, O. V., R. J. Botelho, L. Rameh, S. M. Brachmann, T. Matsuo, H. W. Davidson, A. Schreiber, J. M. Backer, L. C. Cantley and S. Grinstein (2001). "Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation." J Cell Biol **155**(1): 19-25.
- Vieira, O. V., C. Bucci, R. E. Harrison, W. S. Trimble, L. Lanzetti, J. Gruenberg, A. D. Schreiber, P. D. Stahl and S. Grinstein (2003). "Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase." Mol Cell Biol **23**(7): 2501-2514.
- 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**(10): e1000628.
- Voth, B. R., B. L. Kelly, P. B. Joshi, A. C. Ivens and W. R. McMaster (1998). "Differentially expressed Leishmania major gp63 genes encode cell surface leishmanolysin with distinct signals for glycosylphosphatidylinositol attachment." Mol Biochem Parasitol **93**(1): 31-41.
- Wanderley, J. L., P. E. Thorpe, M. A. Barcinski and L. Soong (2013). "Phosphatidylserine exposure on the surface of Leishmania amazonensis amastigotes modulates in vivo infection and dendritic cell function." Parasite Immunol **35**(3-4): 109-119.
- Wang, Z. E., S. L. Reiner, S. Zheng, D. K. Dalton and R. M. Locksley (1994). "CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with Leishmania major." J Exp Med **179**(4): 1367-1371.
- Wesolowski, J. and F. Paumet (2010). "SNARE motif: a common motif used by pathogens to manipulate membrane fusion." Virulence **1**(4): 319-324.
- Williams, R. A., L. Tetley, J. C. Mottram and G. H. Coombs (2006). "Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in Leishmania mexicana." Mol Microbiol **61**(3): 655-674.
- Wilson, J., C. Huynh, K. A. Kennedy, D. M. Ward, J. Kaplan, A. Aderem and N. W. Andrews (2008). "Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of Leishmania amazonensis." PLoS Pathog **4**(10): e1000179.

- Wilson, M. E., K. E. Paetz, R. Ramamoorthy and J. E. Donelson (1993). "The effect of ongoing protein synthesis on the steady state levels of Gp63 RNAs in *Leishmania chagasi*." J Biol Chem **268**(21): 15731-15736.
- Wynn, T. A., A. Chawla and J. W. Pollard (2013). "Macrophage biology in development, homeostasis and disease." Nature **496**(7446): 445-455.
- Xin, L., K. Li and L. Soong (2008). "Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes." Mol Immunol **45**(12): 3371-3382.
- Yang, Z., D. M. Mosser and X. Zhang (2007). "Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* infection of macrophages." J Immunol **178**(2): 1077-1085.
- Yao, C., J. E. Donelson and M. E. Wilson (2003). "The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function." Mol Biochem Parasitol **132**(1): 1-16.
- Yasinzai, M., M. Khan, A. Nadhman and G. Shahnaz (2013). "Drug resistance in leishmaniasis: current drug-delivery systems and future perspectives." Future Med Chem **5**(15): 1877-1888.