



HAL
open science

Dérivés furanosidiques à visée thérapeutique dans la leishmaniose : caractérisation des effets et mode d'action

Sorya Belaz

► **To cite this version:**

Sorya Belaz. Dérivés furanosidiques à visée thérapeutique dans la leishmaniose : caractérisation des effets et mode d'action. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2017. Français. NNT : 2017REN1B044 . tel-02418898

HAL Id: tel-02418898

<https://theses.hal.science/tel-02418898>

Submitted on 19 Dec 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : Biologie et sciences de la Santé
Ecole doctorale Biologie-Santé

présentée par

Sorya Belaz

Préparée au sein de l'équipe 2 de l'IRSET, UMR INSERM 1085
Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail
« Agents infectieux hépatotropes et cofacteurs environnementaux »
Faculté de médecine

**Dérivés
furanosidiques à
visée thérapeutique
dans la
leishmaniose :
Caractérisation des
effets et mode
d'action**

Thèse soutenue à Rennes

le 13 décembre 2017

devant le jury composé de :

Laurence LACHAUD

PU-PH - Université de Montpellier/ *rapporteur*

Sandrine COJEAN

MCU-PH – Université Paris Sud/ *rapporteur*

Pierre MARTY

PU-PH - Université de Nice Sophia-Antipolis / *examinateur*

Richard DANIELLOU

PU - Université d'Orléans, ICOA / *examinateur*

Florence ROBERT-GANGNEUX

PU-PH – Université de Rennes 1 / *directrice de thèse*

Jean-Pierre GANGNEUX

PU-PH – Université de Rennes 1 / *co-directeur de thèse*

Ecrire cette thèse aura été une aventure, commençant par une petite angoisse de la page blanche et finissant en nuits d'écriture interminables pour compenser le retard à l'allumage ! Cependant, « *on peut trouver le bonheur même dans les moments les plus sombres, il suffit de se souvenir d'allumer la lumière* » et je souhaite ici remercier les « lumières » qui m'ont accompagnées ou guidées pendant ce travail.

Au Professeur Jean-Pierre Gangneux,

J'exprime ici toute ma reconnaissance envers mon co-directeur de thèse et chef de notre service, pour son travail de supervision. Et pour avoir passé le relais à Florence lorsque le temps est venu à te manquer pour m'encadrer.

A Florence Robert-Gangneux,

Merci de m'avoir encadrée tout au long de ce travail, en gardant toujours un regard optimiste sur les résultats quels qu'ils soient !

Merci aussi, et surtout, de m'avoir consacré du temps au sein de toutes tes autres missions, en particulier au moment des relectures en dernières minutes, ta faculté à être multitâche est un exemple que j'aimerais pouvoir suivre !

Au Professeur Laurence Lachaud et au Docteur Sandrine Cojean

Merci de l'intérêt que vous avez porté à ce travail en acceptant d'en être rapporteur.

Merci de vos conseils ayant permis d'aboutir à cette version finale.

Trouvez ici le témoignage de ma respectueuse considération.

Aux Professeurs Pierre Marty et Richard Daniellou

Merci de me faire l'honneur de participer à ce jury.

Trouvez ici le témoignage de mon profond respect.

Au Professeur Sophie Tomasi

Merci d'avoir été ma tutrice au cours de ce travail de thèse.

Soyez assurée de ma reconnaissance.

Aux membres de l'équipe 2 de l'IRSET

En particulier ses nombreux étudiants présents et passés avec lesquels j'ai eu la chance de travailler au bâtiment 5 ou au bâtiment 8, Fidaa, Elise, Aveline, Benjamin, François et ceux que j'oublie sûrement.

Aux techniciens des plateformes Biosit et Biogenouest

Merci à tous pour votre assistance et vos bons conseils, en particulier Laurent et Gersende pour la cytométrie.

Je souhaite également remercier toutes les « étoiles musicales » qui m'entourent. Vous êtes pour moi une lumière à l'horizon pour ne pas perdre de vue mon objectif et une petite musique dans la tête pour me changer les idées.

Les musiques qui m'ont accompagnée pendant ce travail, *Sinnerman* de Nina Simone, *Hurt* de Christina Aguilera, *La Seine* de Vanessa Paradis et *M ou Roulette* de System of a Down et vous :

À la team parasito,

A Aurélien, Aurore, Brice, Chantal, Hélène, Kevin, Magali, Sarah et Suleman. Merci d'avoir partagé le labo « d'en haut », les pauses café, les discussions pour refaire le monde de la recherche et faire de nous des leishmaniacs de renom et mon humeur difficile à certains moments.

Un merci particulier pour Sarah pour la formation et la relecture de la CMF.

Je vous dédie, *Despacito-C'est l'apéro*, évidemment pas avec les paroles officielles...

À la team hôpital,

A Anne, Brigitte, Sylviane et les techniciens, aides de labo et secrétaires du laboratoire de parasitologie « d'en bas », Anne M. et les infirmières de la consult aux voyageurs. Merci d'avoir partagé les moments de routine à mes côtés et de m'avoir soutenue pendant toutes ces années de travail partagées entre l'hôpital et la fac. Je vous dédie *Mad world* de Jasmine Thompson.

À mes amies Rennaises,

A Astrid, Clo, Julie, Pauline, Eva, Clarisse et Ségo.

Merci de me soutenir et de croire en moi. Merci de me faire voyager en Laponie en concert ou dans les bars et resto Rennais.

Merci Astrid, mon alter-égo brico, pour les journées « compét de pages », pour les relectures et pour les encouragements dans les moments les plus sombres.

Merci Pauline pour ton soutien et vivement qu'on reprenne les mercredis piscine au clair de lune!

Je vous dédie *Ta fête* de Stromae, *Don't stop the music* de Rihanna et *Regarde-moi* de Céline Dion.

À mes amis joueurs,

A Jérôme, Johanna, Mathieu et Rachel. Merci de me changer les idées autour d'un tapis de carte ou d'un plateau de jeu bizarre pour geeks... Et merci à Jérôme et Johanna de m'avoir accordé assez de confiance et avoir fait de moi la marraine d'un petit lion féroce ! Je vous dédie *Il en faut peu pour être heureux*.

À mes amies pictaviennes,

Elo et Mag, merci d'avoir toujours cru en moi que j'arriverais là alors même que moi je n'y ai jamais cru ! Je vous dédie *Allumer le Feu* de Johnny Hallyday et *Petite Marie* de Francis Cabrel.

À Lucie,

Même si on ne se voit pas souvent, tu es toujours là et rien ne changera jamais entre nous. Merci ma belette des mers du sud. Je te dédie *A kind of magic* de Queen et *Hedwig's Theme*.

À Christelle,

Merci de m'avoir aidée au cours de ce travail et aussi dans les à-côtés, tu es un peu ma maman dans ce laboratoire ! Et maintenant je vais devenir grande alors je te dédie *Je vole*, la version de Louane.

À Charlotte,

Merci de partager les aventures de l'assistantat, le bureau, les week-ends, les courses sous le soleil ou la pluie ou dans la boue ou la neige. Je te dédie *Night-fall* de Kavinski.

À Cendrine,

Merci ma sœur, d'être toujours à mes côtés, pour les thèses, le triathlon et surtout merci à Jonathan et toi de m'avoir fait devenir tatatato ! J'en suis hyper fière. Je te dédie *You are my sister* d'Antony and the Johnsons.

Table des matières

Table des matières.....	1
Liste des figures	3
Liste des tableaux.....	5
Liste des annexes	6
Liste des abréviations	7
Introduction	9
Partie 1 : Les leishmanioses et les leishmanies	11
1.1. Les leishmanioses.....	11
1.1.1 Agents pathogènes	11
1.1.2 Epidémiologie	13
1.1.3 Cycle parasitaire.....	15
1.1.4 Clinique	16
1.1.5 Diagnostic.....	19
1.1.6 Traitement	22
1.1.7 Mécanisme d'interaction hôte-parasite et réponse immunitaire anti-leishmanie.....	31
1.2. La paroi, facteur de virulence des leishmanies.....	44
1.2.1 Les glycoconjugués de la paroi	44
1.2.2 Reconnaissance du LPG et des GIPLs, quel est le motif reconnu ? Exemple de TLR2/TLR4.....	50
1.2.3 Un motif saccharidique d'intérêt : le galactofuranose.....	51
Article 1 : <i>Leishmania</i> cell wall as a potent target for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates.....	53
1.3. Objectifs de ce travail.....	67
Partie 2 : Pertinence de la voie de synthèse des furanoses comme cible thérapeutique	69
2.1. Etude de l'expression des enzymes impliquées dans l'intégration du Galf à la paroi.....	70
2.1.1 Matériels et méthodes.....	70
2.1.2 Résumé des résultats et discussion	73
Article 2: Identification, biochemical characterization, and <i>in-vivo</i> expression of the intracellular invertase BfrA from the pathogenic parasite <i>Leishmania major</i>	77
2.2. Evaluation <i>in vitro</i> de l'effet antiparasitaire d'analogues furanosidiques.....	87
2.2.1 Description chimique des analogues	87
2.2.2 Activité anti-promastigotes des dérivés du Galf-oct	88

Article 3 : Alkyl galactofuranosides strongly interact with <i>Leishmania donovani</i> membrane and provide antileishmanial activity	97
2.2.3 Effet des dérivés du Galf sur les amastigotes	111
2.2.4 Localisation intracellulaire du Galf grâce à des dérivés furanosidiques fluorescents	117
Article 4: Synthesis and biological properties of galactofuranosyl-containing fluorescent dyes	119
Partie 3 : Les sucres de synthèse comme immunomodulateurs	125
3.1. Les macrophages	125
3.1.1 Description et fonctions des macrophages	125
3.1.2 La polarisation des macrophages	127
3.1.3 Macrophages et leishmanies	129
3.2. Matériel et méthodes	129
3.2.1 Les modèles de macrophages utilisés.....	129
3.2.2 Analyse transcriptomique globale	131
3.2.3 Expression des ARNm par qPCR.....	134
3.2.4 Expression des marqueurs de surface	135
3.3. Résultats.....	137
3.3.1 Analyse transcriptomique globale	137
3.3.2 Expression relative de gènes impliqués dans la réponse immune et marqueurs de surfaces exprimés par les macrophages M0	142
3.3.3 Expression relative de gènes impliqués dans la réponse immune par les macrophages polarisés M1 et M2a	148
3.4. Discussion.....	150
Discussion générale	153
Conclusion.....	159
Annexes.....	161
Bibliographie	165

Liste des figures

Figure 1 : Répartition mondiale des cas de leishmaniose viscérale en 2013 selon l’OMS (14)	13
Figure 2 : Répartition mondiale des cas de leishmaniose cutanée en 2013 selon l’OMS (18)	14
Figure 3 : Cycle parasitaire de la leishmaniose	15
Figure 4 : Exemples d'atteintes cutanées sèche à <i>L. major</i> à gauche et ulcérée humide à <i>L. guyanensis</i> à droite (Images S. Belaz)	18
Figure 5 : Frottis de grattage cutané coloré au MGG et observé au grossissement x100. Présence d’amastigotes intracellulaires et « libres » (flèche), nombreux kinétoplastes visibles (ronds) (Image S. Belaz)	21
Figure 6 : Promastigotes de <i>Leishmania donovani</i> observés au microscope à contraste de phase, grossissement x20 (Image S. Belaz)	21
Figure 7 : Formulation chimique du sodium stibogluconate à gauche et du méglumine antimoniate à droite	22
Figure 8 : Mécanisme d’entrée, d’activation et de résistance des dérivés de l’antimoine chez <i>leishmania sp.</i> , Croft <i>et al</i> (46)	23
Figure 9 : Formule chimique de l'amphotéricine B	24
Figure 10 : Formulation de la forme liposomale de l’amphotéricine B/Ambisome [®] , Gutiérrez <i>et al</i> (54)	25
Figure 11 : Formulation chimique de la Miltéfosine ou hexadécylphosphocholine	25
Figure 12 : Structures chimiques des diamines aromatiques (66)	26
Figure 13 : Structure chimique de la paromomycine (67)	27
Figure 14 : Etapes initiales de la réponse immune	33
Figure 15 : Interaction promastigote-macrophage (A) et amastigote-macrophage (B)	37
Figure 16 : Réponse immune anti-leishmanie	39
Figure 17: Mécanisme d'échappement mis en œuvre par les promastigotes	42
Figure 18 : Balance entre la réponse immune et les mécanismes d'échappement des leishmanies	43
Figure 19 : Structure du LPG	45
Figure 20 : Exemples de structures de GIPLs, adapté de Winter 1993 et de MC Conville 1993	48
Figure 21 : Représentation schématique de la paroi des leishmanies aux 3 stades du cycle	50
Figure 22 : Biosynthèse du Galactofuranose. D’après Oppenheimer, Damerow et Beverley	52

Figure 23 : Expression relative des galactofuranosyltransférases et de la mutase BfrA chez les promastigotes A et chez les amastigotes B de <i>L. braziliensis</i> , <i>L. donovani</i> et <i>L. major</i>	74
Figure 24 : β -D-galactofuranose (Galf) naturel et ses 4 analogues furanosidiques	88
Figure 25: Principe du test MTT	89
Figure 26: Principe de la RMN-STD, adapté de Guégan et Daniellou 2012 (238)	91
Figure 27 : Acide 5-doxyistéarique selon Sgherri C. <i>et al.</i> (239)	93
Figure 28 : Pourcentage de cellules infectées par <i>L. donovani</i> après traitement par Galf-oct à 10, 20, 40 et 80 μ M	111
Figure 29 : Image par microscopie électronique à transmission de l'effet du Galf-oct (B, C, D) et de NH ₂ -Galf (E) comparé à un témoin intecté non traité (A)	113
Figure 30 : Induction d'iNOS par des macrophages infectés puis traités par Galf-oct et NH ₂ -Galf	115
Figure 31 : NO produits par des macrophages infectés puis traités par Galf-oct et NH ₂ -Galf	116
Figure 32 : Spectre d'activation macrophagique et des caractéristiques des macrophages polarisés	128
Figure 33 : Représentation schématique de la production de macrophages non polarisés M0 (A) et de macrophages non polarisés infectés (B)	129
Figure 34 : Représentation schématique de la production de macrophages polarisés M1 et M2a (A) et de macrophages polarisés puis traités (B)	130
Figure 35 : Représentation schématique de la production de macrophages polarisés M1 et M2a infectés par <i>L. donovani</i> (A) et de macrophages polarisés infectés puis traités (B) ...	130
Figure 36 : Représentation schématique de l'analyse transcriptomique globale à l'aide de la technologie Agilent®	132
Figure 37 : Etapes de préparation des ARNc marqués en vue de l'hybridation	133
Figure 38 : Analyse transcriptomique des gènes des échantillons contrôles non infectés comparés aux échantillons non infectés traités par le Galf-oct ou le NH ₂ -Galf	138
Figure 39 : Diagramme de Venn et réseau de gènes surexprimés avec les 2 traitements par les dérivés du Galf	139
Figure 40 : Analyse transcriptomique des gènes des échantillons contrôles infectés comparés aux échantillons infectés traités par le Galf-oct ou le NH ₂ -Galf	141
Figure 41 : Expression par des macrophages M0 infectés ou non puis traités par Galf-oct et NH ₂ -Galf des ARNm de gènes de cytokines Th1, de cytokines Th2, de récepteurs macrophagiques, de facteurs de transcription et d'effecteurs macrophagiques	143
Figure 42: Marqueurs de surface des macrophages M0 infectés ou non infectés puis traités par Galf-oct et NH ₂ -Galf	146
Figure 43 : Expression des ARNm de gènes de cytokines Th1, Th2, de récepteurs macrophagiques et d'effecteurs macrophagiques par des macrophages polarisés M1 ou M2a puis infectés ou non puis traités par Galf-oct et NH ₂ -Galf	149

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification, distribution et types d'atteintes des espèces de Leishmanies pouvant toucher l'homme (8–10).....	12
Tableau 2 : Critère de classification des LC simples et des LC complexes. D'après Aronson <i>et al</i> (172)	28
Tableau 3 : Exemple de structures du LPG pour différentes espèces de leishmanies de l'ancien monde et du nouveau monde adapté de De Assis 2012 et de Mc Conville 1995 ...	45
Tableau 4 : Caractéristiques de trois mutants déficients pour le LPG.....	75
Tableau 5: Evaluation des IC50 des dérivés du Galf et du contrôle	89
Tableau 6 : Evaluation de la cytotoxicité et de l'index de sélectivité sur des macrophages de la lignée THP-1 et des macrophages humains (HM) issus de PBMC	90
Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés pour le marquage en cytométrie en flux	136
Tableau 8: Tableau récapitulatif des marqueurs exprimés à la surface des macrophages M0 infectés et non infectés traités Galf-oct et NH2-Galf, quantifiés par cytométrie en flux ...	144
Tableau 9: Tableau récapitulatif des variations d'expressions des gènes de récepteurs, cytokine et chimiokines, facteurs de transcription et effecteurs macrophagiques dans les 6 populations de macrophages M0, M1 et M2 non infectés ou infectés.	147

Liste des annexes

Annexe 1 : Liste des amorces utilisées pour amplifier les 5 enzymes impliquées dans l'intégration du Galf au LPG et l'actine comme gène de référence 161

Annexe 2: Configuration du FACS Aria II et exemples de fluorochromes détectables dans cette configuration 162

Annexe 3 : Représentation schématique des 3 systèmes de détection du FACSAria II Becton Dickinson (Schéma disponible dans le guide de l'utilisateur du FACSAria)..... 162

Annexe 4 : Configuration du FC 500 et exemples de fluorochromes détectables dans cette configuration..... 163

Liste des abréviations

μM : micromoles par litre

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

AM : ancien monde

AMM : autorisation de mise sur le marché

AQP1 : aquaglycéroporine

ARN : acide ribo nucléique

ARNc : ARN complémentaire

ARNm ARN messenger

ATP : Adénosine TriPhosphate

ATU : autorisation temporaire d'utilisation

CCL2 = MCP-1 : C-C motif chemokine ligand 2

CD : cluster of differentiation

CMF : Cytométrie en Flux

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CNR : Centre National de Référence

CRP : protéine C réactive

CTL : domaine lectine de type C

Cy-3 : Cyanine 3

DC : cellules dendritiques

DC-SIGN : Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin

dCTP : désoxycytidine triphosphate

DHE : dihydroethidium

DHR : dihydrorhodamine

EFS : Etablissement Français du Sang

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

ENSCR : Ecole Supérieure de Chimie de Rennes

Fc : fragment constant

FC : Fold Change

FDA : Food and Drugs Administration

Galf : galactofuranose

Galf-oct : β-D-galactofuranose-octyle

GalfT : galactofuranosyl-transférases

GH : Glycosides Hydrolases

GIPLs : phospholipides du glycoinositol

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

GO : gene ontology

GP : glycoprotéine

HAI : HemAgglutination Indirecte

ICOA : Institut de Chimie Organique et Analytique

IDSA : Infectious Diseases Society of America

IFI : ImmunoFluorescence Indirecte

IFN-γ : Interféron-gamma

IL : Interleukine

iNOS : NO-synthase inductible

IRAK : IL-1 Receptor Associated Kinase

KEGG : Kyoto encyclopaedia for genes and genomes

KMP-11 : kinetoplastid-membrane protein 11

KO : Knock Out

L. : *Leishmania*

LC : leishmaniose cutanée

LCD : leishmaniose cutanée diffuse

LCM : leishmaniose cutanéomuqueuse

LD : LIVE/DEAD™

LDPKA : leishmaniose dermique post Kala-Azar

LPG : lipophosphoglycane

LPS : lipopolysaccharide

LRV : Leishmania RNA virus

LV : leishmaniose viscérale

MAPK : Mitogen-Activated protein kinases

MBP : mannan-binding protein

MCP-1 = CCL2 : Monocyte Chemoattractant Protein-1

M-CSF : Macrophage Colony Stimulating Factor

MFI : moyenne d'intensité de fluorescence

MGG : May Grünwald Giemsa

MIP-1 β = **CCL4** : macrophage inflammatory protein-1 β

MRC-1 : Récepteur au mannose

MSP : Major Surface Protein

MTT : Bromure de 3-(4,5-diméthylthazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium

MyD88 : Myeloid differentiation factor 88

N3-Galf : 6-azido- β -D-galactofuranose-octyl

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogène

NET : Neutrophil Extracellular Traps

NF : nuclear factor

NH₂ : groupement amine

NH2-Galf : 6-amino- β -D-galactofuranose-octyl

NHAc : groupement acétamide

NHAc-Galf : 6-N-acetamido- β -D-galactofuranose-octyl

NK : natural killer

NM : nouveau monde

NNN : Novy - Mc. Neal - Nicolle

NO : monoxyde d'azote

NO[•] : monoxyde d'azote

O₂^{•-} : ions superoxydes

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAMPs : pathogen associated molecular patterns

PBMC : peripheral blood mononuclear cell

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PI : iodure de propidium

PMA : phorbol myristate acetate

PNN : polynucléaires neutrophiles

PPAR- γ : peroxydome proliferator activated receptor- γ

PPG : protéophosphoglycane

PRR : pattern-recognition receptors

PSG : promastigote secretory gel

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphisme

RNS : espèces réactives de l'azote (Reactive Nitrite Species)

ROS : espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species)

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

SbIII : dérivés trivalents de l'antimoine

SbV : dérivés pentavalents de l'antimoine

SOD : super oxyde dismutase

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TCR : récepteurs des lymphocytes T

TGF : transforming growth factor

TLR : toll like receptors

TNF : tumor necrosis factor

UDP : Uridine-DiPhosphate

UGM : UDP-galactopyranosemutase

USD : UDP-sugar-pyrophosphorylase

UTP : Uridine-TriPhosphate

VIH : Virus de L'Immunodéficience Humaine

WB : Western Blot

Introduction

Les leishmanies présentent à leur surface un réseau de glycanes impliqués dans l'infectivité et la survie intracellulaire des parasites et dont le constituant majeur est le lipophosphoglycane (LPG). Le LPG contient des motifs galactofuranoses, non retrouvés dans les membranes des cellules de mammifères, ce qui en font une cible innovante à visée antiparasitaire. Ce travail de thèse présente donc les leishmanioses et les caractéristiques de la paroi des leishmanies. Puis la partie expérimentale montre d'une part la pertinence de cibler la voie de synthèse des glycanes membranes à visée antiparasitaire et l'impact immunomodulateur de ce traitement.

Partie 1 : Les leishmanioses et les leishmanies

1.1. Les leishmanioses

Les leishmanioses sont un groupe de maladies tropicales considérées comme négligées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Ces parasitoses sont causées par un protozoaire du genre *Leishmania* transmis par un arthropode hématophage, le phlébotome.

La maladie peut se présenter sous trois formes cliniques, la leishmaniose viscérale dont l'évolution est souvent fatale en l'absence de traitement, la leishmaniose cutanée et la leishmaniose cutanéomuqueuse.

Ces parasitoses sont endémiques dans de nombreux pays à revenus limités dans lesquels les problématiques de logement, d'hygiène, d'accès aux soins et de faibles revenus rendent difficiles leur prise en charge tant préventive, diagnostique que thérapeutique.

1.1.1 Agents pathogènes

Les leishmanies sont des parasites protozoaires flagellés appartenant à l'ordre des kinétoplastidés, à la famille des *Trypanosomatidae* et au genre *Leishmania* (1). Ce genre est divisé en plusieurs sous-genres, dont 2 principaux *Leishmania* et *Viannia* responsables des atteintes humaines.

Les atteintes cutanées sont décrites depuis le VII^{ème} siècle avant notre ère (2), cependant la mise en évidence du parasite dans ces lésions n'a été obtenue qu'en 1885 par le Colonel D. D. Cunningham (3) qui présente initialement le parasite comme une spore appartenant probablement au règne fongique.

Le parasite fut pour la première fois mis en évidence en 1892 par Peter Borovsky puis en 1900, Sir William Boog Leishman retrouve « des corps de Leishman » dans un prélèvement de rate provenant d'un soldat mort de la « fièvre noire » en Inde (4). Trois ans plus tard Charles Donovan effectue les mêmes constatations sur un autre prélèvement de rate (5) et c'est en leur honneur que Sir Ronald Ross nomma *Leishmania (L.) donovani* l'espèce responsable du terrible Kala Azar (voulant dire « fièvre noire » en Hindi) dans le bassin indien (6). Par la suite la présence de leishmanies a pu être détectée dans d'autres régions, chez d'autres mammifères comme le chien et dans d'autres types d'atteinte en particulier les lésions cutanées ou muqueuses au Brésil (7).

Tableau 1 : Classification, distribution et types d'atteintes des espèces de Leishmanies pouvant toucher l'homme (8–10)

Sous Genre	Complexe	Espèces	Atteintes cliniques	Distribution
<i>Leishmania</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. (L.) donovani</i>	LV, LDPKA	AM : BI, Chine, MO, Afrique Centrale et de l'Est (Soudan)
		<i>L. (L.) archibaldi</i>	LV	
		<i>L. (L.) infantum</i>	LV, LC	AM : Maghreb, Bassin méditerranéen, MO, Asie Centrale
		<i>L. (L.) chagasi</i>	LV, LC	NM : Nord et centre du CSA (Brésil, Venezuela, Bolivie, Mexique)
	Hors complexe	<i>L. (L.) major</i>	LC	AM : Maghreb, Afrique Centrale, MO, Asie Centrale
		<i>L. (L.) tropica</i>	LV, LC	AM : Maghreb, Afrique Centrale, MO, Asie Centrale, BI
		<i>L. (L.) aethiopica</i>	LCD, LC	AM : Afrique de l'Est (Ethiopie, Kenya)
	<i>L. mexicana</i>	<i>L. (L.) mexicana</i>	LCD, LC	NM : USA, Pérou, Equateur, Venezuela
		<i>L. (L.) amazonensis</i>	LCM [¥] , LCD, LC	NM : CSA (Bolivie, Brésil, Venezuela)
		<i>L. (L.) venezuelensis</i>	LC	NM : Venezuela
<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LCM [¥] , LC	NM : Bassin amazonien, CSA (Brésil, Pérou, Bolivie, Guatemala, Venezuela)
		<i>L. (V.) guyanensis</i>	LCM [¥] , LC	NM : Nord du CSA (Guyane française, Guyana, Surinam, Brésil, Bolivie)
		<i>L. (V.) panamensis</i>	LCM [¥] , LC	NM : Centre et Sud du CSA (Brésil, Panama, Venezuela, Colombie)
		<i>L. (V.) peruviana</i>	LC, LCM [¥]	NM : Pérou, Bolivie
		<i>L. (V.) naiffi</i>	LC	NM : Brésil, Guyane Française
		<i>L. (V.) lainsoni</i>	LC	NM : Brésil, Bolivie, Pérou
		<i>L. (V.) lindenbergi</i>	LC	NM : Brésil
		<i>L. (V.) shawi</i>	LC	NM : Brésil
<i>Mundiania</i> (9)	<i>L. enrietti</i>	<i>L. (M.) martiniquensis</i>	LC, LV	NM : Martinique AM : Thaïlande
		« <i>L. (M.) siamensis</i> »	LC, LV	NM : USA AM : Thaïlande, Europe Centrale
<i>Endotrypanum</i> (9)	<i>L. Hertigi</i>	<i>L. (E.) colombiensis</i>	LC, LV	NM : Colombie

¥ : Les cas de LCM sont surtout dus à *L. (V.) braziliensis* et *L. (V.) panamensis* et rare pour les autres espèces (6)

L. : *Leishmania* ; V. : *Viannia* ; M. : *Mundiania* ; E. : *Endotrypanum*

LV : Leishmaniose viscérale ; LDPKA : Leishmaniose Dermique post Kala-Azar ; LC : Leishmaniose Cutanée ; LCD : Leishmaniose cutanée diffuse ; LCM : Leishmaniose Cutané-Muqueuse

AM : Ancien monde, NM : Nouveau monde ; BI : Bassin Indien, MO : Moyen Orient ; CSA : Continent Sud-Américain ; USA : Etats-Unis D'Amérique

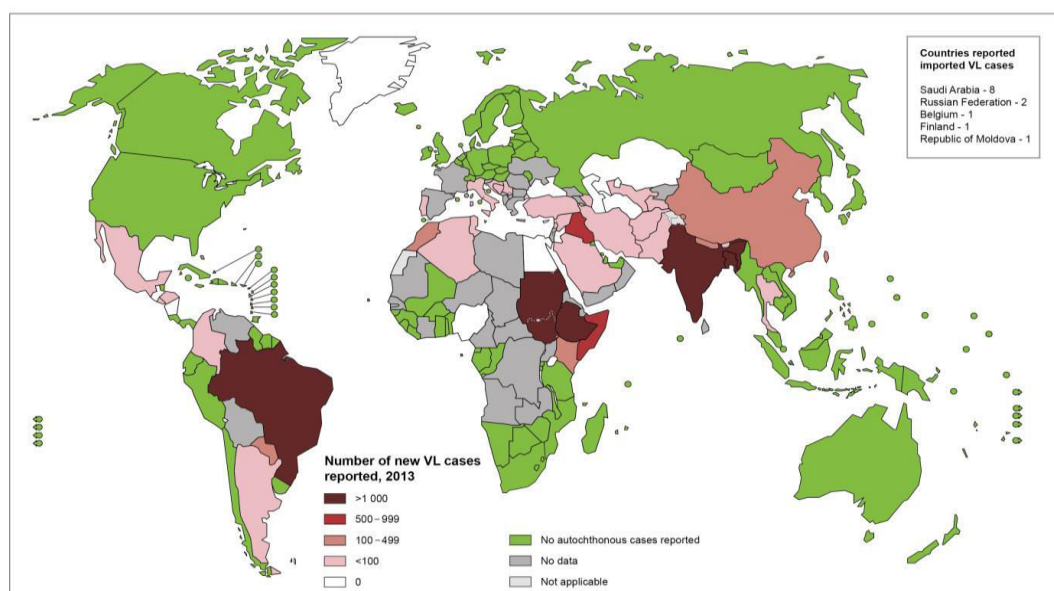
Il existe plus de 20 espèces de leishmanies pouvant infecter l'homme (Tableau 1), en particulier le complexe *L. donovani* et le complexe *L. mexicana* ainsi que des espèces en dehors de ces complexes : *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, et enfin le sous-genre *Viannia* constitué de quatre espèces principales *L. (V.) braziliensis*, *guyanensis*, *panamensis* et *peruviana* (11).

Le parasite existe sous 2 formes au cours du cycle, une forme flagellée mobile retrouvée libre dans l'intestin du vecteur, c'est la forme promastigote et une forme intracellulaire stricte parasitant les cellules du système des phagocytes mononucléés, c'est la forme amastigote qui n'est pas mobile et présente un résidu de flagelle internalisé.

Ce parasite possède un kinétoplaste parmi ses organites, raison pour laquelle il appartient à la famille des kinétoplastidés. Chez le promastigote le kinétoplaste est situé au pôle antérieur du parasite entre le noyau et le flagelle qui est la structure la plus antérieure du parasite, en effet le déplacement se fait par traction du flagelle qui a une motilité hélicoïdale. L'amastigote de forme ovale conserve le kinétoplaste même en l'absence du flagelle.

1.1.2 Epidémiologie

En 2010, 98 pays sont déclarés touchés par les différentes formes de leishmanies (6). Plus précisément sur les données de l'année 2014, l'OMS révèle que 90% des cas de leishmaniose viscérale se concentrent dans 6 pays : Bangladesh, Brésil, Éthiopie, Inde, Soudan et Soudan du sud et pour la leishmaniose cutanée plus de 70% des cas concernent 10 pays : Afghanistan, Algérie, Brésil, Colombie, Costa Rica, Éthiopie, Pérou, République arabe syrienne, République islamique d'Iran et Soudan (12,13).



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2015. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figure 1 : Répartition mondiale des cas de leishmaniose viscérale en 2013 selon l'OMS (14)

Concernant l'Europe, les pays les plus touchés sont l'Italie, l'Espagne, l'Albanie la Grèce puis la France (15). L'espèce est *L. infantum* principalement responsable d'une atteinte viscérale touchant surtout les enfants et les adultes immunodéprimés, en particulier atteints du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) mais également les transplantés d'organes solides ou les personnes recevant un traitement immunosuppresseur (15,16). De rares cas d'atteintes cutanées à *L. infantum* sont décrits également pour le bassin méditerranéen (17).

La leishmaniose viscérale est principalement une zoonose, hormis dans la péninsule indienne où il s'agit plutôt d'une anthroponose, l'infection d'autres mammifères comme le chien restant marginale et jouant un rôle a priori négligeable dans la transmission. On parle alors de cycle de type anthroponotique homme-phlébotome-homme (11). Dans le bassin méditerranéen et au Brésil, au contraire, le chien est le réservoir principal et l'infection de l'homme reste accidentelle.

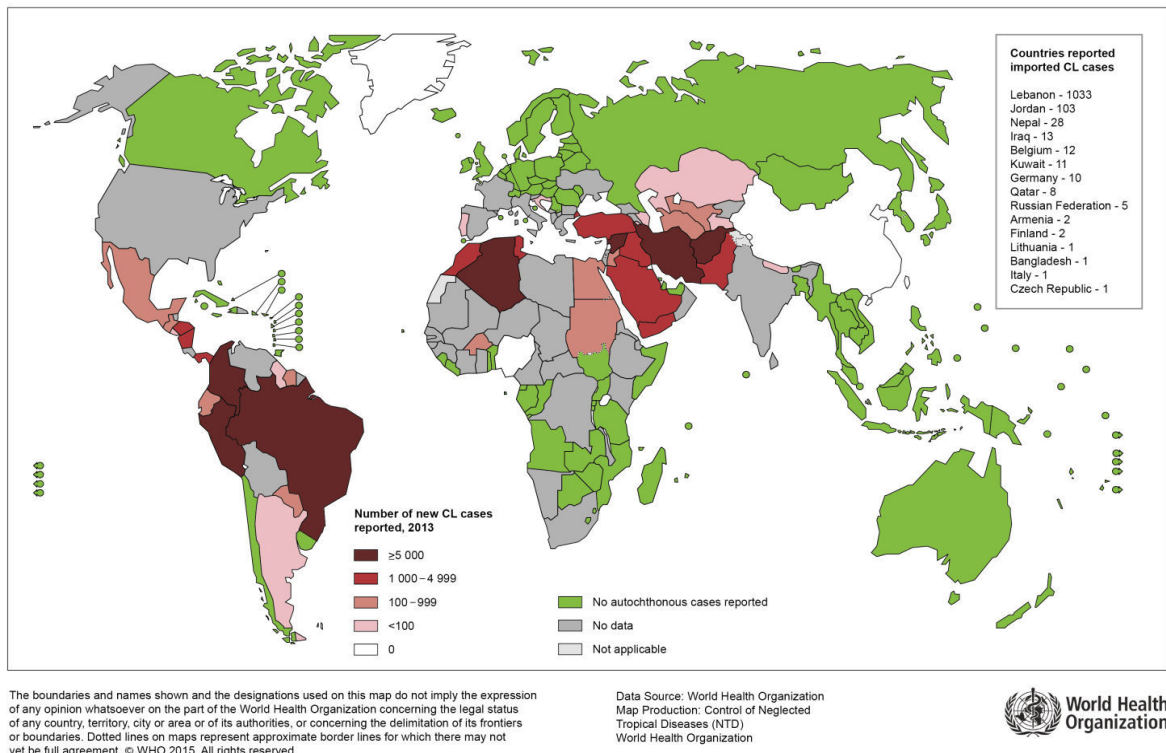


Figure 2 : Répartition mondiale des cas de leishmaniose cutanée en 2013 selon l'OMS (18)

Les leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses sont essentiellement des zoonoses. Plus de 70 espèces de mammifères peuvent être touchées (7).

1.1.3 Cycle parasitaire

Le cycle parasitaire comprend 2 étapes et 2 hôtes.

Le vecteur est un petit insecte diptère appartenant au sous-ordre des Nématocères et au genre *Phlebotomus* pour les espèces de l'ancien monde (AM) ou au genre *Lutzomyia* pour les espèces transmises dans le nouveau monde (NM). Chez ces insectes, seule la femelle est hémaphage, elle pique à partir du crépuscule et en début de nuit. Elle est attirée par la lumière (en particulier les lumières artificielles) et sa piqûre peut être douloureuse.

L'étape du cycle se déroulant chez l'hôte arthropode, correspond à la multiplication des formes promastigotes du parasite (Figure 3 étapes 1 à 4). Le phlébotome se contamine lors du repas sanguin, en absorbant des cellules parasitées (étape 1) qui libèrent des amastigotes dans le tube digestif du vecteur (étape 2). Les amastigotes se transforment alors en promastigotes en une douzaine d'heures, sous l'influence des conditions de pH et de température (19). Ces promastigotes procycliques vont se multiplier par division binaire (étape 3) dans l'intestin de l'hôte arthropode. La survie des promastigotes dans le tube digestif du phlébotome est liée à la consommation de plantes contenant du sucrose (20). Le métabolisme du sucrose fait appel à des enzymes appartenant à la famille de Glycosides Hydrolases (GH), comme les invertases, qui peuvent être intra- ou extracellulaires. A ce stade, les promastigotes procycliques se fixent aux villosités digestives de l'insecte grâce à leur flagelle et n'ont pas de capacité infectante (19). Ils vont ensuite évoluer de cette forme procyclique à une forme métacyclique (étape 4) qui présente une paroi plus épaisse et perdent la faculté de se multiplier, cette forme possède une capacité infectante (21,22) et sera transmise à l'hôte mammifère lors d'un repas sanguin (étape 5).

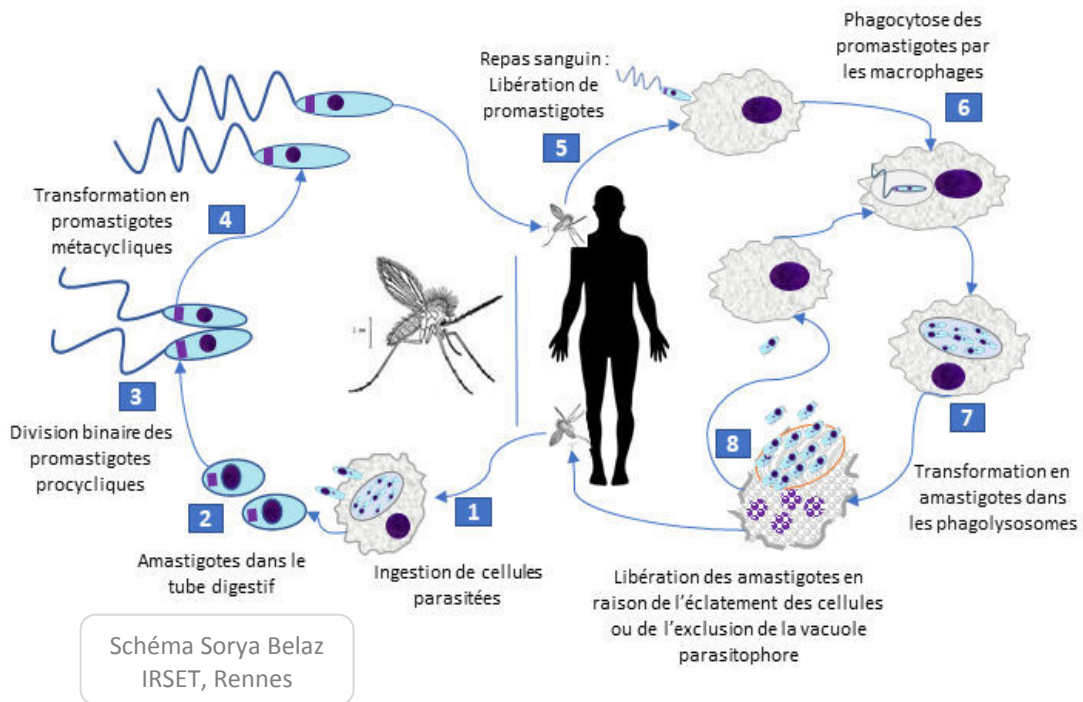


Figure 3 : Cycle parasitaire de la leishmaniose

Chez l'hôte mammifère (Figure 3 étape 5 à 8), les leishmanies sont des parasites intracellulaires du système des phagocytes mononucléés en particulier les macrophages et

les cellules dendritiques (DC). Les promastigotes existent de façon transitoire et sont rapidement phagocytés (étape 6) et transformés en amastigotes en raison du pH acide (<5) et de la température (> 35°C) (étape 7) dans les vacuoles d'endocytose des cellules cibles. Au sein des macrophages les amastigotes vont se multiplier par division binaire et entraîner la rupture de la cellule hôte (étape 8) ou l'exclusion de la vacuole parasitophore, libérant ainsi de nombreux amastigotes qui vont infecter de nouvelles cellules.

Les cellules cibles privilégiées sont les macrophages et les DC, toutefois la présence de promastigotes dans les polynucléaires neutrophiles a récemment pu être démontrée (23). Ainsi il y a un passage possible par le polynucléaire neutrophile avant l'internalisation dans les macrophages et les DC, et avant la transformation en amastigotes (24).

Au sein du cytoplasme de la cellule parasitée, les amastigotes se situent dans des vacuoles parasitophores qui peuvent être uniques autour de chaque amastigote pour certaines espèces ou une grande vacuole dans laquelle se situent plusieurs amastigotes, c'est le cas pour *L. amazonensis* (25,26).

1.1.4 Clinique

La leishmaniose existe sous 3 formes cliniques, la leishmaniose viscérale (LV) responsable de la mortalité imputable à cette pathologie, la leishmaniose cutanée (LC) dont il existe des formes diffuses (LCD) et enfin la leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) dont les répercussions esthétiques peuvent être très délabrantes.

Les promastigotes inoculés dans la peau au moment de la piqûre infestante sont phagocytés par les cellules du système des phagocytes mononucléés. A l'intérieur des cellules macrophagiques les amastigotes vont se multiplier. Après multiplication intracellulaire et éclatement de la cellule hôte, les amastigotes infestent localement de nouvelles cellules phagocytaires et éventuellement migrent vers d'autres tissus. L'expression clinique dépend à la fois du tropisme des espèces de leishmanies et du statut immunitaire de l'hôte, ainsi que des modalités de la réponse immunitaire de ce dernier. Ainsi une même espèce peut être impliquée dans plusieurs formes cliniques, c'est le cas par exemple de *L. infantum*, qui peut être retrouvé dans des LC, LCM et LV. Les espèces ayant un tropisme cutané vont se multiplier localement pour donner un granulome inflammatoire correspondant à la lésion visible au point de piqûre. Certaines espèces peuvent diffuser par voie lymphatique dans un périmètre loco-régional expliquant l'existence de lésions cutanées multiples parfois associées à une adénopathie avec un risque important de récurrence (fréquentes dans les atteintes à *L. guyanensis*) (27). L'absence d'une réponse adaptée de l'hôte peut expliquer la possibilité d'une atteinte cutanée diffuse. En effet, on observe une anergie anti-leishmanie dans les biopsies de patients atteints de LCD à *L. aethiopica*. (27). Concernant les LCM, une association entre les capacités métastatiques de l'espèce en cause (*L. braziliensis*) (27) et d'un excès de production de cytokines pro-inflammatoires, telle que l'IFN- γ et le tumor necrosis factor (TNF)- α (28) associé à un défaut de production de cytokines anti-inflammatoires comme l'interleukine(IL)-10 (29). Et enfin pour certaines espèces viscérotropes (*L. donovani* et *L.*

infantum), les cellules infectées ou les amastigotes « libres » vont diffuser beaucoup plus largement dans l'organisme, vers la rate, la moelle osseuse, le foie ou encore les ganglions.

Lors de l'infection les amastigotes peuvent pénétrer dans des cellules non phagocytaires, comme les fibroblastes au niveau du derme, des ganglions lymphatiques et de la rate ou les hépatocytes au niveau du foie (30–32). Ces cellules sont permissives mais ne permettent ni la multiplication des parasites ni la destruction de ceux-ci par une réponse cytotoxique. Ce sont donc des cellules sanctuaires expliquant les récurrences sans réinfections possibles dans la leishmaniose (en particulier LV et LCM).

1.1.4.1 La leishmaniose viscérale

La leishmaniose viscérale est la forme clinique la plus grave. Deux espèces sont principalement responsables de cette atteinte, *L. donovani* dans le bassin indien et *L. infantum* dans le bassin méditerranéen, dans l'Est Africain, dans le centre de l'Asie et en Amérique du sud. L'atteinte à *L. infantum* touche particulièrement les enfants ou les patients immunodéprimés alors que *L. donovani* peut aussi contaminer les adultes immunocompétents. Toutefois, chez les patients immunodéprimés des espèces habituellement responsables de leishmaniose cutanée peuvent entraîner une forme viscérale et inversement (33,34). En plus de ces atteintes particulières en fonction des espèces, les atteintes viscérales peuvent être particulières par leurs localisations ectopiques dans 10 à 15 % des cas chez l'immunodéprimé. Elle comporte des localisations inhabituelles : digestive, pulmonaire, cutanée (lésions nodulaires ou ulcérées), traduisant la diffusion poly-viscérale du parasite en l'absence de contrôle immunitaire de l'hôte (35).

Après la piqûre qui passe souvent inaperçue, l'incubation est asymptomatique et dure entre 3 et 6 mois mais peut s'allonger sur plusieurs années. L'infection peut même rester asymptomatique et ne se déclencher qu'en cas de survenue d'une immunosuppression.

L'atteinte clinique associe une fièvre « folle », complètement désorganisée avec une splénomégalie et des signes cliniques liés à des cytopénies. La splénomégalie est très intense et peut atteindre l'ombilic, elle est consécutive à un hypersplénisme par destruction des cellules parasitées. Depuis le site de piqûre les macrophages parasités vont migrer vers la moelle osseuse qu'ils vont envahir en s'y multipliant, expliquant les cytopénies qui sont aggravées par l'hypersplénisme. La première lignée hématopoïétique touchée est la lignée érythrocytaire, on observe donc en premier lieu une pâleur témoignant de l'anémie. L'hépatomégalie est retrouvée chez 50 à 95 % des malades dans les foyers indiens et africains, et de 50 à 65 % pour le foyer méditerranéen. Cette atteinte résulte d'une hépatite granulomateuse, quasi constante histologiquement. En effet, le foie est principalement constitué d'hépatocytes avec quelques cellules de Kupffer (macrophages hépatique) et il est prouvé qu'en plus de se multiplier dans les cellules de Kupffer, entraînant localement une destruction des hépatocytes et la formation d'un granulome(36), les leishmanies peuvent également se multiplier dans les hépatocytes (32). L'ictère, l'ascite et l'anasarque sont des signes tardifs et considérés comme de mauvais pronostic. Les adénopathies sont plus rares.

Par ailleurs dans le bassin indien, la leishmaniose est décrite sous le nom de Kala-azar, qui signifie « fièvre noire » en sanscrit, en raison d'une atteinte cutanée observée au cours de la leishmaniose viscérale à *L. donovani*, avec pigmentation des zones découvertes parfois associées à des macules ou papules hypo ou hyperpigmentées qui ne doivent pas être

confondues avec une lèpre lépromateuse. En plus de ces lésions cutanées contemporaines de l'atteinte viscérale une atteinte cutanée d'origine immunologique peut faire suite à l'atteinte viscérale, au moins 3 mois après le traitement. Cette atteinte est qualifiée de leishmaniose dermique post Kala-Azar (LDPKA) et les parasites sont retrouvés au niveau des lésions nécessitant un nouveau traitement.

L'évolution naturelle de la maladie se fait vers une pancytopenie, des infections opportunistes peuvent apparaître des suites de la neutropénie, les polynucléaires neutrophiles étant la deuxième lignée atteinte, et plus tardivement des signes hémorragiques peuvent témoigner de la thrombopénie, ces deux complications pouvant causer le décès du patient. Un état de cachexie accompagne cette pancytopenie qui évolue vers le décès en dehors d'un traitement adapté.

1.1.4.2 Les leishmanioses cutanées

1.1.4.2.1 Les leishmanioses cutanées localisées

Après la piqûre infectante, la lésion va apparaître au point de piqûre dans les quelques mois qui suivent celle-ci. Ainsi la localisation des lésions est souvent sur les zones découvertes, et en particulier les zones éclairées la nuit au moment propice à la piqûre par le phlébotome : visage (surtout en cas de port d'une lampe frontale), bras, jambes. Il peut y avoir une ou plusieurs lésions selon le nombre de piqûres.



Figure 4 : Exemples d'atteintes cutanées sèche à *L. major* à gauche et ulcérée humide à *L. guyanensis* à droite (Images S. Belaz)

Un à quatre mois après la piqûre, une petite papule va apparaître et grossir pour devenir une grosse papule plutôt sèche, comme le « boutons d'Orient » décrit au moyen Orient, ou plutôt évolué vers une forme ulcérée humide, comme les formes observées en Amérique du Sud. La lésion est indolore, arrondie ou ovalaire et bien circonscrite. Dans les formes ulcérées, un petit bourrelet périphérique inflammatoire délimite la lésion, c'est dans cette zone que la multiplication du parasite est la plus intense et c'est donc à ce niveau que le prélèvement à visée diagnostique doit être réalisé préférentiellement. Cette lésion bien circonscrite peut s'accompagner d'une adénolymphangite, très fréquente dans les atteintes par *L. guyanensis*. L'évolution naturelle se fait vers la guérison après un temps

plus ou moins long, mais laisse une cicatrice visible. Les principales complications sont les risques locaux de surinfection pouvant parfois compliquer le diagnostic.

1.1.4.2.2 Les leishmanioses cutanées diffuses

La lésion élémentaire est un petit nodule non ulcéré. Par la suite les nodules se multiplient en très grand nombre et augmentent en taille, jusqu'à former des plaques infiltrées et faisant évoquer une lèpre lépromateuse. En Amérique du Sud, *L. amazonensis* peut provoquer ce type d'atteinte, et en Afrique elle est due à *L. aethiopica*. L'évolution pour cette forme est assez défavorable sur le plan esthétique, d'autant plus que le traitement est souvent inefficace.

1.1.4.2.3 La leishmaniose cutanéomuqueuse

La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) est une forme sévère de la maladie qui atteint la sphère oro-pharyngée. Après une atteinte cutanée par certaine espèce de LC du NM, en particulier *L. braziliensis*, des cellules parasitées restées en sommeil dans les ganglions vont migrées vers une muqueuse. La muqueuse nasale est généralement la première touchée, la cloison nasale et par voisinage la muqueuse buccale sont atteintes. En cas d'évolution très longue, il peut y avoir destruction de toutes les parties couvertes de muqueuses au niveau du massif facial (espundia).

1.1.5 Diagnostic

1.1.5.1 Les anomalies biologiques non spécifiques

Dans le cadre de la leishmaniose viscérale, l'atteinte médullaire se traduit biologiquement par une pancytopenie. L'atteinte initiale est une anémie normochrome, normocytaire et arégénérative (puisque d'origine centrale), puis apparait une leucopénie touchant principalement les granulocytes et enfin dans les tableaux avancés une thrombopénie. Cette pancytopenie s'accompagne d'un syndrome inflammatoire avec augmentation de la CRP. Ce syndrome survient par déséquilibre protéique avec une hypergammaglobulinémie et une hypoalbuminémie. Lorsqu'elle est présente l'atteinte hépatique est de type cytolyse hépatique avec ictère et constitue un signe de gravité.

Dans le cadre de la leishmaniose cutanée il y a peu d'anomalies biologiques, car la réaction reste principalement localisée. Toutefois, lorsqu'une lymphangite ou une atteinte muqueuse est associée, elle peut s'accompagner d'une réaction inflammatoire systémique.

1.1.5.2 Le diagnostic indirect par sérologie

La recherche d'anticorps circulants présente surtout un intérêt pour le diagnostic de leishmaniose viscérale. En effet, en cas de lésion cutanée seule, une sérologie négative n'exclut pas le diagnostic. De plus, même en cas d'atteinte viscérale, une sérologie positive ne signe qu'un contact avec le parasite sans être un diagnostic de certitude. Elle permet surtout d'appuyer la nécessité de faire des prélèvements plus invasifs pour aboutir au diagnostic de certitude ou d'éliminer ce diagnostic différentiel en cas de doute. De plus, chez un immunodéprimé, la sérologie peut être mise en défaut. La sérologie n'apporte pas non plus de possibilité de suivi post thérapeutique car elle reste souvent positive avec des titres élevés d'anticorps, même après un traitement efficace.

Plusieurs techniques sont commercialisées : HAI (HemAgglutination Indirecte), ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), IFI (Immunofluorescence indirecte) ou WB (Western blot). Les recommandations actuelles pour le diagnostic sérologique en France prévoient une technique de dépistage (IFI ou ELISA) et une technique de confirmation (WB) (37). Mais en zone d'endémie, ce sont surtout les tests de diagnostic rapide, souvent basés sur l'immunochromatographie qui sont intéressants pour orienter le diagnostic rapidement. Cependant chez l'immunodéprimé leur sensibilité est moindre et nécessite une confirmation en laboratoire (35).

1.1.5.3 Le diagnostic parasitologique direct

Dans le cadre de la leishmaniose viscérale, le prélèvement le plus adapté est la ponction médullaire. En plus de confirmer le diagnostic, la réalisation du myélogramme (ou de la biopsie ostéoméduleuse) permet de rechercher les principaux diagnostics différentiels en particulier les hémopathies malignes ou les autres infections de la moelle comme les mycobactérioses ou l'histoplasme endémiques dans de nombreuses zones intertropicales dans lesquelles la leishmaniose viscérale est présente. Selon le tableau clinique, d'autres prélèvements peuvent être envisagés, comme la ponction hépatique, ganglionnaire, digestive ou pulmonaire, mais dans tous les cas, la ponction splénique présente un risque important de rupture de rate et doit être évitée dans la mesure du possible (elle n'est pas réalisée en France). A défaut d'une ponction médullaire (lorsqu'elle est refusée ou non réalisable), le diagnostic peut être posé sur le sang total après leucoconcentration nécessitant alors une technique de diagnostic très sensible (Polymerase Chain Reaction (PCR)).

Dans le contexte de leishmaniose cutanée, le prélèvement doit être réalisé au niveau des berges de l'ulcère. Il peut être réalisé par grattage avec une lame de scalpel ou un vaccinostyle mais dans ce cas le matériel recueilli est en faible quantité. On peut également réaliser une biopsie cutanée (« punch ») permettant d'avoir plus de matériel et de faire un examen anatomopathologique à la recherche des diagnostics différentiels (sporotrichose, ulcère de Buruli...).

Après réalisation de frottis ou appositions pour un examen direct, les prélèvements peuvent être mis en culture, les parasites peuvent également être détectés par biologie moléculaire ou même de façon plus récente par recherche antigénique (38). L'examen direct est classiquement réalisé après coloration au May Grünwald Giemsa (MGG) : les amastigotes sont observés dans les cellules phagocytaires, mais l'étalement sur la lame peut entraîner un éclatement des cellules parasitées et des amastigotes « libres » artéfactuels peuvent être observés (Figure 5). Les amastigotes mesurent 2 à 5 µm et possèdent un organite caractéristique, le kinétoplaste qui se présente comme un bâtonnet coloré en violet très foncé au MGG.

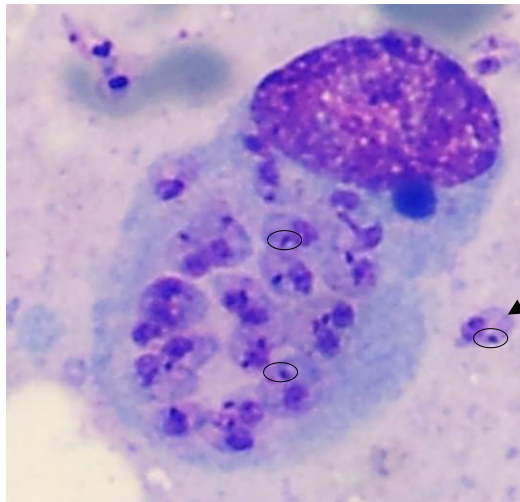


Figure 5 : Frottis de grattage cutané coloré au MGG et observé au grossissement x100. Présence d'amastigotes intracellulaires et « libres » (flèche), nombreux kinétoplastes visibles (ronds) (Image S. Belaz)

La culture n'est réalisée que dans les laboratoires spécialisés. Elle peut se faire sur milieu diphasique au sang de lapin : milieu Novy - Mc. Neal - Nicolle (NNN), ou sur milieu liquide (Milieu de Schneider ou RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) additionné de Sérum de Veau Fœtal (SVF)). Les cultures sont incubées à 27°C pendant 4 à 6 semaines et doivent être observées chaque semaine à la recherche de promastigotes mobiles. L'observation microscopique des promastigotes ne permet pas de faire le diagnostic d'espèce, mais l'obtention de la souche permet la conservation de celle-ci et la réalisation de son typage par séquençage, par spectrométrie de masse ou par électrophorèse des isoenzymes (cette dernière technique n'est réalisée que par le Centre National de Référence (CNR)).

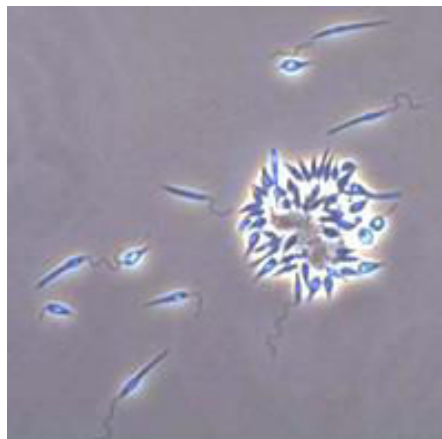


Figure 6 : Promastigotes de Leishmania donovani observés au microscope à contraste de phase, grossissement x20 (Image S. Belaz)

La détection des acides nucléiques par PCR est actuellement recommandée en France pour le diagnostic précoce des leishmanioses (37). Ce sont les techniques qui présentent la plus grande sensibilité et sont donc recommandées sur les prélèvements les moins riches comme le sang (sang total ou après leucoconcentration), les biopsies ganglionnaires ou hépatiques, ou encore les urines. Cette sensibilité importante permet aussi l'utilisation de la PCR pour le suivi post thérapeutique dans le cadre de la LV. Les gènes cibles utilisés sont variés : gènes de l'ADN kinétoplastidique (ayant une limite de détection à 1 parasite/ml

pour les espèces de l'ancien monde) (39–41) ou ceux codant pour les ARN ribosomiaux (ayant une limite de détection de 10 parasites/ml, mais plus adaptés à la recherche de toutes les espèces de leishmanies) (42). La biologie moléculaire a l'avantage d'allier un résultat plus rapide que la culture, et de permettre l'identification d'espèce en réalisant un séquençage (par exemple le séquençage de la région du gène de la Heat Shock Protein (HSP) 70 (43)) ou des PCR associées à l'étude du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP) (44).

1.1.6 Traitement

Les différentes formes cliniques et les différentes espèces parasitaires impliquées dans la leishmaniose nécessitent une approche thérapeutique adaptée. D'une part, le traitement doit être au mieux leishmanicide sur les formes amastigotes du parasite, mais également, pour les atteintes viscérales, il doit présenter une bonne diffusion dans les organes cibles, et un bon profil de tolérance. Par ailleurs, la distribution tropicale de la maladie principalement dans des zones défavorisées du globe, impose des traitements peu coûteux.

1.1.6.1 Les dérivés de l'antimoine

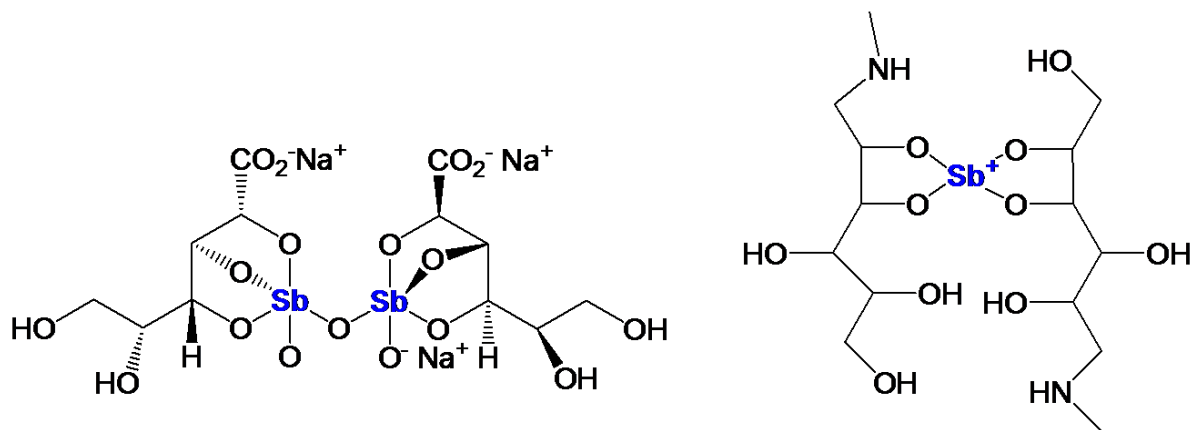


Figure 7 : Formulation chimique du sodium stibogluconate à gauche et du méglumine antimoniate à droite

Les dérivés de l'antimoine sont utilisés depuis presque un siècle dans le traitement de la leishmaniose cutanée et viscérale, en particulier en zone d'endémie, du fait de leur prix raisonnable. Les dérivés trivalents (Sb III) ont été les premiers utilisés, rapidement remplacés par des dérivés pentavalents (Sb V) (comme le sodium stibogluconate /Pentostam® ou le méglumine antimoniate/Glucantime®, Figure 7) qui présentent un index thérapeutique plus grand et sont donc mieux tolérés. Ces traitements sont administrables par voie intramusculaire ou intraveineuse dans le cadre de la leishmaniose viscérale ou cutanée diffuse et peuvent être utilisés en injections péri-lésionnelles dans certains cas de leishmaniose cutanée circonscrite et sans risque d'évolution vers une récurrence muqueuse. Cependant, en usage systémique, il existe des effets secondaires qui sont potentiellement mortels. D'une part la stibio-intolérance, qui s'apparente à une réaction anaphylactique lors des injections mais qui s'amende à l'arrêt du traitement, d'autre part, la stibio-

intoxication, correspondant à une accumulation toxique du produit dans le foie, la moelle osseuse, les reins ou le myocarde. Cette toxicité peut conduire au décès et nécessite donc la surveillance de l'électrocardiogramme et du bilan biologique au cours du traitement.

Le mécanisme d'action, encore assez mal connu actuellement, nécessite tout d'abord la réduction de la forme Sb V en forme Sb III, ceci par les enzymes de la cellule hôte ou de l'amastigote (Figure 8). L'antimoine agirait sur la synthèse de l'Adénosine Triphosphate (ATP), modifiant ainsi le métabolisme énergétique. Par ailleurs, le Sb III entraîne une fragmentation de l'Acide Désoxyribonucléique (ADN) chez les leishmanies, mais même sans effet direct anti-leishmanie, la forme pentavalente a un effet sur l'immunité anti-leishmanie et favorise l'élimination de l'infection par recrutement des monocytes en particulier par l'intermédiaire du récepteur ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1). En effet, chez des souris mutantes pour ce récepteur le traitement par antimonie perd son efficacité parasiticide (45).

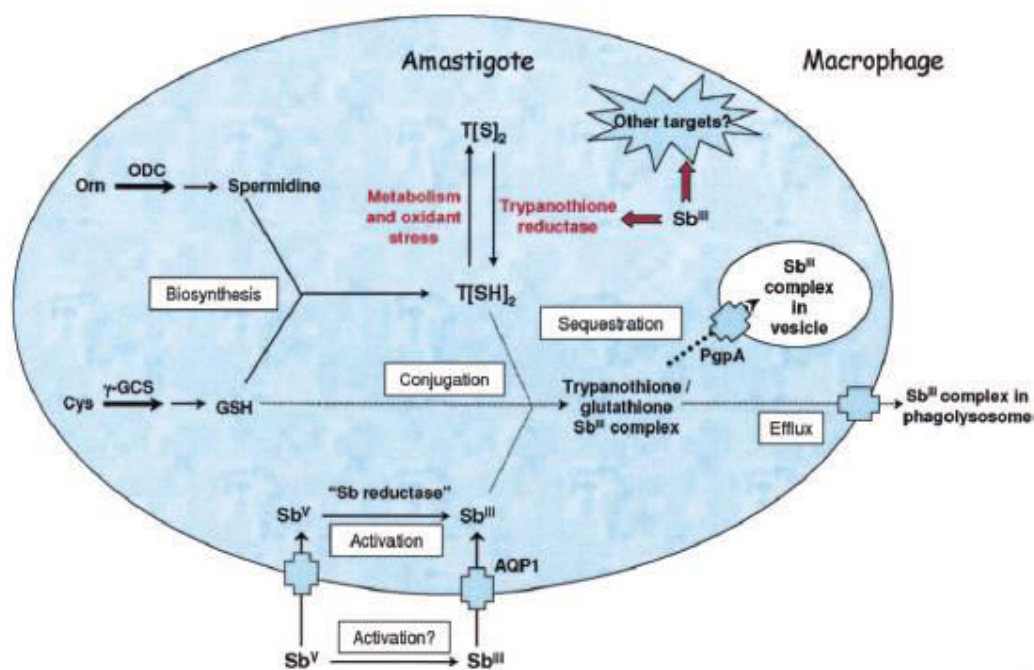


Figure 8 : Mécanisme d'entrée, d'activation et de résistance des dérivés de l'antimoine chez leishmania sp., Croft *et al* (46)

Parmi les mécanismes de résistance, l'inactivation du gène de l'aquaglycéroporine, AQP1, semble impliqué car elle permet l'entrée du Sb III (46,47), lorsque la réduction a eu lieu dans le macrophage (48). Dans l'amastigote intracellulaire, la réductase thio-dépendante TDR1 (49) et la réductase ACR2 (50) sont également impliquées dans la réduction du Sb V en Sb III. Leur surexpression chez l'amastigote explique l'effet antiparasitaire des dérivés pentavalents sur cette forme, comparée au promastigote (51). Cependant, la présence de ces réductases est variable chez l'amastigote axénique, expliquant les études contradictoires (52,53) concernant l'effet des dérivés pentavalents sur l'amastigote axénique.

1.1.6.2 L'Amphotéricine B et ses dérivés lipidiques

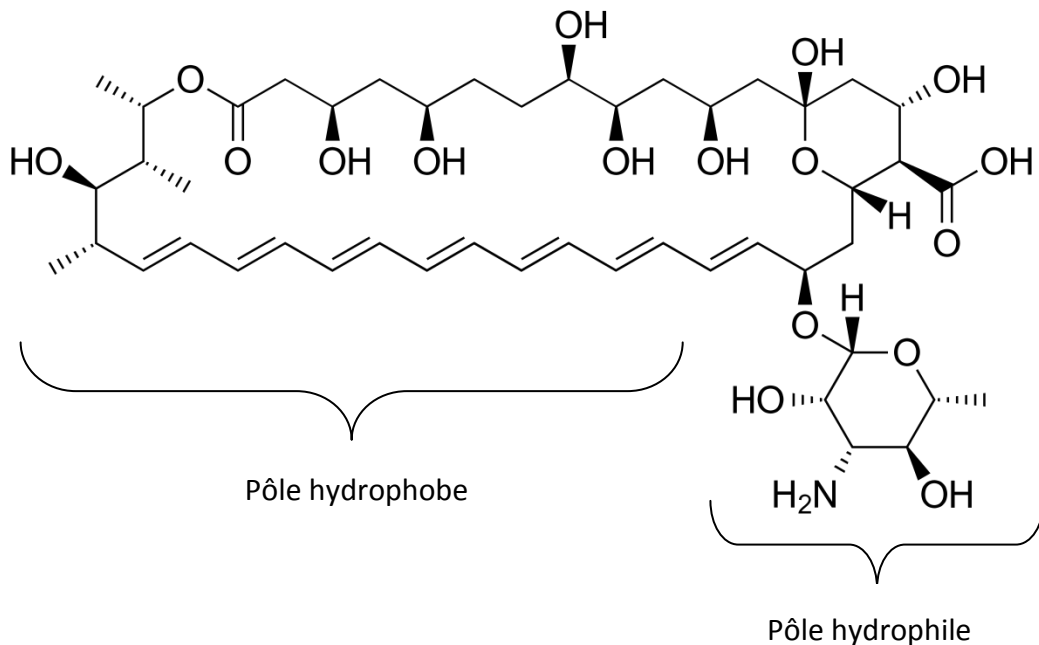


Figure 9 : Formule chimique de l'amphotéricine B

L'amphotéricine B est un macrolide polyène développé à visée antifongique (Figure 9). Cette molécule découverte en 1951 est extraite de *Streptomyces nodosus*. La molécule est constituée d'un pôle hydrophobe (chaîne carbonée) et d'un pôle hydrophile (groupements hydroxyles) : elle se dimérise par ses pôles hydrophiles et possède ainsi une forte affinité pour les stérols membranaires, principalement l'ergostérol, présent en grande quantité dans la membrane des champignons et des leishmanies. Cette interaction entraîne la formation de pores membranaires qui déstabilisent la membrane parasitaire ou fongique, et aboutit à une fuite du contenu intra-cellulaire et à la lyse de la cellule parasitaire ou fongique. Cependant, elle possède également une certaine affinité pour le cholestérol présent dans les membranes de mammifères. Son index thérapeutique est donc étroit et elle induit des effets secondaires, en particulier une importante toxicité rénale, car elle est éliminée par voie urinaire et y est donc concentrée. L'amphotéricine B n'est pas du tout absorbée par voie digestive et doit donc être administrée par voie intraveineuse. L'index thérapeutique étroit ainsi que le mode d'administration font que cette formulation reste peu utilisable en zone d'endémie. Pour diminuer l'interaction avec les stérols membranaires de l'hôte, l'amphotéricine B a été intégrée dans plusieurs formulations lipidiques, un complexe phospholipidique (ABELCET®) ou un liposome (AMBISOME®) (Figure 10) seule formulation lipidique d'amphotéricine B ayant l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement de la LV en France. Ainsi, l'index thérapeutique est plus grand mais l'administration reste exclusivement intraveineuse et son coût élevé rend son utilisation en zone d'endémie impossible en l'absence d'un soutien de l'OMS (ce qui existe à l'heure actuelle dans le bassin indien).

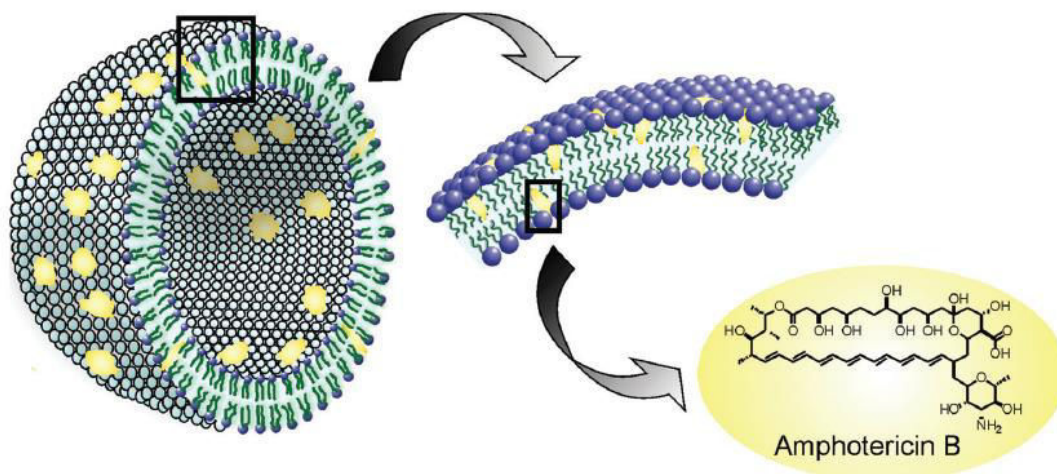


Figure 10 : Formulation de la forme liposomale de l'amphotéricine B/Ambisome[®], Gutiérrez *et al* (54)

Les patients présentant une co-infection VIH-leishmaniose viscérale posent le problème d'un traitement efficace et utilisable en association avec le traitement antirétroviral. Chez ces patients, l'utilisation de l'Amphotéricine B liposomale est à privilégier (55,56). Cependant du fait d'un plus fort risque d'apparition de résistance dans cette population, l'utilisation d'une bithérapie contenant de l'Amphotéricine B liposomale et une autre molécule de première ligne peut être proposée en particulier la miltéfosine (57,58).

1.1.6.3 La Miltéfosine

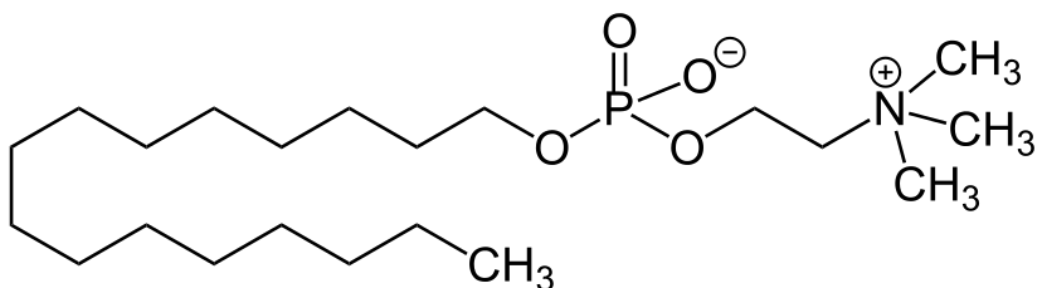


Figure 11 : Formulation chimique de la Miltéfosine ou hexadécylphosphocholine

La Miltéfosine (IMPAVIDO[®]) ou hexadécylphosphocholine est un alkylphospholipide (Figure 11). C'est le seul traitement anti-leishmanien disponible par voie orale. Ce mode d'administration, ainsi que de faibles effets secondaires gastro-intestinaux, en font une molécule très intéressante. Cependant cette molécule initialement développée comme chimiothérapie anticancéreuse possède des effets tératogènes importants, imposant l'utilisation d'une contraception efficace pendant le traitement (28 jours), mais également pendant les 2 mois qui suivent l'arrêt du traitement du fait de la demi-vie longue de ce produit. Ce qui restreint son utilisation en zone d'endémie, où la contraception peut être une barrière culturelle.

Cette molécule est cytotoxique pour le parasite sous la forme promastigote et amastigote (59), par inhibition de la synthèse des constituants lipidiques (60) de la membrane, et par

son action inhibitrice de la Protéine Kinase B, Akt, aboutissant à une mort par apoptose (61). Par ailleurs, la Miltéfosine présenterait un rôle immunomodulateur favorisant l'élimination des parasites intracellulaires par l'intermédiaire de l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, en particulier l'interféron γ , mais également par une réponse plus importante des macrophages à ces cytokines avec une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'espèces réactives de l'azote (RNS) (62). En comparaison avec l'effet immunomodulateur nécessaire à l'activité parasiticide des dérivés antimoniés, ici la miltéfosine reste parasiticide chez les souris déficientes en lymphocytes T ou ne produisant pas de ROS et de RNS (62).

L'utilisation de la Miltéfosine dans le traitement de la leishmaniose viscérale date des années 2000 dans le bassin indien (63). La Miltéfosine présente une $\frac{1}{2}$ vie longue (150-200h) et un index thérapeutique étroit. Le temps après la prise du médicament pendant lequel la concentration est infra-thérapeutique est donc important et entraîne un fort risque d'apparition de résistances (64). Cependant, cette longue rémanence en fait une molécule intéressante dans la prévention des récives en particulier chez l'immunodéprimé (57,58). Les résistances surviennent par mutation des transporteurs membranaires, entraînant une diminution de l'entrée de la molécule (inactivation du transporteur d'entrée LdMT) ou son externalisation par surexpression de transporteur d'efflux (type ABC transporteur) (65).

1.1.6.4 La Pentamidine

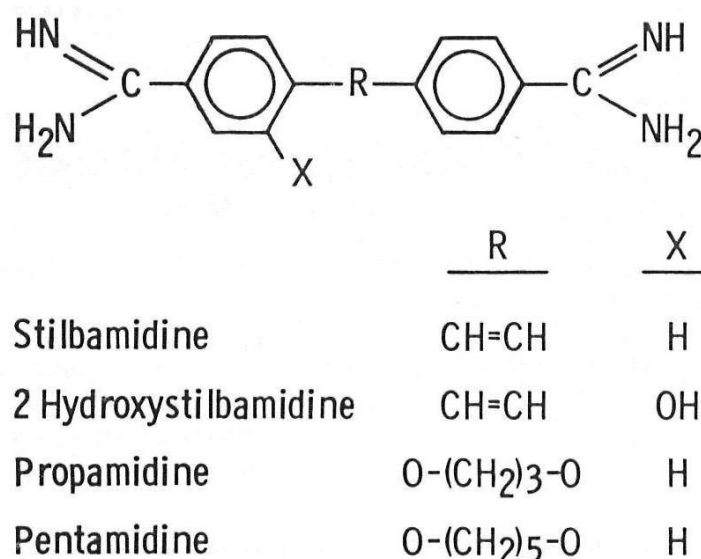


Figure 12 : Structures chimiques des diamines aromatiques (66)

L'iséthionate de pentamidine (PENTACARINAT®) (Figure 12) est une diamine aromatique inhibant la synthèse de l'ADN parasite ou fongique par blocage de la thymidine synthétase et fixation sur l'acide ribo nucléique (ARN) de transfert (67). Elle est surtout utilisée dans le traitement curatif et prophylactique de la pneumocystose par voie pulmonaire (inhalation). Les effets secondaires en cas d'administration par voie générale (insuffisance rénale, déséquilibre du diabète, hyperkaliémie, neutropénie, allongement du QT...) étant fréquents et dose-dépendants, cette molécule n'est pas recommandée pour le traitement de la LV qui nécessite une dose importante et une administration parentérale,

mais elle peut être utilisée dans le traitement de la LC. C'est d'ailleurs le traitement de référence proposé en Guyane Française (68).

1.1.6.5 La Paromomycine®

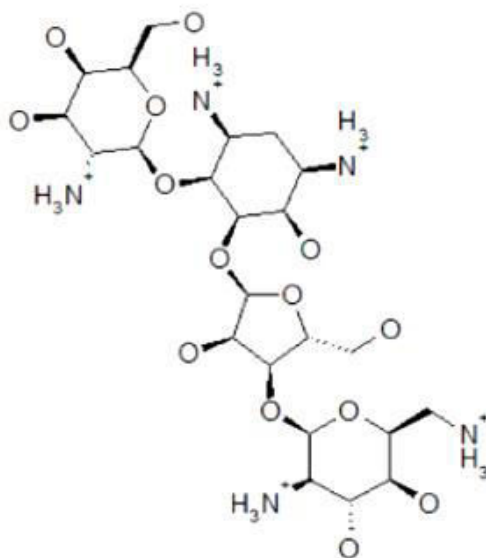


Figure 13 : Structure chimique de la paromomycine (67)

L'aminosidine sulfate (PAROMOMYCINE®) (Figure 13) est un antibiotique de la famille des aminosides ayant une activité antibactérienne mais également antileishmanienne. Comme l'amphotéricine B, il est produit par une espèce de *Streptomyces*, *Streptomyces chrestomyceticus*. Son mécanisme d'action, proche de celui de la pentamidine, passerait par une inhibition de la synthèse protéique par fixation de la molécule antiparasitaire aux ARN (67).

Appartenant à la famille des aminosides, cette molécule partage leur toxicité rénale et cochléo-vestibulaire. Concernant le traitement de la leishmaniose, la Paramomycine® est surtout utilisée en association avec les dérivés antimoniés ou avec la miltéfosine dans le cadre de la LV (69) ou en version topique dans le traitement des LC de l'ancien monde (70).

1.1.6.6 Les dérivés azolés

Les antifongiques azolés agissent par inhibition de la synthèse de l'ergostérol qui est le stérol de la paroi des champignons, tandis que c'est le cholestérol qui est présent dans les membranes des cellules mammifères. Plus précisément, les azolés inhibent la 14 α -lanostérol-déméthylase entraînant l'accumulation d'un précurseur de l'ergostérol dans la paroi fongique et déstabilisant ainsi la paroi. La proximité de la distribution des stérols dans les parois fongique et parasitaire explique que les azolés ont une certaine efficacité antiparasitaire, tout comme l'amphotéricine B, mais à la différence de celle-ci, ils présentent une très bonne biodisponibilité permettant une utilisation per os. Le kétoconazole, le fluconazole ainsi que l'itraconazole sont utilisés comme traitement de seconde ligne dans le traitement de la LV par voie générale ou de la LC par voie générale ou topique (71–74).

1.1.6.7 Recommandations actuelles de traitement

Les recommandations varient selon la présentation clinique et les risques évolutifs.

Tableau 2 : Critère de classification des LC simples et des LC complexes. D'après Aronson *et al* (75)

LC simples	LC complexes
Absence de risque de LCM (contamination dans l'AM et/ ou espèce identifiée sans risque de LCM)	Risque d'évolution vers une LCM (Contamination dans le NM ou espèce identifiée parmi les <i>Viannia</i> spp.
Absence de diffusion locale ou d'adénopathie	Présence de nodules sous-cutanés ou d'une adénopathie
Moins de 4 lésions et lésions < 1 cm	1 lésion > 5cm ≥ 4 lésions ou lésions >1 cm
Lésion(s) accessible(s) à un traitement local	Taille ou localisation des lésions rendant impossible un traitement local
Localisation lésionnelle n'ayant pas de risque esthétique ou fonctionnel	Lésions touchant le visage (y compris les oreilles), les doigts, les orteils (ou autre articulation avec un risque fonctionnel) ou la sphère génitale
Patient immunocompétent	Patient non immunocompétent
Lésion(s) ayant guéri sans traitement	Echec clinique du traitement local
Aucun critère de LC complexe	Tableaux cliniques particuliers : LC récidivante, LC diffuse ou disséminée

LC : Leishmaniose cutanée ; LCM : Leishmaniose cutanéomuqueuse ; AM : Ancien monde ; NM : Nouveau monde

Pour les LC de l'AM simples, l'abstention thérapeutique ou le traitement local sont possibles en première intention (75). Si un traitement local est choisi, il peut s'agir d'un traitement physique (chaleur ou cryothérapie) ou d'un traitement par injections péri-lésionnelles de dérivés antimoniés, ou encore d'un traitement par topique contenant de la paromomycine (pas encore disponible en France), sans supériorité d'un choix par rapport aux autres (75). Les experts français et européens s'accordent pour l'abstention thérapeutique en cas d'atteinte par *L. major*, *L. tropica*, *L. infantum* et *L. aethiopica*, 1 à 3

lésions de moins de 30 mm dans une zone pour laquelle les conséquences esthétiques sont acceptables et si le patient l'accepte et peut être suivi au long cours (76,77). Cependant, un traitement local est effectué si le patient le souhaite, et plusieurs traitements locaux peuvent être proposés selon le diagnostic d'espèce par : injections péri-lésionnelles de dérivés de l'antimoine (seul l'antimoniote de méglumine est disponible en France) associé ou non à la cryothérapie, application de paromomycine et de méthylbenzéthonium, ou traitement par la chaleur (76,77).

Pour les LC du NM ou les LC complexes, un traitement systémique doit être proposé (recommandation de grade A). Dans ce cas, l'amphotéricine B liposomale ou non, la pentamidine, les dérivés de l'antimoine associés à la pentoxifylline ou la miltéfosine peuvent être utilisés, mais aucune de ces molécules n'a d'AMM dans la LC (ni de recommandations par la Food and Drugs Administration (FDA)). Seule la miltéfosine possède une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) dans cette indication, mais là encore l'Infectious Diseases Society of America (IDSA) ne désigne pas de choix prioritaire entre les différentes options thérapeutiques (75). Les recommandations européennes, en revanche, proposent le même traitement local que dans les LC de l'AM, s'il y a peu de lésions, localisées dans une zone sans conséquences esthétiques, de taille inférieure à 30 mm, sans diffusion lymphatique et non acquises en Bolivie (76). En revanche, un traitement par voie générale (variant selon les espèces) est proposé si ces conditions ne sont pas réunies (76).

Pour les LC du NM, les experts français et européens proposent une prise en charge dépendante de l'espèce. Hors *L. braziliensis*, la pentamidine est proposée en cure courte par voie intraveineuse ou en dose unique intramusculaire (68,77). En cas d'atteinte à *L. braziliensis* (ou en cas d'échec après 2 cures de pentamidine), les dérivés de l'antimoine en traitement parentéral sur 20 jours sont proposés ; en cas d'échec l'amphotéricine B liposomale (5 jours consécutifs puis une réinjection à J10) ou la miltéfosine sont alors proposées (76,77).

Pour les LC de l'AM complexes, s'il existe plus de 3 lésions ou une lésion de plus de 30 mm ou localisation dans une zone à fort risque de conséquences cosmétiques (76), les experts français préconisent l'utilisation de l'amphotéricine B liposomale par voie parentérale sur 2 à 8 jours (77) malgré un faible niveau de preuve. Les recommandations européennes s'accordent sur le traitement par voie générale, en ciblant la miltéfosine ou l'amphotéricine B liposomale (5 jours consécutifs puis une réinjection à J10), ou encore les dérivés de l'antimoine associés à la pentoxifylline (76).

Pour la LCM, les recommandations sont les mêmes que pour les LC complexes, c'est-à-dire qu'un traitement systémique doit être proposé, mais sans prééminence d'une thérapeutique par rapport à une autre (75). Là encore, aucune molécule ne possède d'AMM dans l'indication de LCM, en dehors de la miltéfosine lorsque le diagnostic de l'espèce est connu à *L. braziliensis* (ATU) (77). Les experts européens ont quant à eux proposés dans l'ordre : les dérivés antimoniés associés à la pentoxifylline, ou l'amphotéricine B liposomale, ou la miltéfosine pour les LCM du NM. Et, dans l'ordre également, la miltéfosine, les dérivés antimoniés ou l'amphotéricine B liposomale pour la LCM de l'AM. (76)

Pour les atteintes muqueuses à *L. braziliensis*, les recommandations françaises sont d'utiliser les dérivés de l'antimoine pendant 28 jours, avec un recours à l'amphotéricine B liposomale ou la miltéfosine en cas d'échec (77).

Pour le traitement de la LV dans les pays développés, l'amphotéricine B liposomale est le traitement de première intention (75,77). Le méglumine d'antimoniate ou la miltéfosine sont utilisés en seconde intention (en cas d'échec ou d'impossibilité de donner l'amphotéricine B liposomale). Les autres molécules n'ont pas l'AMM (ni l'autorisation FDA) pour le traitement curatif des LV, mais la pentamidine a cependant une AMM en prophylaxie secondaire chez les personnes vivant avec le VIH (77). En zone d'endémie, l'amphotéricine B liposomale est recommandée en première intention dans le bassin indien en raison d'un important niveau de résistance aux dérivés antimoniés, mais dans la région du Soudan, l'association des dérivés antimoniés plus ou moins combinés à la miltéfosine est encore indiquée en première intention.

1.1.6.8 La vaccination

La production d'un vaccin contre les micro-organismes intracellulaires est toujours un challenge. D'autant plus lorsqu'il s'agit de protozoaires comme en témoigne l'absence de vaccin pleinement efficace contre le paludisme ou contre la toxoplasmose. En effet l'immunité efficace contre ces parasites implique une orientation Th1 et une activité cytotoxique et pas une immunité humorale Th2 avec production d'anticorps qui est celle habituellement obtenue suite à une vaccination.

Concernant la LC ou la LCM, une immunité efficace étant obtenue après la guérison d'une lésion, des campagnes de « leishmanization » ont été menées dans les années 50 (78,79). Elles consistaient en l'injection, dans une zone masquée, de parasites vivants puis après le développement d'une lésion les patients étaient traités. Cependant la persistance des parasites dans des cellules sanctuaires (31) et le risque de leishmaniose viscérale avec des espèces « cutanées » chez l'immunodéprimé ont conduit à arrêter cette vaccination. Par la suite, des parasites avirulents, KO pour certains gènes ont été produits parfois associés à des adjuvants très immunogènes, mais ces vaccins ne se sont pas révélés suffisamment efficaces et ont également été abandonnés (78).

Aucun vaccin humain contre la LV n'est actuellement disponible. Plusieurs vaccins dirigés contre des fragments protéiques de *L. donovani* ou *L. infantum* sont actuellement en cours de développement (80). Ces vaccins sont produits à partir de protéines de surface ou de protéines excrétées par le parasite, comme la glycoprotéine (GP)63 ou la GP46 (80).

Cependant, ces vaccins à base de fragments protéiques induisent une réponse plutôt humorale, pour obtenir une réponse efficace, l'idéal serait de faire produire les antigènes vaccinaux directement par les cellules de la personne vaccinée. Ceci est possible avec les vaccins à ADN, qui ont en plus l'avantage de pouvoir coupler, dans un même plasmide, plusieurs antigènes parasitaires, ce qui permettrait de concevoir un vaccin efficace contre plusieurs espèces de leishmanies, et visant plusieurs protéines d'intérêt (GP63 et GP46 par exemple). Cependant l'innocuité à long terme de ce type de vaccin n'est pas encore connue.

Un vaccin canin utilisant des fragments de GP63 est utilisé au Brésil depuis 2004 (Leishmune®). Un autre vaccin canin ciblant la GP46 de *L. infantum* a été mis au point à l'IRD de Montpellier et est commercialisé sous l'appellation CaniLeish® depuis 2011 en Europe (81). La vaccination concerne la population canine du sud de la France, en Espagne, au Portugal, mais également les chiens voyageant dans ces zones de façon répétée ou pour une longue période. L'intérêt de ces vaccins réside dans l'induction d'une réponse Th1 avec production de NO en réponse à un challenge par le parasite après la vaccination, ce qui permet une élimination rapide de l'infection (82,83).

1.1.7 Mécanisme d'interaction hôte-parasite et réponse immune anti-leishmanie

1.1.7.1 Les étapes dermiques

Des promastigotes métacycliques mais également la salive du phlébotome (84) et le PSG (promastigote secretory gel) (85) produit par les parasites dans l'estomac du vecteur sont transmis lors de la piqûre (86) ; ils contribuent au recrutement de macrophages, mais également de polynucléaires neutrophiles (PNN) (Figure 14) (84–86). La salive des phlébotomes en elle-même a un effet vasodilatateur local par le maxadilan, et elle entraîne la production de chimiokines telles que le C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2), qui attire également les monocytes et les PNN sur le site de la piqûre, indépendamment de la présence du parasite (84).

1.1.7.1.1 Implications des PNN dans les étapes dermiques

Les PNN, même s'ils ne sont pas la cellule cible des parasites, sont des phagocytes professionnels et peuvent phagocyter les promastigotes de nombreuses espèces de leishmanies (87). Les capacités microbicides des PNN peuvent agir contre les parasites dans les vacuoles de phagocytose ou à l'extérieur des cellules dans une structure fibreuse récemment décrite, les neutrophil extracellular traps (NET) (Figure 14) (87). Cependant, grâce au lipophosphoglycane (LPG) et à la GP63, les parasites échappent à l'activité microbicide des NET (Figure 14) comme en témoigne la dégradation très rapide dans les NET des parasites déficients pour l'une ou l'autre de ces molécules de leur surface (88). Ensuite, les PNN vont intervenir dans le recrutement des cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée et adaptative, par leur capacité à produire diverses cytokines, en particulier l'IL-8 ou la « macrophage inflammatory protein-1 β » (MIP-1 β) chémo-attractant, attirant respectivement d'autres PNN et des macrophages (Figure 14) (89). Les PNN en sécrétant de l'élastase améliorent les capacités microbicides des macrophages par une voie induite par le TNF- α , aboutissant à la production de monoxyde d'azote (NO) (Figure 14) nécessaire à la leishmanicidie (39). Par ailleurs, l'élastase réprime l'IL-4 et l'IL-10 cytokines responsables d'une persistance des parasites (90). Au sein de la vacuole de phagocytose du PNN, le parasite ne peut pas évoluer vers la forme amastigote. Les polynucléaires ayant phagocyté des parasites peuvent évoluer vers l'apoptose ou être ensuite phagocytés par des macrophages (Figure 14) permettant une entrée des parasites dans leur cellule cible sur le modèle d'un cheval de Troie (90).

1.1.7.1.2 Implications des DC dans les étapes dermiques

Lors des étapes initiales dans le derme, d'autres phagocytes professionnels peuvent prendre en charge les promastigotes, les DC (Figure 14). La reconnaissance des promastigotes peut se faire via un récepteur spécifique des DC : le dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN). Les DC sont responsables du transport des parasites vers les ganglions lymphatiques de proximité, permettant de mettre en action l'immunité adaptative (Figure 14) (91).

Une fois les premiers amastigotes libérés après l'éclatement des macrophages, les DC peuvent également reconnaître ces amastigotes via DC-SIGN (92,93). Cette interaction très précoce peut concerner des cellules dendritiques immatures, entraînant alors une maturation avec une expression diminuée du cluster of differentiation (CD)40, CD80, CD86 et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II), permettant aux parasites d'échapper à la reconnaissance par le système immunitaire via la présentation par les DC aux macrophages (92).

1.1.7.1.3 Implications des protéines du complément dans les étapes dermiques

Classiquement, les promastigotes injectés dans le derme entraînent une activation de la voie classique du complément. Les protéines du complément, en particulier C3, vont alors se fixer sur la GP63, le LPG ou la protéase de surface des promastigotes (PSP) et être clivées en leurs formes actives (C3b), pour opsoniser les parasites et faciliter leur phagocytose (Figure 14) (94,95). Dès cette première étape, les parasites mettent en place des techniques de lutte contre la réponse immune, ainsi une métallo-protéase de la paroi des promastigotes, la GP63, peut activer la transformation du C3 en C3b puis en C3bi, forme inactivée de la protéine C3b qui ne permet alors pas la formation de la C5 convertase (Figure 14) (96,97) inhibant ainsi la lyse par le complément. Cette action s'associe à l'activité de protéines kinases de la membrane parasitaire qui phosphorylent C3 et C3b pour les rendre inactives, diminuant ainsi également la formation du complexe C5b-C9 (ou C5 convertase).

L'opsonisation par C3bi permet la reconnaissance par le CR3 qui sera détaillé dans le paragraphe suivant. En culture, même en l'absence de préexposition des parasites au sérum, les macrophages sécrètent de petites quantités de C3 qui permettent l'opsonisation des promastigotes favorisant la reconnaissance et l'entrée via le CR3 (98). En plus de l'opsonisation par le complément, le LPG peut fixer la protéine C réactive (CRP) (99), et la GP63 peut fixer la fibronectine. Ces liaisons interviennent même à des taux physiologiques, en dehors de tout état inflammatoire (100,100).

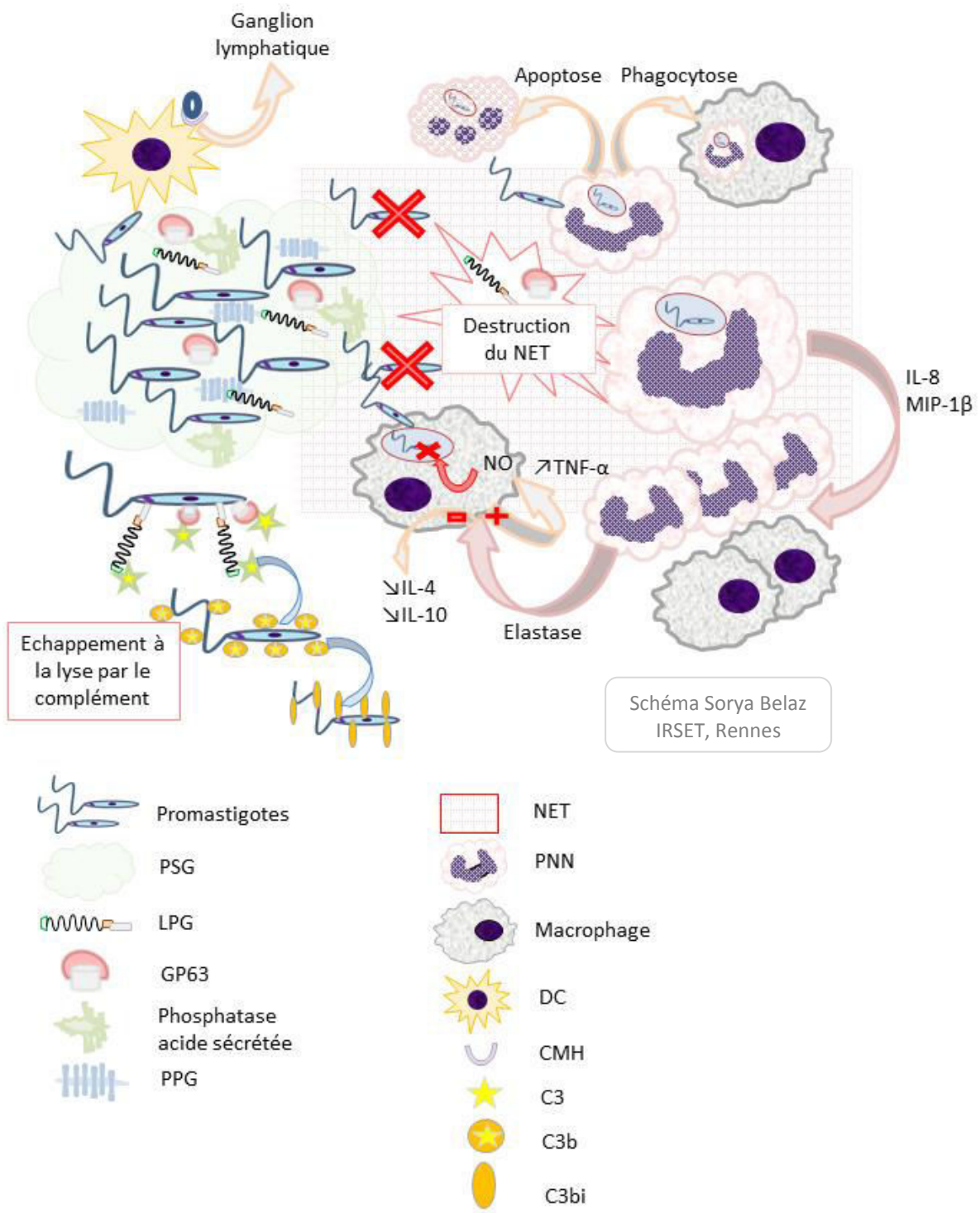


Figure 14 : Etapes initiales de la réponse immune

1.1.7.2 Interactions membranaires leishmanie-macrophage et internalisation des parasites

1.1.7.2.1 L'interaction des promastigotes avec les récepteurs aux compléments CR1 et CR3

Après la première interaction avec le complément, les parasites sont phagocytés par endocytose principalement via le CR1 et le CR3 (101). Les vacuoles de phagocytose évoluent ensuite en vacuoles parasitophores qui sont issues de phagolysosomes et au sein desquelles le parasite peut survivre, se transformer en amastigotes et se multiplier par division.

Comme le CR3, le récepteur CR1 des macrophages intervient, grâce à son activité cofacteur du facteur 1, dans la formation du C3bi à la surface des promastigotes opsonisés (102) (Figure 15). Le C3bi, même rendu inactif, reste fixé sur le LPG des promastigotes et permet leur phagocytose en favorisant l'interaction avec les récepteurs au complément (CR1 et CR3) plutôt qu'avec le récepteur au mannose (MRC-1) (97). A noter que l'interaction avec CR1 est moins forte et transitoire alors que l'interaction avec CR3 est forte et stable (103).

L'utilisation d'anticorps bloquant différentes parties du CR3 a permis de préciser que ce récepteur peut reconnaître le parasite au niveau de plusieurs sites : la partie récepteur de type lectine qui reconnaît le LPG du parasite non opsonisé ou le site de reconnaissance de C3bi qui reconnaît le LPG ou la GP63 du parasite opsonisés par le C3bi (Figure 15). Pour *L. infantum* la sous-unité CD11b du CR3 reconnaît également la protéine parasitaire PSA-2 (104–108).

1.1.7.2.2 L'interaction des promastigotes avec les autres récepteurs

En plus des CR, la reconnaissance du promastigote par le macrophage peut se faire par le flagelle (109), qui est reconnu par d'autres récepteurs macrophagiques : toll like receptors (TLR) 2 et 4, MRC-1, mannan-binding protein (MBP), Detin-1, DC-SIGN, récepteur de la fibronectine ou les récepteurs aux fragments constants (Fc) des immunoglobulines comme FcγRI (CD64) (92,110–112) (Figure 15). Selon le récepteur, différentes voies peuvent être activées ou inhibées.

1.1.7.2.2.1 La variabilité inter-espèces concernant les récepteurs macrophagiques : TLR, FcγR et récepteurs lectine de type C

La reconnaissance par les macrophages peut faire intervenir des récepteurs différents selon les espèces. Par exemple, l'implication de TLR (Figure 15) distincts, pour *L. braziliensis* et *L. donovani* il s'agit du TLR-2 (113,114), et pour *L. amazonensis* ou *L. major* plutôt de TLR-4 (115,116), pour ce qui est de la reconnaissance directe du promastigote non opsonisé. Le TLR-9 est responsable d'une réponse immune parasiticide mais la liaison du LPG de *L. major* sur le TLR-2 entraîne une diminution du TLR-9, médiée par une production de transforming growth factor (TGF)-β et d'IL-10, favorisant la persistance du parasite (117). Au contraire, la liaison de *L. major* à TLR-4 serait plutôt en faveur d'une infection résolutive par induction d'iNOS et production de NO (116).

Un autre exemple est l'affinité plus importante des promastigotes du complexe *mexicana*, telle que *L. mexicana* et *L. amazonensis* (25,26,118), pour le FcγRI que pour le CR3,

aboutissant à la formation de grandes vacuoles parasitophores dans lesquelles se trouvent plusieurs parasites. A l'inverse, pour *L. chagasi* ou les autres espèces (la plupart), qui favorisent une entrée par le CR3, la vacuole parasitophore sera plutôt petite et ajustée autour de chaque parasite (119).

Et enfin, Vázquez-Mendoza montrent aussi des différences selon l'espèce concernant les récepteurs lectine de type C : *L. infantum* serait plutôt reconnu par DC-SIGN alors que *L. donovani* serait plutôt reconnu via MRC-1 (120).

1.1.7.2.2 Implication de protéines de l'inflammation, CRP et fibronectine

Comme décrit plus haut, la fibronectine ou la CRP peuvent opsoniser les promastigotes et les amastigotes par l'intermédiaire de la GP63. Les parasites ainsi opsonisés se lient aux macrophages par l'intermédiaire du récepteur à la fibronectine (121) ou du récepteur à la CRP (Figure 15). Il semblerait également que la GP63, qui a le même poids moléculaire que la fibronectine, puisse se lier directement au récepteur à la fibronectine (122).

1.1.7.2.3 Implication du cholestérol

Le cholestérol membranaire semble également jouer un rôle fondamental pour l'entrée des promastigotes non-opsonisés puisque la cyclodextrine ou la nystatine, qui fixent le cholestérol, empêchent l'entrée de promastigotes de *L. donovani* ou *L. chagasi* (123). Par ailleurs le cholestérol est nécessaire à la présentation des antigènes parasitaires pour la mise en place de la réponse immunitaire adaptative (124,125).

Lors de la reconnaissance des promastigotes par les macrophages le LPG entraîne le recrutement de radeaux lipidiques au niveau de la zone d'interaction membrane-membrane, en modifiant le métabolisme du céramide (Figure 15). Les radeaux lipidiques sont riches en cholestérol et stabilisés par le céramide. Le cholestérol cytoplasmique est alors recruté pour assurer cette surproduction de radeaux lipidiques. Ceci entraîne une baisse du niveau de cholestérol intracytoplasmique aboutissant à une migration du cholestérol libre membranaire vers le cytoplasme. Cette diminution du cholestérol libre membranaire se traduit par une augmentation de la fluidité membranaire qui est néfaste à la présentation des antigènes par le CMH (Figure 17) (125,126).

1.1.7.2.3 Récepteur d'entrée des amastigotes

Concernant la phagocytose des amastigotes, qui intervient secondairement, après les premières étapes d'infection par les promastigotes et de multiplication intracellulaire, il existe également des divergences en fonction de l'espèce de leishmanie. Les amastigotes de *L. major*, comme pour les promastigotes, utilisent l'opsonisation par le complément comme voie d'entrée, en favorisant l'interaction avec le CR3 favorable à la persistance du parasite (112,127), alors que *L. mexicana* sécrète de grandes quantités de protéophosphoglycane, qui vont se fixer sur la MBP et empêcher l'opsonisation par le C3 (Figure 15) (112), pour favoriser plutôt l'entrée via l'opsonisation par les IgG (118,127,128).

La paroi des amastigotes ne contient que peu de LPG et de GP63, l'entrée de ces parasites fait donc intervenir d'autres mécanismes. En plus de l'opsonisation par le complément et la fibronectine, les amastigotes vont également être opsonisés par des IgG1, permettant leur entrée via les CR, le récepteur à la fibronectine et le FcγR (Figure 15) (118,127,129,130). Les phospholipides du glycoinositol (GIPLs) présents en grande quantité à la surface des

amastigotes jouent un rôle dans l'entrée des amastigotes dans les macrophages. En effet, des anticorps anti-GIPLs empêchent l'entrée dans le macrophage, mais le récepteur macrophagique impliqué dans la reconnaissance des GIPLs n'est pas encore connu (131).

1.1.7.2.4 Devenir des promastigotes après internalisation dans les vacuoles

Une fois dans les phagosomes, les parasites induisent (initialement) la fusion avec les lysosomes, ce qui permet la constitution de la vacuole parasitophore, dans laquelle les promastigotes se transforment en amastigotes en raison du pH acide et de la température. En effet, les amastigotes sont acidophiles et leur développement est idéal à un pH entre 4 et 5,5. Le récepteur reconnaissant le parasite va également accélérer (MRC-1) ou ralentir (CR3 ou FcγR) la fusion des vacuoles de phagocytose avec les lysosomes (110,132), et ainsi permettre une durée de vie plus ou moins longue du parasite sous la forme promastigote. Chez *L. donovani*, un processus de séquences d'échanges puis d'éloignements entre le promastigote et le phagolysosome de type « kiss and run » se met en place, retardant la fusion des lysosomes (101).

Lors de l'endocytose, le LPG est responsable d'une inhibition de la PKC-α qui se traduit par une accumulation de l'actine F au niveau de la vacuole d'endocytose (Figure 17). Cette protéine initialement indispensable au déplacement des vacuoles doit normalement disparaître au cours de l'évolution de la vacuole d'endocytose, toutefois, la persistance de l'inhibition de la PKC par le LPG entraîne sa persistance et, par sa présence, elle bloque l'assemblage de la NADPH oxydase (Figure 17).

Dans un modèle d'infection de macrophages de la lignée THP-1 par *L. donovani*, l'endocytose des promastigotes est suivie d'un recrutement de marqueurs d'endosomes précoces comme Rab-5 ou EE1, via une voie dépendante de la dégradation de c-Jun par la GP63 parasitaire (133). Le recrutement de marqueurs d'endosomes tardifs comme Rab-7 et LAMP-1 était jusqu'à présent décrit comme retardé (97,134), permettant aux parasites de bloquer la différenciation de la vacuole d'endocytose au stade d'endosome. Cependant Verma *et al.* ont montré, sur THP-1, plutôt un recrutement de LAMP-1 associé au recrutement de Rab-5, cette association de marqueurs précoces et tardifs pouvant expliquer le blocage de maturation des vacuoles parasitophores au stade intermédiaire de phagolysosome, ayant déjà un pH acide mais encore peu d'enzymes lysosomales.

En plus du recrutement de marqueurs d'endosomes, lors de la transformation en amastigotes, les parasites libèrent leur LPG qui va s'insérer dans les membranes des vacuoles d'endocytoses (Figure 17), mais également dans la membrane plasmique des macrophages, ce LPG membranaire inhibe l'action des lymphocytes cytotoxiques sur les macrophages infectés (135).

En plus de son implication pour l'entrée des promastigotes non-opsonisés, le cholestérol intervient également au niveau des vacuoles parasitophores. En effet, les vacuoles contenant les promastigotes de *L. (i) chagasi* sont doublées de cavéoles, micro-domaines riches en cholestérol et en cavéoline-1, retardant la fusion avec les lysosomes jusqu'à 48h permettant la transformation en amastigote dans la vacuole d'endocytose (97,132,136).

Au total l'interaction initiale puis l'entrée des parasites dans les macrophages intervient par le biais de différents mécanismes peu pro-inflammatoires ou silencieux, laissant présager dès l'entrée un potentiel impact sur la réponse immune (137).

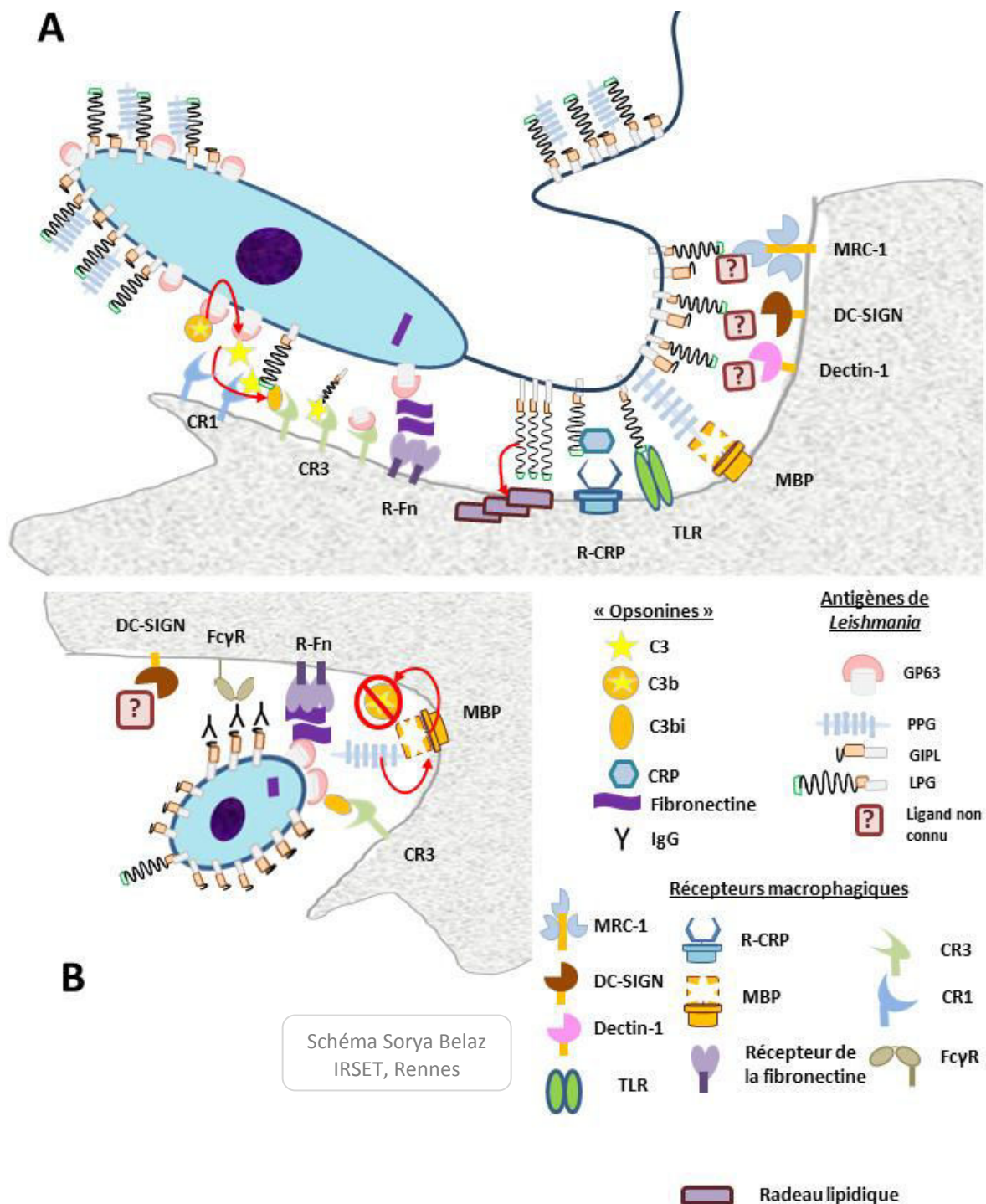


Figure 15 : Interaction promastigote-macrophage (A) et amastigote-macrophage (B)

1.1.7.3 Réponse immune efficace et mécanismes d'échappement des leishmanies

1.1.7.3.1 La réponse immune

La réponse classique des macrophages aux pathogènes intracellulaires est pro-inflammatoire, avec sécrétion de facteurs chémo-attractants comme MIP-1 β ou CCL2, et de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-12) (138). Cet état pro-inflammatoire entraîne une cascade aboutissant à la production d'espèces réactives nitrées et de l'oxygène, c'est le burst oxydatif permettant la résolution de l'infection (139–141).

En parallèle de l'immunité innée, le transport de DC dans les ganglions de drainage du site de la piqûre active la réponse immune adaptative. Tout d'abord, les DC dégradent les peptides parasitaires et les expriment à la surface liés aux molécules du CMH-II, associé à la production des molécules nécessaires à la co-stimulation des lymphocytes T (CD80, CD40, CD86) (Figure 16). Le complexe antigène-CMH II est reconnu par les récepteurs des lymphocytes T (TCR) CD4+ ; une activation des lymphocytes a alors lieu dans le ganglion entraînant ensuite une expansion de la population lymphocytaire (Figure 16) (142).

Les lymphocytes T CD4+ activés activent en retour les macrophages, par production d'Interféron- γ (IFN- γ) (Figure 16). L'activation via le CMH II est indispensable à la clairance parasitaire (90). En effet, même si l'implication du CMH I entraîne la même cascade d'activation, un modèle de souris déficientes en lymphocytes T CD8+ a permis de prouver que cette voie n'est pas indispensable pour l'élimination des parasites (128).

La leishmaniose est une infection dont la réponse immune adaptative a été très étudiée et a permis de mettre en évidence le paradigme de la réponse lymphocytaire Th1 et Th2. En effet, la majorité des espèces de souris de laboratoire sont résistantes à l'infection. La réponse immune développée par ces souris, lors de l'infection, fait intervenir des lymphocytes de type Th1 sécrétant de l'IFN- γ en grande quantité (Figure 16) (144).

La différenciation des lymphocytes en lymphocytes Th1, efficaces pour la destruction des parasites, est déterminée dès la synapse immunologique entre les DC et les lymphocytes (145,146). Les différentes molécules de co-stimulation ont été étudiées sur des modèles de souris KO et par utilisation d'anticorps bloquants, et parmi CD28, CD27, CD30 et CD40, seul CD40 a montré son rôle indispensable dans la différenciation des lymphocytes vers la voie Th1 (147,148).

Cependant, l'injection d'IL-12 à des souris KO pour le CD40 permet de rétablir les capacités d'orientation vers la voie Th1 et le contrôle de l'infection (148). Cette cytokine, produite par les macrophages et par les DC (Figure 16) (149,150), est donc indispensable pour une réponse efficace contre le parasite. Tout d'abord, elle favorise l'orientation Th1 (151) (par activation de la production d'IFN- γ et répression de l'IL-4 via le facteur de transcription STAT 4 (152)), et ensuite elle active les lymphocytes natural killer (NK) (Figure 16) (153).

L'IFN- γ (produit par les lymphocytes) et l'IL-18 (produit par les macrophages) agissent comme cofacteurs de l'IL-12 ; L'IFN- γ en favorisant la production d'IL-1 β et la persistance des récepteurs à l'IL-12 à la surface des lymphocytes ; l'IL-18 en favorisant une orientation Th1 de la réponse lymphocytaire NKT (154–156).

Les lymphocytes Th1 agissent sur les macrophages, via la liaison d'un ligand de Fas (Fas-L) avec Fas (= CD95), qui déclenche un signal induisant l'apoptose des macrophages infectés (Figure 16); ceci est amplifié par l'IFN- γ , qui augmente l'expression de Fas par les macrophages (157).

D'autre part, les lymphocytes Th1 peuvent activer les propriétés microbicides des macrophages par production des RNS (dont le NO). La production de NO est stimulée par l'IFN- γ (produit par les lymphocytes Th1 et NK) et le TNF- α (produit de façon autocrine par les macrophages), qui activent la NO-synthase inducible (iNOS) (Figure 16). Les ROS font également partie des effecteurs parasitocides du macrophage (111,140,158). A la différence des RNS, les ROS ne sont pas indispensables pour l'élimination des parasites. En effet, dans des modèles de souris KO ne produisant pas de ROS (souris GP91 phox -/-), la clairance parasitaire est retardée mais possible, alors que dans le modèle ne produisant pas de NO (iNOS -/-) il n'y a pas de clairance parasitaire (159,160).

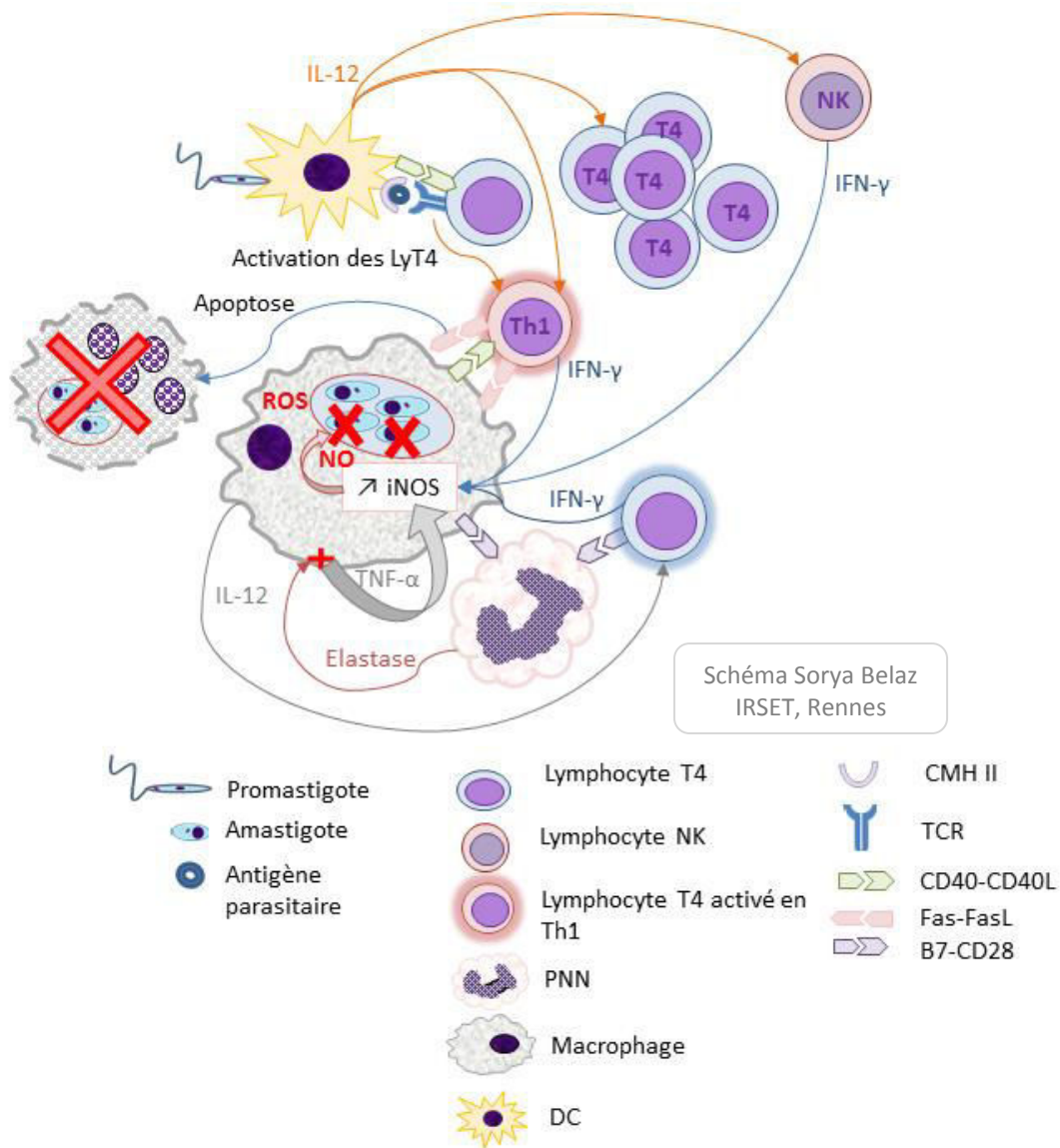


Figure 16 : Réponse immunitaire anti-leishmanienne

1.1.7.3.2 Les mécanismes d'échappement des promastigotes

Les parasites ont néanmoins des stratégies d'échappement, via les GIPLs, le LPG et la GP63, qui peuvent agir pour empêcher le burst oxydatif et orienter la réponse lymphocytaire vers une réponse Th2 (161) favorable à la persistance du parasite au sein du macrophage.

1.1.7.3.2.1 *Inhibition de la production des effecteurs anti-leishmanies ROS et NO*

De façon mécanique, mais aussi par inhibition de la PKC, le LPG des promastigotes métacycliques peut bloquer la production des ROS (action mécanique de l'épaisseur du LPG qui piège les ROS et inhibition de la PKC entraînant la persistance de l'actine F au niveau des vacuoles parasitophores empêchant l'assemblage de la NADPH oxydase) (Figure 17) (112,162,163). Le LPG et les GIPLs inhibent la production de NO via l'inhibition de la PKC (112,160).

Une fois internalisée, la GP63 active les tyrosines phosphatases SHP-1 et TCPTP. Ces enzymes inhibent différentes kinases (JAK, MAPK et IRAK) aboutissant à la diminution d'activation de facteurs de transcription (nuclear factor (NF)- κ B, STAT1), et de ce fait à une baisse de la production de NO, de TNF- α et d'IL-12 (Figure 17) (164). En plus de cette activité sur les macrophages, la GP63 peut être sécrétée, et sous cette forme elle agit sur les lymphocytes T CD4+ et sur les NK, qui alors produisent moins d'IFN- γ , favorisant une réponse Th2 et non Th1 (Figure 17) (164).

Une autre protéine parasitaire la kinetoplastid-membrane protein 11 (KMP-11) peut agir de façon compétitive dans la production de NO. En effet, KMP-11 a une structure proche de la L-arginine qui est le substrat d'iNOS, et agit comme un analogue compétiteur sur cette enzyme (30). Dans les vacuoles parasitophores, les parasites peuvent également sécréter une superoxyde dismutase (SOD) capable de neutraliser les ROS (165).

L'entrée de parasites opsonisés par la fibronectine via le récepteur à la fibronectine est associée à une diminution de la survie des parasites intramacrophagiques par activation de l'assemblage de la NADPH oxydase (110,166). Toutefois, la GP63 peut dégrader la fibronectine chez les amastigotes et les promastigotes de plusieurs espèces de leishmanies (130), permettant de diminuer cette voie d'entrée aboutissant à la production de ROS et donc peu favorable.

1.1.7.3.2.2 *Modification de la réponse cytokinique et de l'orientation Th1 de la réponse*

En plus de ces modifications concernant la réponse efficace avec production de NO et des ROS, les leishmanies peuvent agir pour orienter la réponse lymphocytaire vers une réponse Th2. Pour cela, *L. donovani* va surtout entraîner une augmentation de la production d'IL-10, alors que *L. major* ou *L. mexicana* vont surtout agir en stimulant la production d'IL-4 (161).

Comme on l'a vu, selon les récepteurs impliqués dans l'interaction hôte-parasite, la réponse cellulaire peut différer. La reconnaissance du flagelle par Dectin-1, MRC-1 ou le récepteur de la fibronectine active plutôt l'assemblage de la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogène (NADPH) oxydase et l'afflux d'enzymes lytiques dans le phagosome (110), conditions défavorables au parasite. Lefèvre et al. ont ainsi montré que l'entrée des promastigotes via dectin-1 ou MRC-1 entraîne une augmentation de la

production des ROS médiée par Syk (111,167) et une augmentation de la production d'IL-1 β via l'activation de la caspase 1, permettant l'élimination des parasites. Au contraire, l'entrée via DC-SIGN (ou son homologue murin SIGNR3) entraîne une inactivation de la caspase 1, et donc une diminution de la production d'IL-1 β , favorable à la persistance des parasites dans le macrophage.

A la différence de la reconnaissance par MRC-1, la reconnaissance du flagelle via CR3, favorisée par la GP63 des promastigotes, est peu pro-inflammatoire par inhibition de la production d'IL-12 (Figure 17) et ne favorise ni l'assemblage de la NADPH oxydase ni le burst oxydatif, et permet donc aux parasites de survivre et de se multiplier dans le macrophage par un mécanisme d'inhibition de PKC (par le LPG) et d'inhibition de la production d'IL-1 β (par la GP63) (168–171).

Dans un modèle de macrophages humains issus de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), la phagocytose de promastigotes opsonisés par la CRP entraîne aussi une production réduite des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-12, comparée à la production obtenue suite à la stimulation des macrophages par la CRP associée à du lipopolysaccharide (LPS) (100), mais identique à celle obtenue après phagocytose de promastigotes non opsonisés par la CRP. Ce mode d'entrée n'entraîne donc pas de modification (favorables ou non) sur la suite de la réponse immunitaire induite par les parasites (100).

Enfin, les promastigotes peuvent inhiber l'expression des molécules du CMH I et II, empêchant l'initiation de la réponse adaptative Th1 nécessaire à la clairance parasitaire (Figure 17) (172,173), ou agir plus tardivement par inhibition du couplage des antigènes du promastigote sur le CMH. Les antigènes sont alors intégrés dans la vacuole parasitophore, voire dans les amastigotes, et dégradés par les protéases macrophagiques et parasitaires (174). Les antigènes de l'amastigote sont quant à eux protégés contre la dégradation et le couplage au CMH par leur localisation intra-phagolysosomale (175).

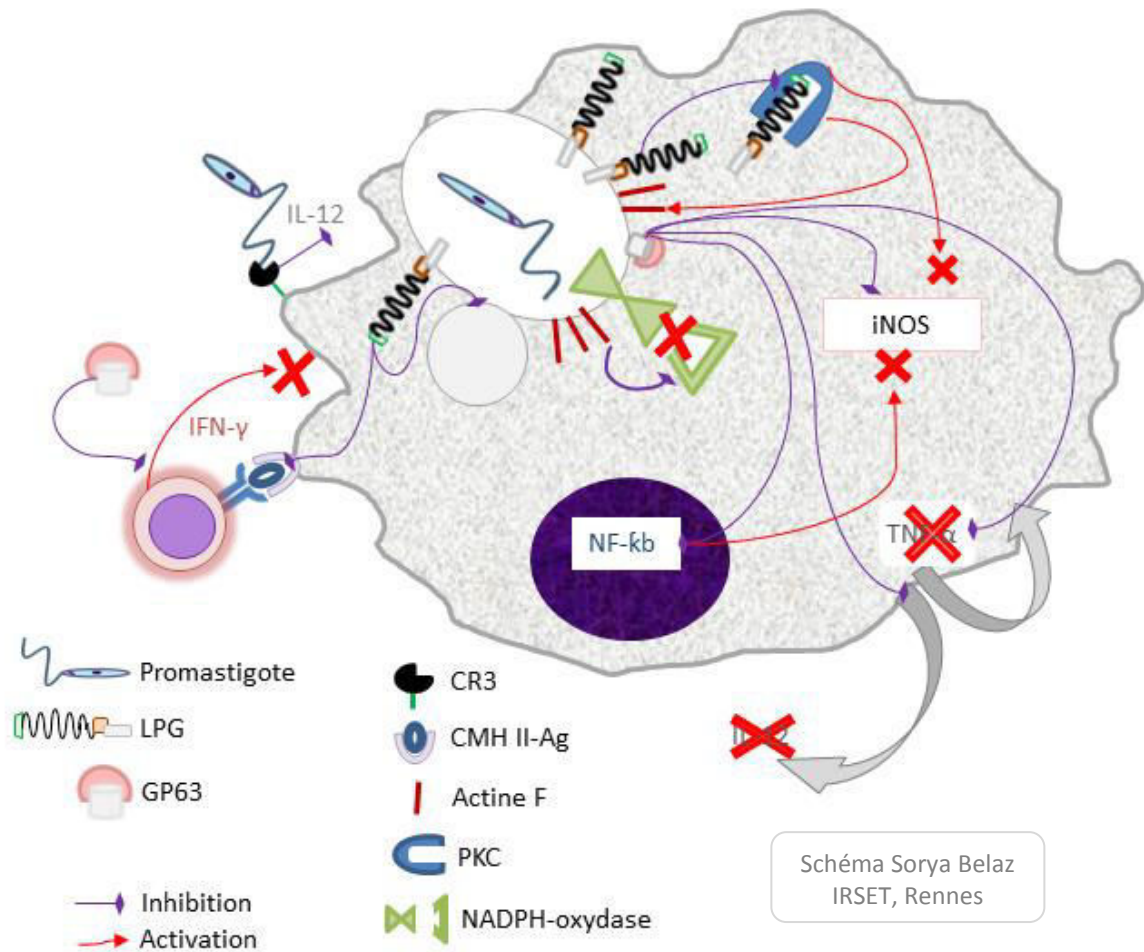


Figure 17: Mécanisme d'échappement mis en œuvre par les promastigotes

1.1.7.3.3 Les mécanismes d'échappement des amastigotes

Concernant les amastigotes, la reconnaissance via CR3 est également suivie d'une production réduite de TNF- α (176). De plus les GIPLs, très abondants sur la paroi des amastigotes, inhibent la production de TNF- α , d'IL-12 et de NO et stimulent la production de cytokines anti-inflammatoires Th2, l'IL-10 et le TGF- β (30,112,150,160,177). Par ces différentes actions, les GIPLs inhibent la production de NO et favorisent donc la survie au sein des vacuoles parasitophores (178). Lors de l'infection naturelle (à l'exception des promastigotes du complexe *mexicana*) seuls les amastigotes sont reconnus par Fc γ R lorsqu'ils sont opsonisés par des IgG : ce mode d'entrée oriente vers une production d'IL-10 et une répression de la production d'IL-12 (179).

Au total, l'immunité efficace contre les leishmanies nécessite l'activation de lymphocytes Th1 produisant de l'IFN- γ , permettant la clairance parasitaire par production d'IL-12, d'IL-18 et de TNF- α par les macrophages, et par action des RNS et des ROS dans les macrophages (Figure 18), ou encore par apoptose des macrophages infectés. Les leishmanies, quant à elles, mettent en place des mécanismes d'échappement à toutes les étapes de cette réponse, en orientant vers une différenciation Th2 des lymphocytes, une production des cytokines anti-inflammatoires IL-10 ou IL-4 et TGF- β , et une inhibition des cytokines pro-inflammatoires, en particulier l'IL-12, de la production des ROS et de l'induction d'iNOS, permettant la persistance parasitaire grâce à un état de tolérance immune (Figure 18) (180).

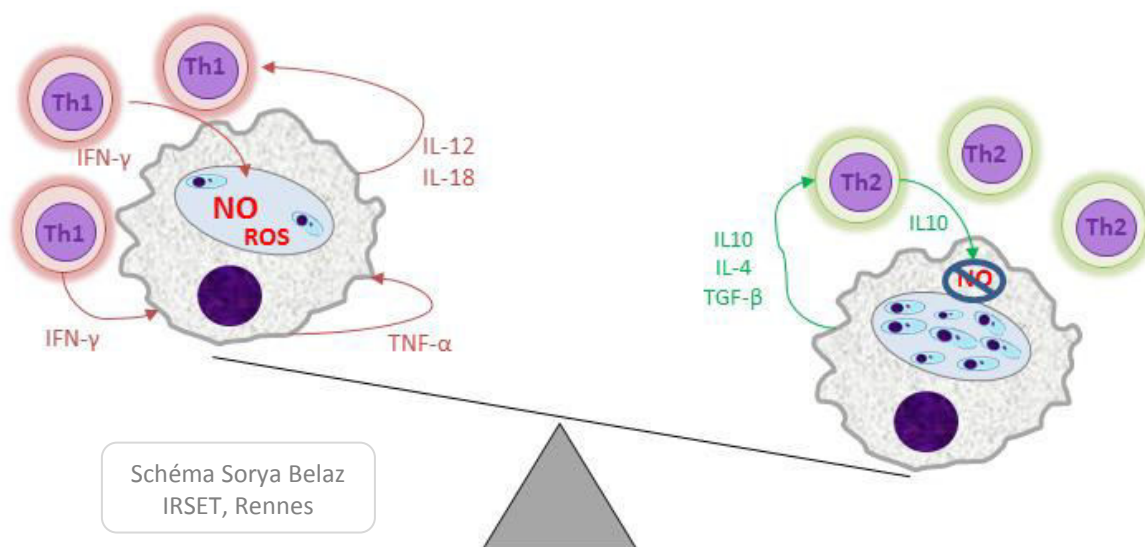


Figure 18 : Balance entre la réponse immunitaire et les mécanismes d'échappement des leishmanies

1.2. La paroi, facteur de virulence des leishmanies

La surface des leishmanies est recouverte d'un glycocalyx qui peut varier selon le stade parasitaire mais également selon l'espèce (181,182). Le constituant majeur de cette paroi pour le stade promastigote est le LPG, présent sur l'ensemble de la surface parasitaire y compris le flagelle (183,184) alors que ce sont les GIPLs qui sont majoritaires sur la paroi des amastigotes.

1.2.1 Les glycoconjugués de la paroi

1.2.1.1 Le LPG

Le LPG est composé de 4 domaines (

Figure 19): un domaine d'ancrage membranaire constitué d'un phosphatidylinositol, un cœur hexasaccharidique conservé entre les différentes espèces de leishmanies, puis une séquence phosphoglyquée comprenant un motif oligosaccharidique répétitif (mannose-galactose-phosphate) sur lequel peuvent s'insérer des chaînes latérales variables selon les espèces, et enfin une coiffe saccharidique, elle aussi variable selon les espèces de leishmanies (Tableau 3) (185). La structure du LPG et les variations de motifs pour *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* et *L. chagasi* sont présentées dans le Tableau 3.

La synthèse du LPG fait intervenir différentes enzymes, dont l'une en particulier, LPG1, a fait l'objet de construction de mutants LPG1^{-/-} afin d'obtenir des parasites dépourvus de LPG. La LPG1 et ses dérivées sont des glycoprotéines transmembranaires de type II, avec un court domaine intracytoplasmique N terminal et un domaine C terminal intra luminal incluant le motif D-X-D, très conservé parmi les glycosyltransférases, responsable de l'activité catalytique (186).

Le LPG est le glycoconjugué majoritaire de la paroi des promastigotes qui en sont totalement recouvert, flagelle inclus. La paroi des amastigotes, en revanche, présente très peu de LPG, mais ce glycoconjugué est tout de même présents chez tous les amastigotes (Figure 21), hormis les amastigotes des espèces du complexe *mexicana*.

Tableau 3 : Exemple de structures du LPG pour différentes espèces de leishmanies de l'ancien monde et du nouveau monde adapté de De Assis 2012 et de Mc Conville 1995

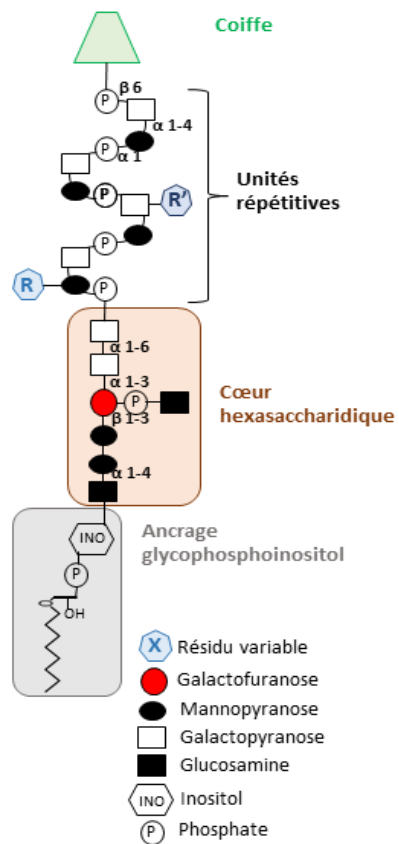


Schéma Sorya Belaz
IRSET, Rennes

	<i>L. donovani</i> (187)	<i>L. major</i> (188)	<i>L. tropica</i> (181)	<i>L. aethiopica</i> (181)	<i>L. mexicana</i> (189)	<i>L. chagasi</i> (190)	<i>L. braziliensis</i> (191)		
	méta	méta	méta	méta	méta	pro	méta	pro	méta
Coiffe	Galp-Manp [Manp] ₁₋₂ Manp Manp[Galp]Manp	Galp-Manp Manp-Manp	Galp-Manp [Manp] ₁₋₂ Manp Manp[Galp]Manp	Galp-Manp [Manp] ₁₋₄ Manp	Manp-Manp Manp-Manp-Manp Manp[Galp]Manp	Galp-Manp Glu-Galp-Manp	Glu, Galp et Manp¥		
R'	-H	-H	-H	-H	-H	-Glu	-H	-H	-Glu-Glu
(Abondance relative, %)		(13%) -Ara-Galp (60%) -Ara-Galp-Galp (8%) -Ara-Galp-Galp-Galp (1%) -Glu (1%)	(1%) -Ara-Galp (21%) -Ara-Galp-Galp (2%) -Ara-Glu (45%) -Ara-Glu-Glu[Ara] (21%) -Galp-Glu[Ara] (4%) -Ara-Glu-Glu[Ara]-Glu (6%)	(94%) -Galp (2%) -Galp-Galp (2%)	(66%) -Glu (33%)	(66%) -H (33%)	(66%) -Glu (33%)	(40%) -Glu (33%) -H (27%)	
R	-H	-H	-H	-H	-H	-H	-H	-H	-H
(Abondance relative, %)				(65%) -Manp (35%)					

Galp : Galactopyranose ; Manp : mannopyranose ; Ara : Arabinose ; Glu : Glucose ; pro : promastigotes procycliques ; méta : promastigotes métacyclique ; ¥ : Ordre et proportion des 3 motifs inconnus

Figure 19 : Structure du LPG

1.2.1.1.1 Particularités structurales du LPG en fonction des espèces

Le nombre d'unités répétées dans la chaîne phosphoglyquée permet une variation de l'épaisseur du glycocalyx selon le stade parasitaire (Figure 21). En effet, bien que le stade promastigote procyclique présente le même niveau d'expression du LPG que le stade métacyclique, l'épaisseur du glycocalyx est d'environ 6 nm pour le stade procyclique et 12 nm pour le stade métacyclique (192). Par exemple, *L. chagasi* passe de 19 à 34 motifs répétés au cours de la métacyclogénèse (182). Pour certaines espèces, en plus de l'allongement du LPG, lors de la métacyclogénèse, il y a des modifications des chaînes latérales ou de la terminaison du LPG. *L. braziliensis* ajoute un motif glucose sur le galactopyranose des motifs répétés alors que *L. infantum* ne fait aucun ajout de chaîne latérale (

Figure 19 et Tableau 3) (182). Chez *L. major*, le nombre de répétitions d'oligosaccharides double et les chaînes latérales du LPG acquièrent une terminaison arabinose, expliquant la différence d'épaisseur entre le stade procyclique et métacyclique (193).

La reconnaissance du LPG par les anticorps CA7AE est dirigée contre le motif répété mannose-galactose-phosphate, or en présence d'un grand nombre de chaînes latérales, cette reconnaissance peut ne plus se faire. Cet anticorps peut donc être utilisé pour rechercher la présence de ces chaînes latérales. L'étude de la reconnaissance du LPG purifié de différentes souches de *L. amazonensis* par CA7AE a ainsi permis de mettre en évidence des variations de chaînes latérales entre différentes souches d'une même espèce (115).

1.2.1.1.2 Importance du LPG chez l'hôte insecte

Même si la relation est rarement stricte, chaque espèce de parasite est transmise par un hôte phlébotome privilégié (*Phlebotomus* dans l'AM et *Lutzomyia* dans le NM), car le LPG de chaque espèce s'est adapté aux particularités du tube digestif de son hôte (19,21). Par exemple, *L. major*, présente une spécificité d'hôte pour *Phlebotomus papatasi*.

La configuration du LPG au stade procyclique permet l'attachement des parasites au tractus digestif de l'hôte via des galectines ou des lectines de type S (20,194,195) qui sont laissées accessibles par le LPG procyclique mais deviennent masquées lorsque que le nombre d'unités oligosaccharidiques augmente ou que les chaînes latérales sont ajoutées (19,21,196) permettant au parasite de se détacher et d'être entraîné vers l'hôte mammifère lors du repas sanguin.

1.2.1.1.3 Importance du LPG chez l'hôte mammifère

Au stade métacyclique, la confirmation plus épaisse du LPG présente également un avantage, car elle permet, du fait de sa longueur, de protéger les parasites contre la lyse par le complément.

Les parasites mutants LPG1^{-/-} sont donc dépourvus de LPG et ont permis de montrer l'importance de cette molécule comme facteur de virulence des leishmanies. Cependant les mécanismes d'immunotolérance mis en place par les leishmanies se recouvrent, et ces parasites gardent une capacité infectieuse, en particulier via la résistance aux enzymes protéolytiques, l'entrée silencieuse dans les macrophages et l'inhibition de la production d'IL-12 et de NO (197).

L'importance du LPG dans la physiopathologie de l'infection par *Leishmania*, notamment en permettant une entrée dans la cellule aboutissant à une réponse immune tolérogène a été présentée dans la partie 1.1.5. En bref :

- Le LPG permet au promastigotes de résister à l'activité microbicide des NETs.
- Le LPG peut être libéré pour agir sur la réponse immune en étant exprimé à la surface des macrophages infectés.
- Le LPG permet une entrée après liaison aux C3b et C3bi, qui est une voie d'entrée « silencieuse » via les CR.
- Selon les espèces, les variations de LPG peuvent aboutir à des voies d'entrée très variées via CR principalement, mais aussi via FC γ R pour les espèces du complexe *mexicana*.
- Le LPG limite la fusion vacuoles d'endocytose-lysosomes, permettant aux vacuoles parasitophores de rester figées à un stade intermédiaire dans lequel les promastigotes peuvent se transformer en amastigotes sans être détruits.
- Le LPG inhibe la PKC, empêchant l'assemblage de la NADPH oxydase et donc le burst oxydatif.
- Le LPG stimule la production de céramide pour former des radeaux lipidiques ce qui aboutit à une migration du cholestérol membranaire vers le cytoplasme. Cette défection du cholestérol membranaire entraîne une diminution des capacités de présentation des antigènes par les macrophages.

1.2.1.2 Les phospholipides de glycoinositol (GIPLs)

Les GIPLs sont de petits phospholipides très largement exprimés chez tous les eucaryotes en particulier les promastigotes et les amastigotes de leishmanies (Figure 21). Ils permettent l'ancrage à la membrane du LPG mais aussi des GP membranaires. Leur structure associe un alkylacylglycérol ancré dans la membrane, sur lequel est fixé un inositol, puis 2 motifs glucidiques, une glucosamine et un mannose (Figure 20) (182,198). Un à 6 éléments osidiques peuvent être liés au mannose, selon ces répétitions on distingue des GIPLs de type 1 riches en mannose, liés en α 1-6 sur le résidu mannose conservé (non présentés dans la Figure 20) ou des GIPLs de type 2 riches en galactose dont la liaison mannose-mannose initiale se fait en α 1-3, et enfin des GIPLs hybrides qui présentent un mannose branché en α 1-3 et en α 1-6. Les GIPLs de type 1 sont plutôt impliqués dans l'ancrage des GP membranaires (Figure 21) (et sont ubiquitaires dans les cellules eucaryotes), alors que les GIPLs de type 2 ou les GIPLs hybrides permettent la fixation membranaire du LPG (Figure 21) et sont surtout retrouvés chez les protozoaires (199). La série de motifs osidiques des GIPLs varie selon les espèces de leishmanies, mais dans tous les cas les GIPLs sont très abondants à la surface des promastigotes et des amastigotes. En effet, même si l'expression du LPG est très réduite chez les amastigotes, les GIPLs, quant à eux, sont synthétisés de façon aussi abondante dans les 2 stades de vie du parasite (Figure 21) (199).

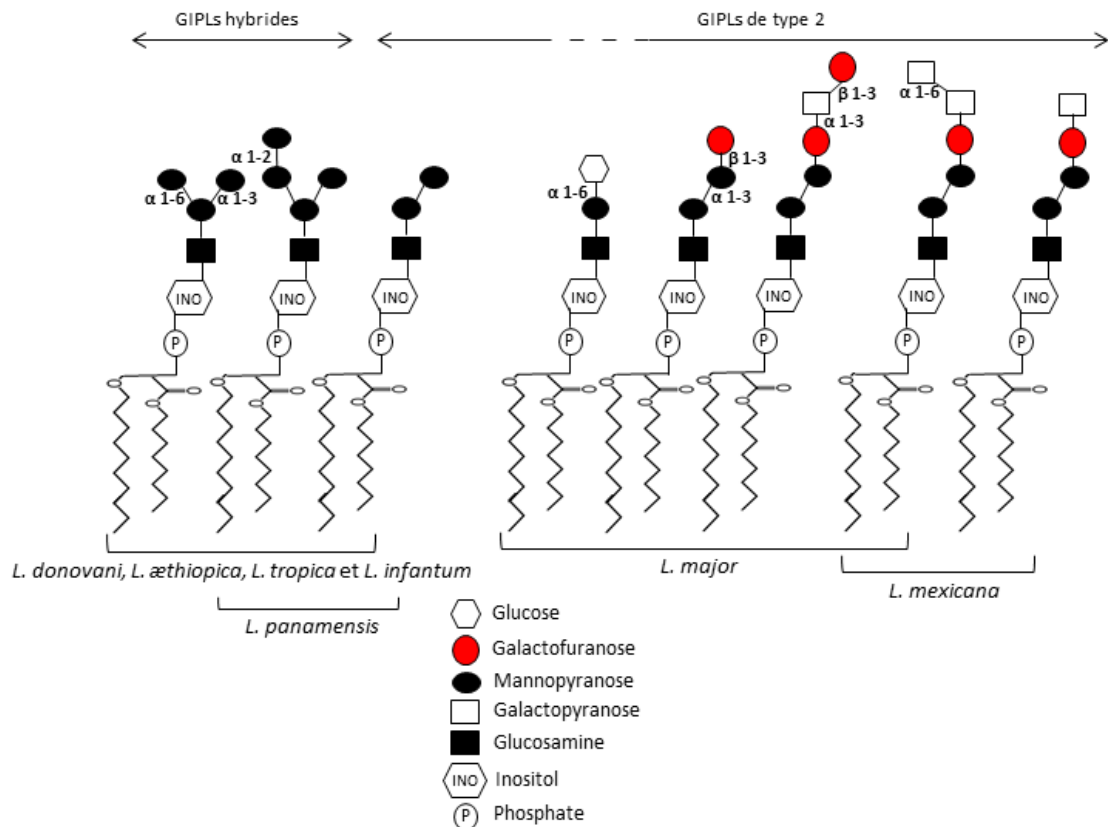


Figure 20 : Exemples de structures de GIPLs, adapté de Winter 1993 et de MC Conville 1993

Comme pour le LPG, les GIPLs peuvent être libérés de la surface des parasites et on les retrouve alors à la surface des phagosomes mais, à la différence du LPG, ils ne sont pas exprimés à la membrane plasmique des macrophages (198).

Comme précédemment décrit au paragraphe 1.1.7.2, les GIPLs interviennent dans l'entrée et les modifications de la réponse immune qui en découle et cela surtout pour les amastigotes qui entrent dans les macrophages via FcγR. En effet, le rôle des GIPLs chez les promastigotes métacycliques est limité par leur masquage par le LPG à ce stade.

1.2.1.3 La Major Surface Protein : GP63

La GP63 est une métallo-protéase anciennement dénommée Major Surface Protein (MSP). Elle est exprimée à la surface des leishmanies mais peut également être sécrétée ou se localiser au niveau du réticulum endoplasmique. Cette glycoprotéine est fortement exprimée au niveau de la paroi des promastigotes (Figure 21), y compris au niveau du flagelle (200), alors qu'elle est exprimée beaucoup plus faiblement et se localise uniquement au niveau de la poche flagellaire à la surface des amastigotes (Figure 21) (201).

Elle peut être en partie sécrétée ou clivée, et ainsi libérée, d'une part dans le milieu extracellulaire, et d'autre part dans le cytoplasme des macrophages (164). Malgré son masquage par le LPG au niveau de la paroi des promastigotes métacycliques, cette partie sécrétée permet à la GP63 de participer, avec le LPG, à la protection contre la lyse par le complément ou contre l'activité microbicide de NETs (88,164). La GP63 libre agit également en dégradant la matrice extracellulaire, ouvrant la voie pour le rapprochement des

promastigotes et des cellules phagocytaires (164). Un modèle de *L. major* déficient pour la GP63 a également permis de montrer le rôle de cette protéine dans la dégradation des peptides antimicrobiens agissant dans la matrice extra cellulaire (202).

Comme décrit dans le paragraphe 1.1.7.2, elle a une importance fondamentale dans l'attachement des promastigotes à certains récepteurs présents sur les membranes des macrophages comme le récepteur au mannose, le récepteur au fucose ou la fraction C3 du complément (200). Avec d'autres GP membranaires, comme la GP46 (ou PSA), elle joue un rôle dans plusieurs voies de signalisations (MAPK, JAK...) aboutissant au déclenchement d'une réponse immune toléro-gène.

1.2.1.4 Le protéophosphoglycane (PPG)

Il s'agit d'une protéine phosphoglycosylée, qui peut être présente au niveau de la membrane des promastigotes et des amastigotes (Figure 21) et dont l'épaisseur et les motifs présents dans les chaînes latérales varient selon les espèces et au cours du cycle parasitaire (203,204). Comme pour le LPG, les GIPLs ou la GP63, le PPG peut être sécrété par les parasites (Figure 21) (204).

Chez le vecteur, le PPG membranaire assure la protection des promastigotes procycliques contre les enzymes digestives de l'insecte (85,203). La forme sécrétée s'inclut dans le PSG qui entoure les parasites et peut modifier le comportement alimentaire du vecteur, en favorisant la régurgitation lors de la piqûre, libérant ainsi les parasites dans l'hôte mammifère (85). Le phlébotome doit alors multiplier ses repas sanguins pour ingérer suffisamment de sang, ce qui augmente le nombre d'hôtes mammifères contaminés (85).

Les amastigotes de *L. mexicana* n'expriment pas de LPG au niveau de leur paroi, mais le PPG de *L. mexicana* présente une structure beaucoup plus ramifiée que le PPG des autres espèces de leishmanies, il pourrait ainsi participer à l'entrée et à la survie des amastigotes de cette espèce dans les macrophages (204–206). Ce PPG intervient en particulier pour la création des vacuoles parasitophores géantes, qui sont la particularité des espèces du complexe *mexicana* (205).

1.2.1.5 Les phosphatases acides sécrétées

Ces enzymes sont les protéines les plus abondamment sécrétées par les promastigotes (Figure 21) (207,208). Comme le PPG, elles sont phosphoglycosylées de façon variable au cours du cycle et selon les espèces (205,209). Chez *L. donovani* il s'agit de monomères ou d'oligomères de phosphoglycoprotéines (210,211), alors que pour *L. braziliensis*, *L. amazonensis* et *L. mexicana* il s'agit de filaments de phosphoglycoprotéines. Dans ces espèces la longueur des phosphatases a plutôt tendance à augmenter au cours de la métacyclogénèse, alors que pour *L. infantum* elle est stable au cours du cycle (210,212).

Ces enzymes agissent en déphosphorylant différents substrats et en particulier l'inositol ou des protéines présentes dans le tube digestif des vecteurs. Ces substrats ainsi préparés servent ensuite de nutriments pour les promastigotes procycliques (206). Lors de l'infection de l'hôte mammifère, ces enzymes ont un rôle anti-protéolytique protégeant le parasite contre la lyse par les peptides antimicrobiens (207). Un modèle de *L. amazonensis* déficient pour ces protéines a permis de montrer qu'elles jouent un rôle primordial dans la constitution de la vacuole parasitophore (208).

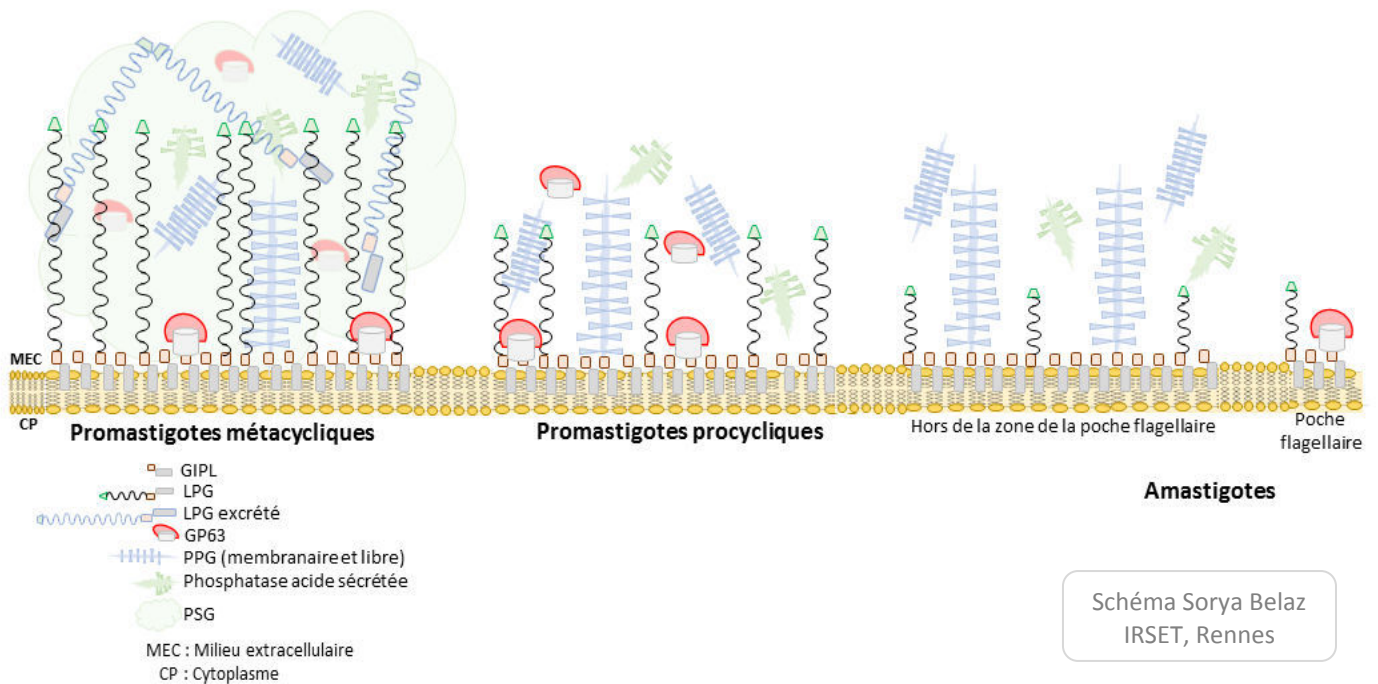


Figure 21 : Représentation schématique de la paroi des leishmanies aux 3 stades du cycle

1.2.2 Reconnaissance du LPG et des GPIPLs, quel est le motif reconnu ? Exemple de TLR2/TLR4

Même si de nombreux auteurs s'intéressent à la reconnaissance, du LPG ou des GPIPLs par les différents récepteurs membranaires du macrophage, les données concernant le motif reconnu au sein de ces glycoconjugués sont moins abondantes. Les TLR2 et 4 sont capables de reconnaître des motifs glyqués du LPG et des GPIPLs et TLR4 permet, via MyD88, de produire de l'IL-12, du TNF- α et du NO. Je me suis donc intéressée à la reconnaissance du LPG et des GPIPLs par les TLR2 et 4, pour essayer de repérer le motif particulier reconnu.

1.2.2.1 TLR et LPG

Ibraim *et al.* ainsi que Nogueira *et al.* ont montré que la production de NO après une stimulation par du LPG purifié (de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* et *L. chagasi*) était médiée par le TLR4 et que le TLR2 n'entraînait pas de production de cet effecteur anti-leishmanie (115,213). Cependant, dans ces modèles de macrophages péritonéaux de souris KO pour TLR2 ou TLR4, Ibraim *et al.* n'ont pas retrouvé de différence dans la production du NO induite après challenge par des parasites entiers (213) ce qui appuie une capacité de recouvrement des mécanismes d'entrée et de modulation de la réponse immune induits par les parasites.

La reconnaissance via les TLR existe également pour les lymphocytes, et Becker *et al.* ont montré l'importance de TLR2 dans la reconnaissance du LPG purifié de promastigotes métacycliques de *L. major* par les lymphocytes NK, puisqu'en présence d'un anticorps bloquant anti-TLR2, la production de TNF- α et d'IFN- γ était fortement réduite. Les auteurs n'ont cependant pas vérifié si le même phénomène était observé après un challenge par des

parasites entiers, en revanche, ils ont comparé l'effet du LPG purifié à partir de promastigotes procycliques et métacycliques.

A la différence du LPG « métacyclique », le LPG « procyclique » de *L. major* ne présente pas de chaînes latérales et il n'entraîne pas d'induction de la production d'IFN- γ et de TNF- α . Le motif particulier du LPG reconnu par les TLR n'est pas connu et les auteurs supposent que ce sont donc les chaînes latérales qui seraient reconnues par le TLR2. Ceci peut être vrai pour le stade métacyclique de *L. major* qui présente bien ces chaînes latérales branchées au niveau du galactose des unités répétées, mais, *L. donovani*, dont le LPG est aussi reconnu par TLR2, ne présente pas de chaîne latérale (187). La comparaison des LPG de *L. major* et *L. donovani* pourrait permettre de mettre en évidence le motif du LPG reconnu par TLR2. Seuls les motifs mannose-galactose et mannose-mannose de la coiffe semblent être communs à ces espèces ; ils sont retrouvés aussi chez *L. tropica*, *L. aethiopica* et *L. infantum* (190,192), et dans un modèle canin, Hosein *et al.* ont montré, par analyse transcriptomique multi-organes, l'importance de TLR2 dans la reconnaissance de *L. infantum* (avec un effet néfaste de TLR2 dont l'expression augmente en association avec l'immunotolérance et la persistance de l'infection). Ceci étaye l'hypothèse quant à la reconnaissance d'un motif de la coiffe par le TLR2.

1.2.2.2 TLR et GIPLs

De Assis *et al.* ont comparé l'importance de TLR2 et de TLR4 dans la réponse au LPG mais aussi aux GIPLs de *L. braziliensis* et de *L. infantum*. La stimulation par ces deux glycoconjugués entraîne une production équivalente de NO, mais les GIPLs induisent une plus grande production de TNF- α que le LPG. Ils montrent l'importance du TLR2 pour la production de NO suite à la stimulation par le LPG, mais plutôt du TLR4 concernant les GIPLs de ces 2 espèces. Passero *et al.* ont également montré qu'en comparaison avec le LPG, les GIPLs de *L. (Viannia) shawi* induisent une production accrue d'IL-12 et de TNF- α , induisant donc un profil plus pro-inflammatoire que le LPG. Cependant ils induisent également plus d'IL-10 (150), en accord avec nos résultats retrouvant une production accrue d'IL-10 après traitement par les Galf. Les GIPLs de *L. braziliensis* ne sont pas encore complètement caractérisés, ce sont des GIPLs de type 2 avec 8 à 9 résidus, mais le type de résidu et leur organisation reste à préciser (177). Ceux de *L. infantum* sont connus, ils ne contiennent pas de liaison galactose-mannose mais des liaisons mannose-mannose branchés en α 1-2, identiques à celles retrouvées dans la coiffe du LPG de *L. donovani* ou *L. major*. Ce motif pourrait donc être celui reconnu par les TLR2 et 4.

1.2.3 Un motif saccharidique d'intérêt : le galactofuranose

Le galactofuranose (Galf) est un monosaccharide entrant dans la composition de nombreuses molécules glyquées. Chez les leishmanies il est synthétisé à partir d'UDP-galactose.

Les leishmanies possèdent un transporteur membranaire permettant l'entrée de nombreux hexoses, dont le galactose, à partir du milieu extérieur (214). Le galactose internalisé va subir une phosphorylation par la galactose-kinase, pour donner du galactose-1-phosphate, qui va être couplé à une uridine-diphosphate (UDP) par l'UDP-sugar-pyrophosphorylase (USD) (en présence d'une uridine-triphosphate (UTP) et avec libération d'un diphosphate). Un UDP-galactose est ainsi obtenu par la réaction d'Isselbacher (Figure 22(b))(215).

En condition de stress nutritif, en l'absence de galactose, une autre voie de synthèse d'UDP-galactose est possible pour plusieurs espèces de *Kinetoplastidae*, dont les leishmanies (215,216). C'est la réaction de Leloir (Figure 22 (a)). En effet, le galactose est un épimère du glucose pour le groupement hydroxyle situé en C₄. L'action de l'UDP-glucose-4-épimérase permet d'obtenir l'UDP-galactose par épimérisation de l'UDP-glucose.

L'UDP-galactose est ensuite converti en UDP-galactofuranose par une UDP-galactopyranose-mutase (UGM) qui convertit le cycle de l'hexose en cycle à 5 carbones (217).

Les galactofuranosyl-transférases (GalT) interviennent ensuite pour l'insertion du galactofuranose dans les différentes molécules glyquées de la membrane (Figure 22 (c)) (215).

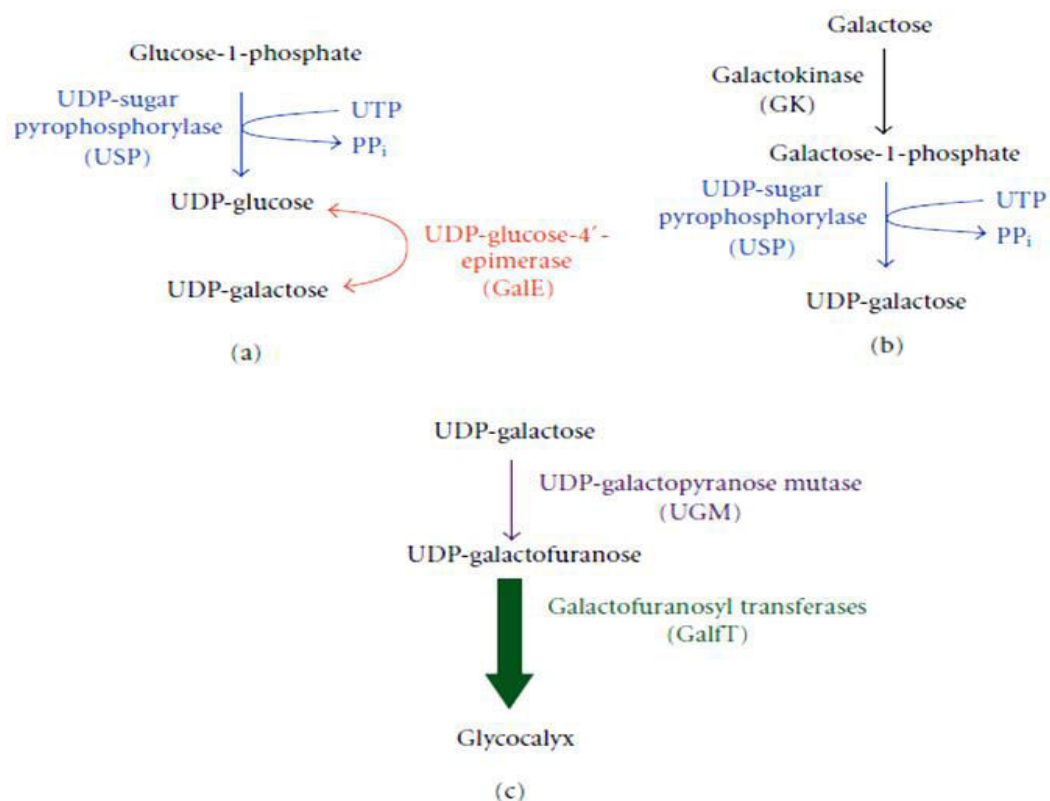


Figure 22 : Biosynthèse du Galactofuranose. D'après Oppenheimer, Damerow et Beverley

(a) Réaction de Leloir permettant d'obtenir l'UDP-galactose en présence de glucose

(b) Réaction d'Isselbacher

(c) Utilisation de l'UDP-Galf dans la biosynthèse du glycocalyx

Fait intéressant, le GalT est absent des membranes de mammifères, ainsi les enzymes intervenant dans la synthèse et l'incorporation du GalT sont également absentes chez les mammifères. Ces enzymes sont donc des cibles potentiellement intéressantes dans la recherche de nouveaux traitements contre les leishmanioses (215). Par ailleurs l'utilisation d'analogues du GalT a déjà montré que ces motifs sont reconnus comme du non soi et ont un potentiel immunomodulateur (131,218).

Article 1 : *Leishmania* cell wall as a potent target for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates

Yari Cabezas, Laurent Legentil, Florence Robert-Gangneux, Franck Daligault, Sorya Belaz, Caroline Nugier-Chauvin, Sylvain Tranchimand, Charles Tellier, Jean-Pierre Gangneux et Vincent Ferrières

Les caractéristiques de la paroi des leishmanies et en particulier l'implication des glycoconjugués ont été détaillés dans une revue écrite par Yari Cabezas à laquelle j'ai pu contribuer



Cite this: DOI: 10.1039/c5ob00563a

Leishmania cell wall as a potent target for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates

Yari Cabezas,^{a,b} Laurent Legentil,^{a,b} Florence Robert-Gangneux,^{†c,d} Franck Daligault,^e Sorya Belaz,^{c,d} Caroline Nugier-Chauvin,^{a,b} Sylvain Tranchimand,^{a,b} Charles Tellier,^{*e} Jean-Pierre Gangneux^{*†c,d} and Vincent Ferrières^{*†a,b}

Received 20th March 2015,
Accepted 18th June 2015

DOI: 10.1039/c5ob00563a

www.rsc.org/obc

Although leishmaniasis has been studied for over a century, the fight against cutaneous, mucocutaneous and visceral forms of the disease remains a hot topic. This review refers to the parasitic cell wall and more particularly to the constitutive glycoconjugates. The structures of the main glycolipids and glycoproteins, which are species-dependent, are described. The focus is on the disturbance of the lipid membrane by existing drugs and possible new ones, in order to develop future therapeutic agents.

^aEcole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, CNRS, UMR 6226, 11 Allée de Beaulieu, CS 50837, 35708 Rennes Cedex 7, France.

E-mail: vincent.ferrieres@ensc-rennes.fr; Tel: +33 223238051

^bUniversité européenne de Bretagne, France. E-mail: charles.tellier@univ-nantes.fr; Tel: +33 251125733

^cINSERM U1085-IRSET (Institut de Recherche en Santé Environnement et Travail), Université Rennes 1, Rennes, France. E-mail: jean-pierre.gangneux@univ-rennes1.fr; Tel: +33 223234490

^dCentre Hospitalier Universitaire de Rennes, Service de Parasitologie-Mycologie, Rennes, France

^eUniversité de Nantes, CNRS UMR 6286, UFIP, 2 Rue de la Houssinière, F-44322 Nantes Cedex 03, France

† These authors contributed equally to the article.

Introduction

Leishmaniasis is a protozoan parasitic disease endemic in 98 countries and is a public health concern in terms of controlling the transmission reservoirs, for the diagnosis and treatment of the 1 to 2 million patients infected annually. The five major endemic areas are India, Eastern Africa, Brazil, the Mediterranean basin and the Middle East, but the disease is present in all areas favourable to the development of its vector, the sandfly. *Leishmania* promastigotes, the flagellate stage of the parasite, develop in the sandfly gut and are transmitted



Florence Robert-Gangneux

Florence Robert-Gangneux is Professor of Parasitology and Mycology at the Faculty of Medicine of Rennes (University Rennes 1, France). She is a medical biologist who has graduated from University Paris V, and has worked formerly on MAPK kinases of *Toxoplasma gondii* during her PhD. She has special expertise in the field of immunological and molecular diagnosis of parasitic and fungal diseases. She is a member of two European networks

(Leishman and European Study Group in Clinical Parasitology). Her basic research now focuses on the interplay of the microenvironment and immune response to *Leishmania* parasites (IRSET-INSERM U1085), with special interest in the immunomodulatory or inhibitory properties of synthetic sugars mimicking the parasite surface.



Charles Tellier

Charles Tellier graduated in Biochemistry from the Ecole Normale Supérieure of Cachan in 1977. In 1980, he moved to the University of Nantes as an assistant professor to work on the biological applications of NMR and obtained a doctorat ès-Sciences in 1986. After a sabbatical year at Texas A&M University with Ian Scott (1989–1990), he started to work on catalytic antibodies and then in directed evolution for glycosidase engineering.

He became Professor of Biochemistry and Molecular Biology at the University of Nantes in 1992 and he is presently director of the laboratory of Functionality and Engineering of Proteins (University of Nantes/CNRS).

after a bite of their mammal host. In this host, the parasite has an obligate intracellular development as an amastigote stage in phagocytic cells, which are the target cells. The phenotype of infection depends not only on the parasite species, but also on the immune background of the host, leading to visceral, cutaneous or mucocutaneous leishmaniasis. Visceral leishmaniasis, due to *Leishmania donovani* and *L. infantum*, is the most severe form of the disease and is lethal without treatment. To date, few molecules are available for treatment and all these have significant drawbacks in terms of cost (liposomal amphotericin B), toxicity (antimonials, miltefosine, and liposomal amphotericin B), teratogenicity (miltefosine) or development of resistance (antimonials, miltefosine, paramomycin). Thus discovery of new drug targets is essential for mass treatment. Here we describe the peculiar structure of the *Leishmania* membrane which presents an external glycocalyx important for its interaction with the host, and review the mode of action of the few drugs targeting the parasite membrane. We also highlight potential metabolic pathways of specific glycolipids which could be targeted to open up new strategies for the development of new classes of anti-leishmanial drugs.

Characteristics of the *Leishmania* cell wall

The different stages of the parasite are characterized by morphological and structural changes correlated with molecular modulations of the glycocalyx. The related glycosylated compounds are generally anchored to the membrane by phosphatidylinositol (PI, in purple, Fig. 1 and 2) and complex glycoconjugates were clearly identified: small glycoinositol phospholipids (GIPL) with less than eight glycosidic units, lipophosphoglycan (LPG) which is a polymer of phosphorylated saccharidic units, glycoproteins and proteophosphogly-

cans (PPGs), proteins highly glycosylated by the same repetitive patterns as LPG.^{1,2} It is noteworthy that the composition and size of this coat will vary not only with species, but also with the stage of development of the parasite (Fig. 3),³ as it reaches 6 nm in procyclic promastigotes and up to 12 nm for metacyclic ones,⁴ and it is extremely reduced in amastigotes.⁵

Lipophosphoglycan (LPG)

LPG is the major glycoconjugate in promastigotes, covering its surface as well as its flagellum. It consists of four domains: a 1-O-alkyl-2-lyso-phosphatidyl-myo-inositol lipid anchor, a hexasaccharide core, a repeating unit [$\rightarrow 6$]- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Manp-(1-O-PO₃)⁻], which can be substituted with side chains depending on the species, and an oligosaccharidic cap, whose composition also varies (Fig. 4).¹ While the first three domains are conserved among all *Leishmania* species, differences in the lateral substitution and the cap are found to be adapted to sandfly species.^{6,7} The LPG firstly ensures attachment of the parasite, probably through interactions with specific lectins, to the digestive tract of the insect so it is not dragged along with the blood meal.⁶⁻⁸ Moreover, it probably contributes to protection against the digestive enzymes of the vector. Between procyclic promastigote and metacyclic promastigote, the number of repetitive units grows from 15 to about 30,⁹ thus increasing the thickness of the glycocalyx. It is likely that the resulting conformational changes induce the variation of host-guest interactions and so migration of metacyclic parasites to the anterior midgut.⁶ Further contributions involving glycosylation were also identified to complement this activity: *L. braziliensis* adds β -(1 \rightarrow 3)-D-Glcp to the LPG,^{10,11} *L. infantum* removes side chains,^{10,12} and *L. major* substitutes terminal galactose residues by β -D-(1 \rightarrow 2)-Arap ones.¹³ Secondly, a dramatic increase



Jean-Pierre Gangneux

Jean-Pierre Gangneux is Professor of Medicine, specializing in parasitology and mycology, at the Rennes Teaching Hospital and Rennes 1 University. The main topic of his research is on the complex host-parasite interplay during *Leishmania* infection. He developed a research axis on *Leishmania* in UMR INSERM U1085 (IRSET - Université Rennes 1) and has published more than 100 articles in international and national journals.

He also has expertise in fungal infections due to *Candida* and *Aspergillus*.



Vincent Ferrières

Vincent Ferrières is Professor of Chemistry at the Rennes Graduate School of Chemistry. He did his PhD in Rennes with Prof. D. Plusquellec and his post-docs at Konstanz (Germany, Prof. Dr R. R. Schmidt) and Paris (Univ. Paris Descartes - Roussel Uclaf, Prof. J. C. Depezay). His present interest, along with Laurent Legentil (CNRS Researcher), Caroline Nugier-Chauvin, Sylvain Tranchimand and Loïc Lemiègre (Associate

Professors), is the synthesis of bioactive glycoconjugates according to both chemical and chemo-enzymatic approaches. The main molecular targets are rare glycofuranosyl-containing conjugates, and β -(1 \rightarrow 3)-glucans. The application fields are immunostimulation for alternative anti-cancer treatments, and anti-parasitic drugs fighting neglected diseases.

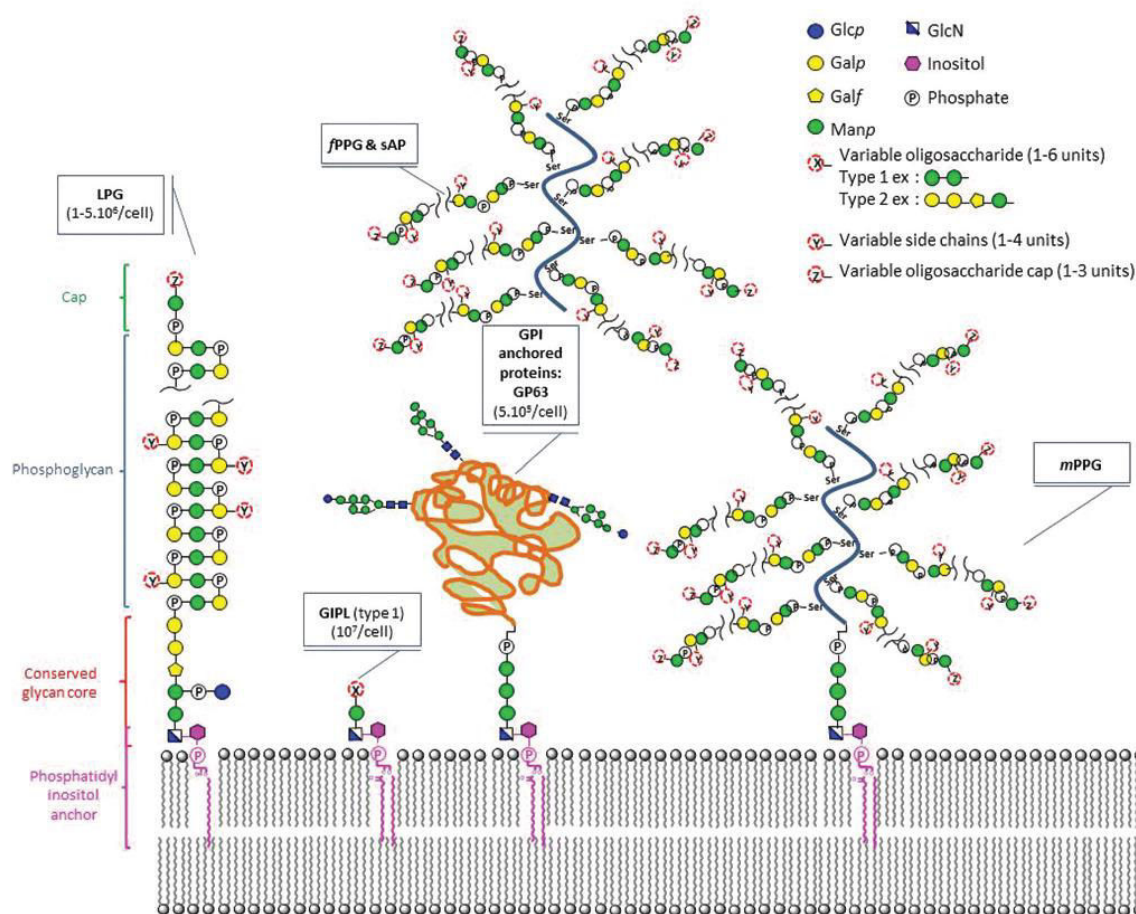


Fig. 1 Main glycoconjugates at the surface of leishmanial promastigote cells. Abbreviations: LPG: lipophosphoglycan; fPPG: filamentous proteo-phosphoglycans; mPPG: membrane proteophosphoglycans; sAP: secreted acid phosphatases; GPI: glycosylphosphatidylinositol; GIPL: glycoinositol phospholipids.

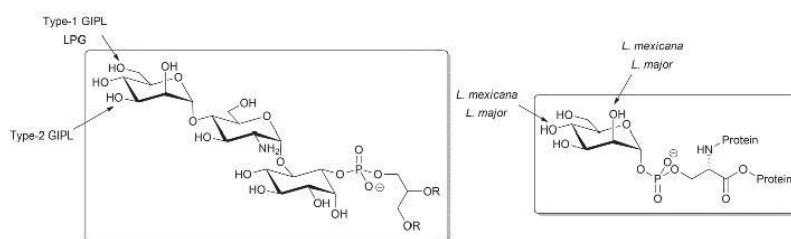


Fig. 2 Saccharidic skeletons for leishmanial glycoconjugates.

of superficial LPG, which was also shown to be lysis-resistant,^{14,15} from procyclic to metacyclic promastigote contributes to inoculation to the mammalian host.⁶

Secondly, the evolution from the procyclic to the metacyclic stage occurs simultaneously with a dramatic

increase of superficial LPG. This confers protection against complement-mediated lysis. Once this first hurdle has been passed, there comes the attachment phase and the internalization by macrophages. For this purpose, even if not essential, LPG helps a silent entry into macrophages thanks to

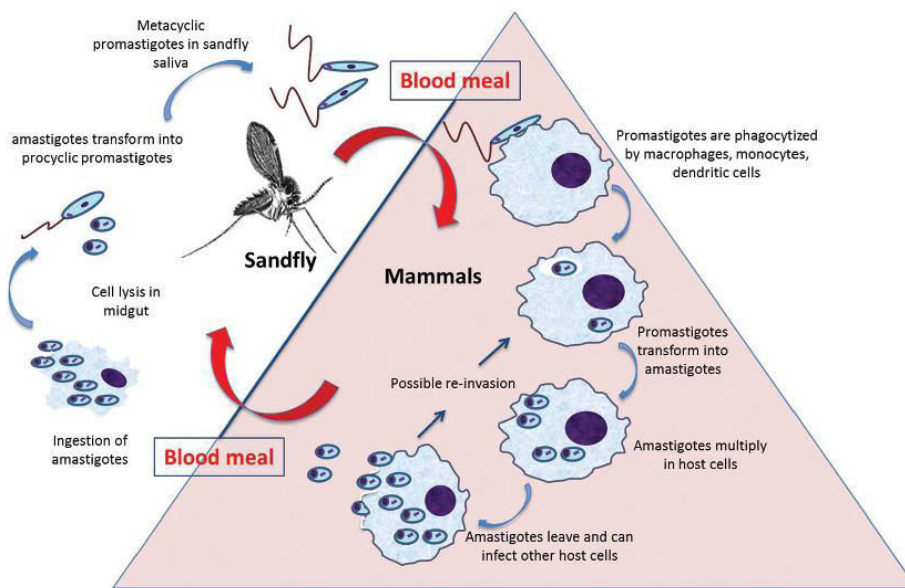


Fig. 3 Life-cycle of *Leishmania* parasites.

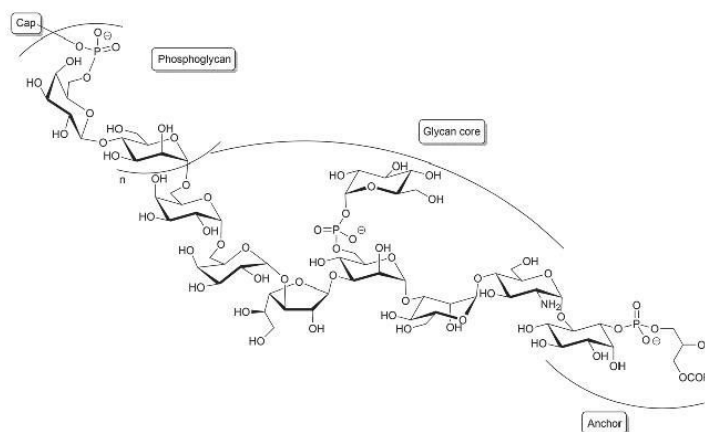


Fig. 4 Structure of lipophosphoglycan.

binding to opsonins, further recognized by complement receptors.^{16–18} Inside the resulting parasitophorous and biocidal vacuoles,¹⁸ LPG plays an important role by preventing the destruction of promastigotes and ensuring for them an environment suitable for their differentiation into amastigotes.^{16,18–20} This can be achieved through the inhibition of the protein kinase PKC α ,¹⁷ a protein involved in cell signaling and destruction of intruders through the production of reactive oxygen species (ROS).^{21,22} As another consequence, accumulation of the F-protein occurs,²³ thus inducing

protection of the parasite and preventing the assembly of some proteins such as NADPH oxidase²⁴ or V-type ATPase.^{18,25,26}

As a result, LPG is an essential factor for virulence and survival of promastigotes in macrophages, more particularly for *L. donovani* and *L. major*.²⁷ Nevertheless, since *lpg1*[−] mutants of *L. mexicana* survive well in macrophages and remain virulent,^{18,27–30} *L. mexicana* has developed different infection strategies potentially based on other related membrane glycoconjugates.

Glycoinositol phospholipids (GIPLs)

The GIPLs, though of low molecular weight, are present in ten times more copies than those of LPG.^{30–32} Their glycosylphosphatidylinositol anchor structure, found in all eukaryotes, is based on the pseudo-trisaccharide α -D-Manp-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNp-(1 \rightarrow 6)-myo-Ino linked to a glycerolipid part that ensures anchoring into the cell membrane.³³ Further glycosylation of the Manp residue is *Leishmania* species dependent. There are three main families depending on whether the oligosaccharidic structure is close to that of the GPI anchor proteins (type-1 GIPL, high mannose) or to the core of the LPG (type-2 GIPL enriched in galactose in both pyranose and furanose forms, Fig. 5) or whether the glycoside is a hybrid of the two last ones.³³ The number of copies remains constant during the

parasite life cycle,³⁰ as these GIPLs are the major surface glycoconjugates in amastigotes.^{30,32,34}

As for the LPG, it was established that the GIPLs (Fig. 6) are able to inhibit PKC through their lipid chains.²² Nevertheless, contradictory results were obtained for *L. mexicana*: it was firstly shown that the enzymes involved in the biosynthesis of the GIPLs were essential for promastigote growth,³⁵ but in other experiments, the corresponding KO mutants were grown successfully, and their virulence was preserved, as shown in *in vitro* or *in vivo* models.³⁶ Contrasting results were obtained with *L. major*: a mutant devoid of LPG and GIPLs could be grown *in vitro* normally but displayed limited survival ability in macrophages as well as a lower proliferation capacity.³⁷ Consequently, the GIPLs may have variable influence on the survival of the parasite, depending on the species and/or the stage of the parasite.

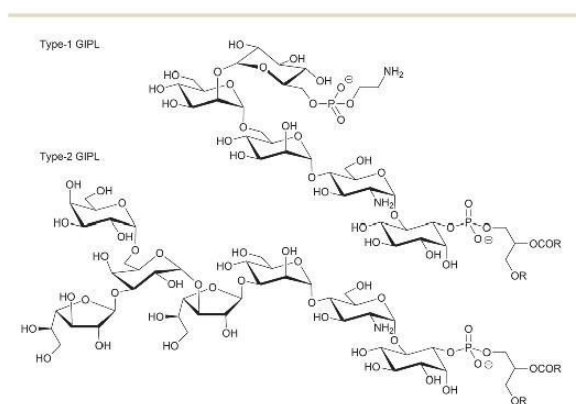


Fig. 5 Structures of type-1 and type-2 GIPLs.

Glycosylphosphatidylinositol (GPI) glycoproteins

Two main glycoproteins have been studied: GP63, also called leishmanolysin, PSP (Promastigote Surface Protein) or MSP (Major Surface Protein), and GP46, or PSA (Promastigote Surface Antigen). The former is a protease more present on the surface of promastigote cell membranes than on those of amastigote for which it is mainly found in the flagellum pocket.¹ High mannose-type glycans complete the structure of the protein, with some α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3) residues.³⁸ The role of this metalloprotease is unclear, because of its limited accessibility due to the covering by LPG components.³⁹ Nevertheless, it is able to disturb the extracellular matrix surrounding the parasite, thus facilitating movement in tissues.⁴⁰ It also confers protection against complement-mediated lysis,⁴¹ and improves internalization into macrophages.^{39,40,42} As for GP63,

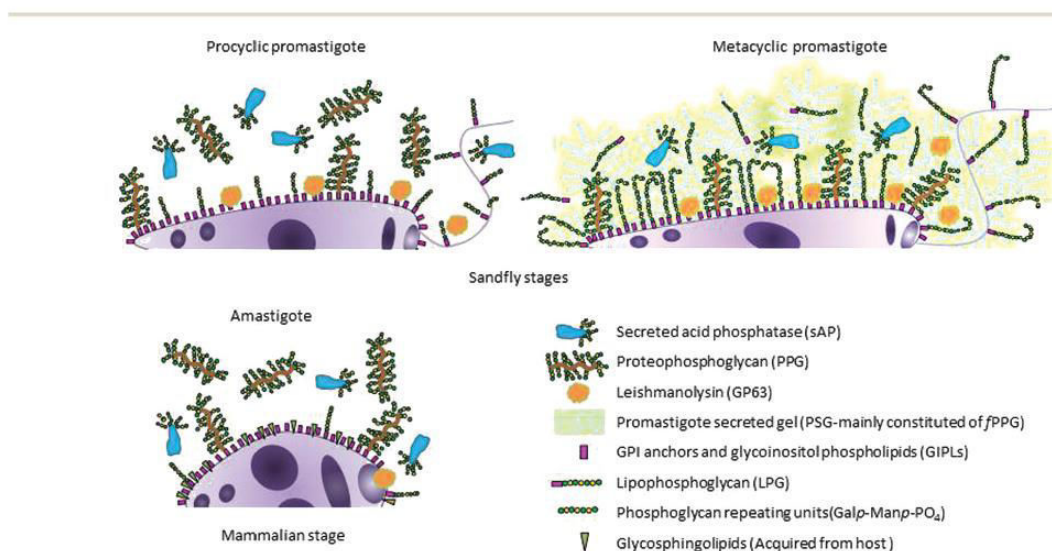


Fig. 6 Glycoconjugate evolution according to the stage of *L. donovani* parasites.

the glycoprotein GP46 is involved in the attachment of the parasite onto macrophages and in cell invasion.⁴³ Interestingly, it was shown that *L. amazonensis* amastigotes, transfected with a specific GPI phospholipase, displayed disturbed proliferation *in vitro*.⁴⁴

Proteophosphoglycans (PPGs) and secreted acid phosphatases (sAPs)

These two proteins are highly glycosylated, but unlike typical forms of glycosylations (*N*- and *O*-glycans), they are phosphoglycosylated and present entities connected to serine or threonine residues, a pattern unknown in pluricellular microorganisms (Fig. 7).^{45,46} Inside the insect vector, these proteins are highly efficient in the protection against digestive enzymes.^{40,47}

The proteophosphoglycans may exist in several forms: membrane bound (mPPG), secreted (sPPG) or filamentous (fPPG).^{46,48} The filamentous form plays a vital role as it is one of the components of an abundant gel, which ensures protection of the parasites within the insect vector.⁴⁷ A great variability in the structure of PPGs of *L. major* and *L. mexicana* has been observed. *L. mexicana* amastigotes, devoid of LPG or sAP, produce complex branched PPGs which contribute to the great expansion of parasitophorous vacuoles in macrophages observed in this species.⁴⁹ On the other hand, sPPG plays a role in signaling processes involved in the inflammatory response by increasing INF γ -stimulated NO production or concentrations of IL-10 or ROS species, but not INF γ or IL-12.⁴⁰ Thus the pro-inflammatory role of sPPG remains quite unclear.

The generation of mutant strains, by inducing the removal of enzymes involved in the assembly of Man p or Gal p units in

the repeating polysaccharide [\rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Man p -(1- O -PO $_3^-$], established that PPGs could be involved in survival and virulence.^{14,50} While this was observed in promastigotes, amastigotes of the same mutants remained infectious. In *L. mexicana*, both promastigote and amastigote stages were similarly affected.^{14,50} The parasite is thus able to adapt its glycocalyx depending on the environment, to resist proteolytic attack from its host, and to adhere to cells of interest, *i.e.* epithelial cells or macrophages.

Secreted acid phosphatases (sAPs) are abundantly produced by all species of *Leishmania*.^{46,51} Widely phosphoglycosylated, they undergo changes according to the stages of the life cycle and, like LPG, are quite polymorphic depending on the species.⁴⁶ Phosphoglycans associated with them also present some differences in the number of repeating units (from 32 [Gal p -Man p -OPO $_3^-$] in *L. donovani* to only 2–3 for *L. mexicana*).^{46,52} The molecular nature of the caps is also species-dependent.⁵³ sAPs are able to dephosphorylate a wide variety of organic substrates (carbohydrates, inositols or proteins), thereby they could contribute to the preparation of nutrients necessary for the parasite.⁴⁰ However, their role in infection remains unclear.^{40,54}

Current anti-leishmanial therapies targeting the parasite membrane

Several molecules are currently available to treat leishmaniasis, and their indication depends on the parasite species and the clinical form (cutaneous, mucocutaneous, and visceral leishmaniasis). Some drugs are ancient and target diverse metabolic pathways, such as antimony derivative-based drugs, dicarboximidamide pentamidine and paromomycin. It has been shown that the former one can either act on the para-

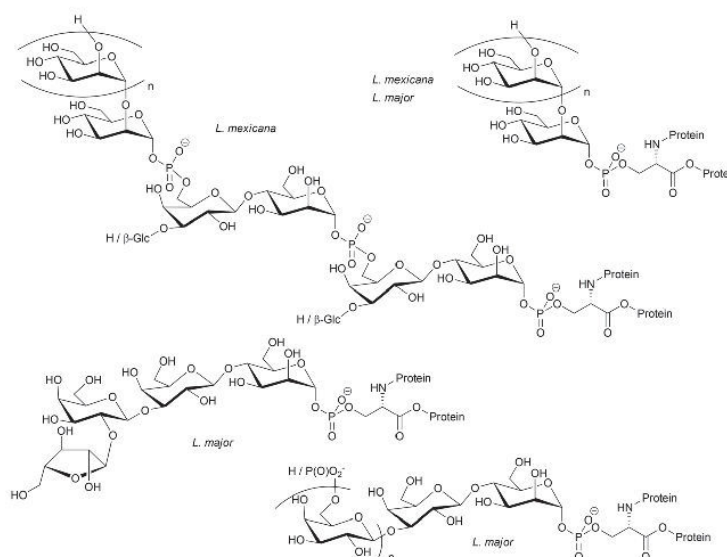


Fig. 7 Examples of the structures of the glycan part of phosphoglycosylated proteins.

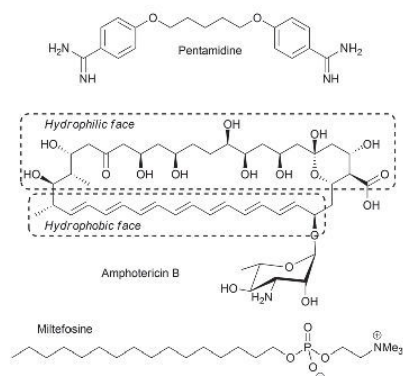


Fig. 8 Structure of pentamidine, Amphotericin B, and hexadecylphosphocholine (HePC, miltefosine).

site's trypanothione reductase and DNA-topoisomerase,^{55,56} or induce the production of defective proteins.^{57–59}

Dicarboximidamide pentamidine (Fig. 8) is a potent aromatic derivative used in anti-*Leishmania* therapy for its ability to disturb mitochondrial inner membrane potential.^{60,61} The two major drugs currently used to treat visceral leishmaniasis are Amphotericin B (AmB, Fig. 8) and miltefosine; both have an action on the parasite membrane. In particular, amphotericin B is widely used in India where resistance to antimonial derivatives is observed, but is also the first line therapy in France under a liposomal formulation.⁶² This polyenic macrocycle is also a second line treatment in mucocutaneous leishmaniasis. The action of AmB results from the ability of its hydrophobic part to interact with the membrane sterols, thereby forming a hydrophilic channel on the opposite face. The pores thus created alter the permeability of the membrane, and lead to the escape of substances such as potassium ions.^{63,64} Interestingly, its biological activity is strengthened and its toxicity is reduced through a liposomal formulation that improves long-term activity and macrophage targeting.⁶⁵ Indeed, these particles are usually trapped from the bloodstream by the phagocytic system, and AmB is thus directly carried to its target, the macrophage, reducing the risk of toxicity by 28%.⁶³

Miltefosine was first used in anti-tumoral treatment. The anti-protozoal properties of this alkylphosphocholine, hexadecylphosphocholine (HePC, Fig. 8), were taken later into consideration.^{60,66} It is only in the 2000s that this treatment was approved in several countries to treat visceral leishmaniasis⁶⁷ and provided promising results for cutaneous infections, as well as visceral leishmaniasis.⁶⁸ Its main interest lies in its ability to be administered orally, in contrast to other treatments. Effects of disruption of the metabolism of lipids have been observed, including inhibition of the synthesis of phosphatidylcholine (PC), accompanied by an increase in phosphatidylethanolamine (PE) (PC and PE being the two major membrane phospholipids in *Leishmania*) and a disturbance in

the synthesis of GPI,^{60,66,69,70} leading to changes in membrane permeability and fluidity. Another observed mechanism is its ability to induce apoptosis.^{69,71} However, intestinal disorder side effects were observed. In recent clinical phase IV trials, 3% of patients presented such symptoms for a cure rate of up to 95%.^{72,73} Besides, teratogenic effects in pregnant women limit its benefits, unless applying a contraception for at least four months, a measure quite difficult to implement in some populations.^{60,66,73,74} Finally, miltefosine was shown to have the capacity to activate the immune response of the host, by inducing cytokine production, in particular, interferon γ , leading to a biased immune response towards Th1,^{67,69,75} which would be a beneficial outcome for immunosuppressed patients.⁶⁹ Unfortunately, some resistance was already observed *in vitro* and so became a big concern.

The search for new drugs targeting the parasite membrane: the metabolic pathways for sugar synthesis

Over the last two decades, some research studies have been directly inspired by the LPG, widely present at the surface of the promastigote stage, because of its involvement in both virulence and survival of the parasite. Two main features have to be underlined: the repeating unit $[-\rightarrow 6)-\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-Manp-(1-O-PO}_3^-]$ is an unconventional sequence in eukaryote glycoconjugates,^{76,77} and the core hexasaccharide (Fig. 9), which contains a rare Galf residue which is absent in all mammals. The biosynthesis of this residue requires at least three enzymes: (i) a UDP-galactopyranose mutase,⁷⁸ which catalyzes the conversion of UDP-Galp into UDP-Galf, (ii) a transporter,⁷⁹ and (iii) a galactofuranosyl transferase, responsible for the furanosylation of Manp, starting from a nucleotide-sugar as a donor (Fig. 10).²⁷ Both types of enzymes are found not only in *Leishmania* but also in other microorganisms producing galactofuranosyl-containing conjugates, such as *Trypanosoma*, *Mycobacteria*, *Klebsiella*, and *Aspergillus*.⁸⁰

The repeating unit $[-\rightarrow 6)-\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-Manp-(1-O-PO}_3^-]$ as a potential target

The elongating $\alpha\text{-D-mannosyl phosphate transferase (eMPT)}$ was found in *Leishmania* parasites in 1992⁸¹ and fully characterized in 2000.⁸² The team of Nikolaev performed the synthesis of several disaccharides bearing an anomeric phosphate group in order to probe the corresponding enzymatic activity (Fig. 11).^{2,83–88} The authors have shown that substrate recognition strongly depends on several functional parameters: the negative charge of the phosphodiester bridge, the β -anomeric configuration of the Galp entity, and the H-bonding ability of the primary hydroxyls of both Manp and Galp residues. To complete this approach, the same team also focused its attention on β -galactopyranosyl transferase activities.⁸⁹ Once again, synthetic substrates underlined the requirement for phosphodiester linkages. Thanks to this study, two enzymes were identified: an elongating β -galactopyranosyl transferase (eGalT) and a branching β -galactopyranosyl transferase (bGalT). Considering the original structure of this part of the LPG and because the eMPT enzyme is exclusive to *Leishmania*

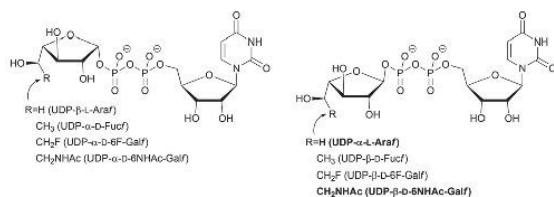


Fig. 12 Structure of anti-leishmanial UDP-furanoses.

Purified LPG or synthetic glycopospholipids: beyond drug targets, other potential interests

LPG is an interesting target not only for therapeutic drug development, but also for vaccine development. As shown above, LPG motifs or synthetic glycopospholipids can have immunostimulating properties, which can serve immunization strategies. Indeed, LPG purified from *L. major* has already been used in vaccine trials against cutaneous leishmaniasis in the mice model at the end of the 1980s.¹⁰⁷ More recently, intranasal vaccination with LPG isolated from *L. amazonensis*, and without any other adjuvant, has been used to induce protective immunity in mice. A decrease in both lesion size and parasite burden was observed. These observations could be related to the up-regulation of Th1 cytokines by LPG. It was also shown that LPG can act as a transmission blocking vaccine candidate, as sandflies fed on immunized animals were less prone to parasite development after a subsequent bite on an infected animal.¹⁰⁸ By contrast, a *L. donovani* LPG-based vaccine did not provide complete protection of animals,¹⁰⁹ who were even subjected to exacerbated infection by *L. major*.¹¹⁰ These studies highlighted the lack of cross-protection by LPG from different parasite species, likely due to known structural differences. However, there are sustained efforts to develop this LPG-based strategy, which has been addressed in a recent review, and thus will not be developed further here.¹¹¹

Furthermore, Seeberger's team proposed the synthesis of *L. donovani* terminal tetrasaccharides linked to a phospholipid or to an influenza protein. The resulting glycoconjugates were presented to the surface of virosomes. Their ability to generate anti-*Leishmania* antibodies when administered to mice was confirmed, but protection against infection has not been evaluated.¹¹² Such a strategy could find application in the field of clinical or histological diagnosis, as shown in a recent work.¹¹³ Petersen's group has also considered this type of oligosaccharides to demonstrate that they alone could alter the immune response. In mice, co-administration with *L. major* parasites resulted in an increase of IL-12 and a Th1 response.¹¹⁴

Besides immunological effects, bioinspired glycolipids were also shown to act as membrane disruptors. Indeed, our team synthesized some furanolipids structurally close to octyl β -D-galactofuranoside (Fig. 13, R = OH). We firstly observed a strong interaction of the octyl moiety with the membrane of *L. donovani* promastigotes, using STD-NMR.¹¹⁵ This study

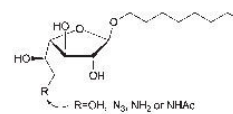


Fig. 13 Structural backbone of furanolipids studied for their leishmanicidal properties.

secondly highlighted the ability of some compounds to rigidify the cell membrane of *L. donovani* promastigotes, leading to extensive damage and apoptosis induction in promastigotes. The most powerful compound, octyl β -D-galactofuranoside (Galf-Oct), reduced promastigote growth in a similar way to miltefosine and offered the advantage of being far less toxic for human macrophage cells. These results were encouraging since they thirdly showed a marked reduction of intramacrophagic amastigote growth, associated with an increased production of ROS species. Interestingly, the efficacy of Galf-Oct was dependent on the furanose motif since the pyranosidic counterpart did not show any antiparasitic properties. These promising findings pave the way to the development of compounds mimicking LPG motifs, which could both target metabolic pathways of parasite sugar synthesis and stimulate cell receptors that could boost the host immune response.

Conclusion

Despite numerous studies on leishmanial glycolipids, their biological properties, and the enzymes required for their biosynthesis, there are still many questions and shadows. Obviously there is a potential for the development of treatments or vaccines, but they are conditioned by the variability of structures between species (side chains and caps) and a lack of standardization of immunoassays. On the other hand, the prospects for the development of inhibitors were until recently limited by the need to identify and study the enzymes involved in the corresponding biosynthetic pathways. It is however surprising that the core hexasaccharide, which contains the xenobiotic galactofuranose pattern, remains understudied, despite the fact that this element is preserved in all species of *Leishmania*. Its contribution to the properties of LPG has therefore not been clearly elucidated, as well as the respective roles of the lipidic part or the phosphoglycan units. Moreover, the contribution of leishmanial glycolipids to the survival and/or the infectivity of parasites has not yet been clarified, but probably depends also on the parasite species.

From a translational point of view, having oligosaccharidic fragments of these biomolecules would afford standards necessary for the development of more reliable diagnostic methods. Finally, efforts have to be made to evaluate the possible therapeutic and immunomodulatory properties of leishmanial glycoconjugates and related mimics.

Acknowledgements

The authors thank Agence Nationale de la Recherche (ANR) for financial support of their work on the development of anti-*Leishmania* agents and use of enzymes as new biocatalysts for synthetic purposes (ANR-2010-BLAN-7181).

References

- N. Novozhilova and N. Bovin, *Biochemistry*, 2010, **75**, 686–694.
- A. V. Nikolaev, I. V. Botvinko and A. J. Ross, *Carbohydr. Res.*, 2007, **342**, 297–344.
- D. E. Teixeira, M. Benchimol, J. C. Rodrigues, P. H. Crepaldi, P. F. Pimenta and W. de Souza, *PLoS Pathog.*, 2013, **9**, e1003594.
- D. L. Sacks, P. F. Pimenta, M. J. McConville, P. Schneider and S. J. Turco, *J. Exp. Med.*, 1995, **181**, 685–697.
- P. F. Pimenta, E. M. Saraiva and D. L. Sacks, *Exp. Parasitol.*, 1991, **72**, 191–204.
- D. Sacks and S. Kamhawi, *Annu. Rev. Microbiol.*, 2001, **55**, 453–483.
- D. L. Sacks, *Cell. Microbiol.*, 2001, **3**, 189–196.
- T. Ilg, *Med. Microbiol. Immunol.*, 2001, **190**, 13–17.
- T. L. Barron and S. J. Turco, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1760**, 710–714.
- R. R. de Assis, I. C. Ibraim, P. M. Nogueira, R. P. Soares and S. J. Turco, *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, **1820**, 1354–1365.
- R. P. Soares, T. L. Cardoso, T. Barron, M. S. Araujo, P. F. Pimenta and S. J. Turco, *Int. J. Parasitol.*, 2005, **35**, 245–253.
- J. M. Coelho-Finamore, V. C. Freitas, R. R. Assis, M. N. Melo, N. Novozhilova, N. F. Secundino, P. F. Pimenta, S. J. Turco and R. P. Soares, *Int. J. Parasitol.*, 2011, **41**, 333–342.
- M. J. McConville, S. J. Turco, M. A. Ferguson and D. L. Sacks, *EMBO J.*, 1992, **11**, 3593–3600.
- U. Gaur, M. Showalter, S. Hickerson, R. Dalvi, S. J. Turco, M. E. Wilson and S. M. Beverley, *Exp. Parasitol.*, 2009, **122**, 182–191.
- G. F. Spath, L. A. Garraway, S. J. Turco and S. M. Beverley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, **100**, 9536–9541.
- L. H. Franco, S. M. Beverley and D. S. Zamboni, *J. Parasitol. Res.*, 2012, **2012**, 165126.
- R. Lodge and A. Descoteaux, *Clin. Immunol.*, 2005, **114**, 256–265.
- N. Moradin and A. Descoteaux, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2012, **2**, 121.
- J. R. Giorgione, S. J. Turco and R. M. Epand, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**, 11634–11639.
- D. L. Tolson, S. J. Turco and T. W. Pearson, *Infect. Immun.*, 1990, **58**, 3500–3507.
- M. T. Shio, K. Hassani, A. Isnard, B. Ralph, I. Contreras, M. A. Gomez, I. Abu-Dayyeh and M. Olivier, *J. Trop. Med.*, 2012, **2012**, 819512.
- M. Chawla and R. A. Vishwakarma, *J. Lipid Res.*, 2003, **44**, 594–600.
- A. Holm, K. Tejle, K. E. Magnusson, A. Descoteaux and B. Rasmusson, *Cell. Microbiol.*, 2001, **3**, 439–447.
- R. Lodge, T. O. Diallo and A. Descoteaux, *Cell. Microbiol.*, 2006, **8**, 1922–1931.
- J. F. Dermine, G. Goyette, M. Houde, S. J. Turco and M. Desjardins, *Cell. Microbiol.*, 2005, **7**, 1263–1270.
- M. E. Winberg, A. Holm, E. Sarndahl, A. F. Vinet, A. Descoteaux, K. E. Magnusson, B. Rasmusson and M. Lerm, *Microbes Infect.*, 2009, **11**, 215–222.
- G. F. Spath, L. Epstein, B. Leader, S. M. Singer, H. A. Avila, S. J. Turco and S. M. Beverley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, **97**, 9258–9263.
- V. Bahr, Y. D. Stierhof, T. Ilg, M. Demar, M. Quinten and P. Overath, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1993, **58**, 107–121.
- A. Descoteaux and S. J. Turco, *Microbes Infect.*, 2002, **4**, 975–981.
- M. J. McConville and J. M. Blackwell, *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 15170–15179.
- M. J. McConville and A. Bacic, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1990, **38**, 57–67.
- P. Schneider, J. P. Rosat, A. Ransijn, M. A. Ferguson and M. J. McConville, *Biochem. J.*, 1993, **295**(Pt 2), 555–564.
- M. J. McConville and M. A. Ferguson, *Biochem. J.*, 1993, **294**(Pt 2), 305–324.
- G. Winter, M. Fuchs, M. J. McConville, Y. D. Stierhof and P. Overath, *J. Cell Sci.*, 1994, **107**(Pt 9), 2471–2482.
- S. C. Ilgoutz, J. L. Zawadzki, J. E. Ralton and M. J. McConville, *EMBO J.*, 1999, **18**, 2746–2755.
- A. Garami, A. Mehlert and T. Ilg, *Mol. Cell. Biol.*, 2001, **21**, 8168–8183.
- R. Zufferey, S. Allen, T. Barron, D. R. Sullivan, P. W. Denny, I. C. Almeida, D. F. Smith, S. J. Turco, M. A. Ferguson and S. M. Beverley, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 44708–44718.
- V. A. Funk, J. E. Thomas-Oates, S. L. Kielland, P. A. Bates and R. W. Olafson, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1997, **84**, 33–48.
- A. Isnard, M. T. Shio and M. Olivier, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2012, **2**, 72.
- M. Olivier, V. D. Atayde, A. Isnard, K. Hassani and M. T. Shio, *Microbes Infect.*, 2012, **14**, 1377–1389.
- P. B. Joshi, B. L. Kelly, S. Kamhawi, D. L. Sacks and W. R. McMaster, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2002, **120**, 33–40.
- C. Yao, *Infect. Immun.*, 2010, **78**, 22–31.
- L. Kedzierski, J. Montgomery, D. Bullen, J. Curtis, E. Gardiner, A. Jimenez-Ruiz and E. Handman, *J. Immunol.*, 2004, **172**, 4902–4906.
- K. Mensa-Wilmot, N. Garg, B. S. McGwire, H. G. Lu, L. Zhong, D. A. Armah, J. H. LeBowitz and K. P. Chang, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1999, **99**, 103–116.

- 45 P. A. Haynes, *Glycobiology*, 1998, **8**, 1–5.
- 46 T. Ilg, *Parasitol. Today*, 2000, **16**, 489–497.
- 47 M. E. Rogers, *Front. Microbiol.*, 2012, **3**, 223.
- 48 M. E. Rogers, T. Ilg, A. V. Nikolaev, M. A. J. Ferguson and P. A. Bates, *Nature*, 2004, **430**, 463–467.
- 49 T. Ilg, *EMBO J.*, 2000, **19**, 1953–1962.
- 50 A. A. Capul, S. Hickerson, T. Barron, S. J. Turco and S. M. Beverley, *Infect. Immun.*, 2007, **75**, 4629–4637.
- 51 A. M. Shakarian and D. M. Dwyer, *Exp. Parasitol.*, 2000, **95**, 79–84.
- 52 D. N. Lippert, D. W. Dwyer, F. Li and R. W. Olafson, *Glycobiology*, 1999, **9**, 627–636.
- 53 T. Ilg, R. Etges, P. Overath, M. J. McConville, J. Thomas-Oates, J. Thomas, S. W. Homans and M. A. Ferguson, *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 6834–6840.
- 54 M. B. Joshi, D. J. Mallinson and D. M. Dwyer, *J. Eukaryotic Microbiol.*, 2004, **51**, 108–112.
- 55 F. Frézard, P. S. Martins, M. C. M. Barbosa, A. M. C. Pimenta, W. A. Ferreira, J. E. d. Melo, J. B. Mangrum and C. Demicheli, *J. Inorg. Chem.*, 2008, **102**, 656–665.
- 56 F. Frézard, C. Demicheli and R. Ribeiro, *Molecules*, 2009, **14**, 2317–2336.
- 57 A. Jhingran, B. Chawla, S. Saxena, M. P. Barrett and R. Madhubala, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2009, **164**, 111–117.
- 58 B. Chawla, A. Jhingran, A. Panigrahi, K. D. Stuart and R. Madhubala, *PLoS One*, 2011, **6**, e26660.
- 59 M. M. Fernandez, E. L. Malchiodi and I. D. Algranati, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, **55**, 86–93.
- 60 K. Seifert, *Open Med. Chem. J.*, 2011, **5**, 31–39.
- 61 V. S. Amato, F. F. Tuon, H. A. Bacha, V. A. Neto and A. C. Nicodemo, *Acta Trop.*, 2008, **105**, 1–9.
- 62 P. A. Buffet, E. Rosenthal, J. P. Gangneux, E. Lightburne, P. Couppie, G. Morizot, L. Lachaud, P. Marty and J. P. Dedet, *Presse Med.*, 2011, **138**, 129–134.
- 63 A. Lemke, A. F. Kiderlen and O. Kayser, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, **68**, 151–162.
- 64 A. Chattopadhyay and M. Jafurulla, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, **416**, 7–12.
- 65 J. P. Gangneux, A. Sulahian, J. F. Garin and F. Derouin, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1996, **90**, 574–577.
- 66 M. Ouellette, J. Drummelsmith and B. Papadopoulou, *Drug Resist. Updates*, 2004, **7**, 257–266.
- 67 N. Carré, M. Collot, P. Guillard, M. Horellou and J.-P. Gangneux, *J. Pharm. Clin.*, 2010, **29**, 121–146.
- 68 P. Mitropoulos, P. Konidas and M. Durkin-Konidas, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2010, **63**, 309–322.
- 69 T. P. Dorlo, M. Balasegaram, J. H. Beijnen and P. J. de Vries, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2012, **67**, 2576–2597.
- 70 M. Rakotomanga, S. Blanc, K. Gaudin, P. Chaminade and P. M. Loiseau, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, **51**, 1425–1430.
- 71 N. K. Verma, G. Singh and C. S. Dey, *Exp. Parasitol.*, 2007, **116**, 1–13.
- 72 S. Antinori, L. Schifanella and M. Corbellino, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2012, **31**, 109–118.
- 73 S. L. Croft and P. Olliaro, *Clin. Microbiol. Infect.*, 2011, **17**, 1478–1483.
- 74 S. Sundar and J. Chakravarty, *Natl. Med. J. India*, 2012, **25**, 85–89.
- 75 H. C. Maltezou, *J. Biomed. Biotechnol.*, 2010, **2010**, 617521.
- 76 S. J. Turco and A. Descoteaux, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1992, **46**, 65–94.
- 77 L. Morelli, L. Poletti and L. Lay, *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, 5723–5777.
- 78 B. Kleczka, A.-C. Lamerz, G. van Zandbergen, A. Wenzel, R. Gerardy-Schahn, M. Wiese and F. H. Routier, *J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 10498–10505.
- 79 J. Engel, P. S. Schmalhorst, T. Dörk-Bousset, V. Ferrières and F. H. Routier, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 33859–33868.
- 80 I. Chlubnova, L. Legentil, R. Dureau, A. Pennec, M. Almendros, R. Daniellou, C. Nugier-Chauvin and V. Ferrières, *Carbohydr. Res.*, 2012, **356**, 44–61.
- 81 M. A. Carver and S. J. Turco, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, **295**, 309–317.
- 82 F. H. Routier, A. P. Higson, I. A. Ivanova, A. J. Ross, Y. E. Tsvetkov, D. V. Yashunsky, P. A. Bates, A. V. Nikolaev and M. A. J. Ferguson, *Biochemistry*, 2000, **39**, 8017–8025.
- 83 A. J. Ross, A. P. Higson, M. A. J. Ferguson and A. V. Nikolaev, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 6695–6698.
- 84 A. J. Ross, I. A. Ivanova, M. A. J. Ferguson and A. V. Nikolaev, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2001, 72–81, DOI: 10.1039/b004653l.
- 85 D. V. Yashunsky, Y. E. Tsvetkov, M. A. J. Ferguson and A. V. Nikolaev, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2002, 242–256, DOI: 10.1039/b106182h.
- 86 F. H. Routier, A. V. Nikolaev and M. A. J. Ferguson, *Glycoconjugate J.*, 2000, **16**, 773–780.
- 87 A. P. Higson, A. J. Ross, Y. E. Tsvetkov, F. H. Routier, O. V. Sizova, M. A. J. Ferguson and A. V. Nikolaev, *Chem. – Eur. J.*, 2005, **11**, 2019–2030.
- 88 A. J. Ross, O. V. Sizova and A. V. Nikolaev, *Carbohydr. Res.*, 2006, **341**, 1954–1964.
- 89 O. V. Sizova, A. J. Ross, I. A. Ivanova, V. S. Borodkin, M. A. J. Ferguson and A. V. Nikolaev, *ACS Chem. Biol.*, 2011, **6**, 648–657.
- 90 S. M. Beverley, K. L. Owens, M. Showalter, C. L. Griffith, T. L. Doering, V. C. Jones and M. R. McNeil, *Eukaryotic Cell*, 2005, **4**, 1147–1154.
- 91 M. Oppenheimer, A. L. Valenciano and P. Sobrado, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, **407**, 552–556.
- 92 I. O. Fonseca, K. Kizjakina and P. Sobrado, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2013, **538**, 103–110.
- 93 E. C. Dykhuizen and L. L. Kiessling, *Org. Lett.*, 2009, **11**, 193–196.
- 94 M. Soltero-Higgin, E. E. Carlson, J. H. Phillips and L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 10532–10533.
- 95 K. Kizjakina, J. J. Tanner and P. Sobrado, *Curr. Pharm. Des.*, 2013, **19**, 2561–2573.

- 96 A. Caravano and S. P. Vincent, *Eur. J. Org. Chem.*, 2009, 1771–1780.
- 97 E. C. Dykhuizen, J. F. May, A. Tongpenyai and L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 6706–6707.
- 98 S. Borrelli, W. F. Zandberg, S. Mohan, M. Ko, F. Martinez-Gutierrez, S. K. Partha, D. A. R. Sanders, Y. Av-Gay and B. M. Pinto, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2010, **36**, 364–368.
- 99 M. S. Scherman, K. A. Winans, R. J. Stern, V. Jones, C. R. Bertozzi and M. R. McNeil, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, **47**, 378–382.
- 100 K. E. van Straaten, F. H. Routier and D. A. R. Sanders, *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 2012, **68**, 455–459.
- 101 A. E. Trunkfield, S. S. Gurcha, G. S. Besra and T. D. Bugg, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 2651–2663.
- 102 S. Cren, S. S. Gurcha, A. J. Blake, G. S. Besra and N. R. Thomas, *Org. Biomol. Chem.*, 2004, **2**, 2418–2420.
- 103 V. Ferrières, C. Nugier-Chauvin, L. Legentil and S. Tranchimand, *Carbohydr. Chem.*, 2014, **40**, 401–417.
- 104 P. Peltier, M. Beláňová, P. Dianišková, R. Zhou, R. B. Zheng, J. A. Pearcy, M. Joe, P. J. Brennan, C. Nugier-Chauvin, V. Ferrières, T. L. Lowary, R. Daniellou and K. Mikušová, *Chem. Biol.*, 2010, **17**, 1356–1366.
- 105 G. Eppe, P. Peltier, R. Daniellou, C. Nugier-Chauvin, V. Ferrières and S. P. Vincent, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, **19**, 816–819.
- 106 K. Zhang, T. Barron, S. J. Turco and S. M. Beverley, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2004, **136**, 11–23.
- 107 M. J. McConville, A. Bacic, G. F. Mitchell and E. Handman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1987, **84**, 8941–8945.
- 108 W. K. Tonui, P. A. Mbat, C. O. Anjili, A. S. Orago, S. J. Turco, J. I. Githure and D. K. Koech, *East Afr. Med. J.*, 2001, **78**, 84–89.
- 109 W. K. Tonui, S. S. Mpoke, A. S. Orago, S. J. Turco, P. A. Mbat and G. M. Mkoji, *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 2003, **70**, 255–263.
- 110 W. K. Tonui, *East Afr. Med. J.*, 2003, **80**, 260–263.
- 111 C. L. Forestier, Q. Gao and G. J. Boons, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014, **4**, 193.
- 112 X. Liu, S. Siegrist, M. Amacker, R. Zurbriggen, G. Pluschke and P. H. Seeberger, *Chem. Biol.*, 2006, **1**, 161–164.
- 113 C. Anish, C. E. Martin, A. Wahlbrink, C. Bogdan, P. Ntais, M. Antoniou and P. H. Seeberger, *Chem. Biol.*, 2013, **8**, 2412–2422.
- 114 A. Osanya, E. H. Song, K. Metz, R. M. Shimak, P. M. Boggiatto, E. Huffman, C. Johnson, J. M. Hostetter, N. L. Pohl and C. A. Petersen, *Am. J. Pathol.*, 2011, **179**, 1329–1337.
- 115 M. Suleman, J.-P. Gangneux, L. Legentil, S. Belaza, Y. Cabezas, C. Manuela, R. Dureau, O. Sergent, A. Burel, F. Daligault, V. Ferrières and F. Robert-Gangneux, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, **58**, 2156–2166.

1.3. Objectifs de ce travail

L'objectif de ma thèse était de valider le ciblage des voies de synthèse des galactofuranoses comme cible thérapeutique anti-leishmanies. Tout d'abord, étant donnée la variabilité des glycoconjugués de la paroi, qu'elle soit inter-espèce ou intra espèce, entre les promastigotes et les amastigotes, il était important de confirmer la présence des différents gènes impliqués dans leur métabolisme, et leur expression au cours du temps dans les deux stades. Ensuite, même si notre objectif principal était d'améliorer le traitement de la leishmaniose viscérale, nous avons voulu vérifier la présence de la cible chez d'autres espèces de leishmanies responsables d'atteintes cutanées, afin d'envisager de futurs travaux dans ce domaine.

Par ailleurs, grâce à la collaboration de notre équipe avec les chimistes de l'ENSC de Rennes, nous avons cherché à cibler la synthèse de galactofuranose de *Leishmania*, au moyen d'analogues synthétiques dans l'hypothèse qu'ils pourraient entrer en compétition avec le substrat naturel. Différentes approches in vitro (cellulaires, imagerie, biophysiques) ont été utilisées pour caractériser l'effet antiparasitaire observé sur les promastigotes et les amastigotes de *L. donovani*.

Enfin, le potentiel d'immunostimulation de ces oligosaccharides, qui peuvent être reconnus par les récepteurs macrophagiques, a été exploré dans un modèle in vitro de macrophages humains, par une approche transcriptomique à haut débit, et par une approche plus ciblée de caractérisation phénotypique et de régulation transcriptomique de la polarisation macrophagique.

Partie 2 : Pertinence de la voie de synthèse des furanoses comme cible thérapeutique

Le motif galactofuranose semble être une cible thérapeutique d'intérêt, du fait de son absence dans les membranes cellulaires mammifères. De plus, il est présent dans le LPG, molécule majeure de la paroi des promastigotes, mais aussi les GIPLs, présents dans les stades promastigotes et amastigotes. Plusieurs approches mécanistiques chimiques peuvent viser sa voie de synthèse, et nous avons tenté certaines d'entre elles. Une première approche est de caractériser une ou des enzyme(s) impliquée(s) dans l'élongation de la chaîne oligosaccharidique absente(s) chez les mammifères, pour mettre au point une méthode d'inhibition spécifique de cette ou de ces enzymes. Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'induction des gènes d'intérêt (*Galf*-transférases, invertases) chez différentes espèces de leishmanies. Les invertases appartiennent à la famille des GH 32, d'autres glycosides hydrolases sont présentes chez les mammifères, mais les invertases peuvent être une cible thérapeutique intéressante du fait de leur absence dans les cellules de mammifères.

Certaines invertases, dont la mutase *BfrA* sont impliquées dans le métabolisme des sucres, incluant des motifs glucidiques de la chaîne oligosaccharidique du LPG, et cette dernière enzyme a été caractérisée de façon plus approfondie dans une partie de ce travail.

D'autre part, la réaction de synthèse du galactofuranose étant connue, la deuxième approche repose sur le développement d'analogues de l'UDP-furanose, dans le but de créer des analogues compétiteurs de la réaction naturelle, visant à diminuer l'efficacité des *GalfT* et de l'UGM. La pertinence de ce concept a été validée dans la littérature, montrant une activité d'analogues UDP-galactofuranosidiques contre *Mycobacterium tuberculosis* (219) ou contre des trypanosomes, autres parasites de l'ordre des *Kinetoplastidae* (220). Notre équipe s'est donc intéressée, suite à une collaboration avec l'Ecole Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR), à l'étude de l'efficacité d'analogues compétiteurs vis-à-vis de *Leishmania* sp. (221). Un premier travail a montré un effet de plusieurs analogues de l'UDP-galactofuranose sur des promastigotes de *L. donovani*. Toutefois, la synthèse compliquée de ces analogues a poussé l'équipe à explorer d'autres types d'inhibiteurs. Parmi eux, les alkyl-galactofuranosides ont retenu notre attention, et plus précisément les octyl-galactofuranosides, qui ont fait l'objet de divers travaux auxquels j'ai contribué.

2.1. Etude de l'expression des enzymes impliquées dans l'intégration du GalF à la paroi

La présence du LPG dans la paroi des promastigotes est connue en quantité importante, mais elle est faible voire remise en cause chez l'amastigote (222), avec également une variabilité inter-espèces. La première étape de ce travail a donc été de caractériser l'induction différentielle des gènes de ces enzymes chez le promastigote et chez l'amastigote de plusieurs espèces de leishmanies impliquées dans les 3 formes cliniques de la maladie, afin de valider ces voies enzymatiques comme cibles thérapeutiques.

2.1.1 Matériels et méthodes

2.1.1.1 Souches parasitaires

Les souches de leishmanies sont issues de patients du CHU de Rennes ayant présenté une atteinte viscérale (*L. donovani* MHOM/SD/97/LEM3427, Zym MON 18 ; *L. infantum*) ou une atteinte cutanée (pour *L. braziliensis* et *L. major*) et typées par le Centre national de Référence des Leishmanioses (Montpellier, France).

Culture de promastigotes

Les promastigotes issus de culture sur milieu NNN ont été amplifiés et maintenus par repiquage successifs en cultures à 27°C, en milieu liquide de Schneider (Gibco®) additionné de 10% de SVF (Lonza®) et de 1% de Pénicilline (10 000 UI/ml) et streptomycine (10 000 µg/ml) (GIBCO®). Après repiquage les promastigotes se multiplient de façon exponentielle pendant 3 à 5 jours et atteignent la phase stationnaire de croissance après 5 jours.

Culture d'amastigotes

Deux types de macrophages ont été utilisés pour cultiver les amastigotes in vitro : macrophages de la lignée THP-1 et macrophages primaires humains. Les cellules THP1 (lignée de leucémie aigüe monocyttaire, ECACC 88081201 Sigma®) ont été mises en culture en plaques 6 puits, à hauteur de 10⁶ par puits, en milieu RPMI (GIBCO® RPMI medium 1640 + GlutaMAX™, Life technologies) additionné de 10% de SVF (Lonza®) et de 1% de Pénicilline (10 000 UI/ml) et streptomycine (10 000 µg/ml) (GIBCO®). Après incubation une nuit à 37°C sous 5% de CO₂, elles ont été différenciées en macrophages en présence de phorbol myristate acetate (PMA) à 2µM pendant 18h.

Les macrophages humains ont été préparés à partir des PBMC issues de Buffy coat réalisés à partir de poche de sang de l'Etablissement Français du Sang (EFS)

Les monocytes ont été récoltés selon la méthode décrite par Van Grevenynghe (223).

Le milieu de différenciation : RPMI « complet » est additionné de GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) (MACS® Miltenyi Biotec) à 400 UI/ml ou de M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) (MACS® Miltenyi Biotec) à la concentration finale de 50 ng/ml par puits. Les cultures sont ensuite mises à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 6 jours

avec un changement de milieu pour du milieu neuf (RPMI « complet » additionné de GM-CSF ou de M-CSF à la même concentration) à J3.

Ces 2 types de macrophages ont été infectés à hauteur de 10 parasites par cellule pendant une nuit, par des promastigotes de chaque souche en phase stationnaire (> à J5 de culture). Les macrophages infectés ont ensuite été lavés à 3 reprises pour éliminer les promastigotes résiduels, pour obtenir un modèle cellulaire d'amastigotes intramacrophagiques permettant de tester l'efficacité d'inhibiteurs.

2.1.1.2 Expression d'ARNm des galactofuranosyltransférases

A partir de l'étude des génomes de *L. major*, *L. donovani* et *L. braziliensis* plusieurs invertases ont pu être identifiées grâce à la base de données CAZy (www.cazy.org). Parmi ces enzymes, 4 GalT (LPG1, LPG1r, LPG1l et LPG1g) et une mutase (BFRa) plus précisément impliquées dans la synthèse du LPG, ont pu être étudiées. Des couples d'amorces ont été mis au point avec le logiciel CLC Workbench® (Qiagen) pour rechercher ces enzymes chez *L. major*, *L. braziliensis* et *L. donovani*. Leur expression relative a été comparée à celle de l'actine comme gène de référence pour ces 3 espèces.

Des cultures de promastigotes de *L. major*, *L. donovani* et *L. braziliensis* ont été utilisées, à différents temps d'incubation pour étudier la cinétique d'expression des enzymes au cours du temps : 10⁷ promastigotes de chaque espèce ont été collectés à J1, J3, J5 et J7. Des amastigotes intramacrophagiques (THP1) de ces mêmes espèces ont été cultivés en plaque 6 puits (10⁶ macrophages par puits), les cultures ont été lysées à J2, J5 et J7.

Ces amastigotes et promastigotes ont été lysés pour réaliser une extraction des ARN totaux à l'aide du kit Qiagen™ RNeasy mini kit®, pour obtenir un éluat de 30µl. Puis, 10µL de chaque éluat d'ARN ont été soumis à une transcription inverse à l'aide du kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystems™) pour obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc).

Des PCR quantitatives ont été réalisées sur ces échantillons d'ADNc pour prouver la présence et évaluer l'expression des enzymes aux différents temps de culture et pour les différentes formes et espèces parasites. Les amorces utilisées sont listées dans l'Annexe 1 : Liste des amorces utilisées pour amplifier les 5 enzymes impliquées dans l'intégration du Galf au LPG et l'actine comme gène de référence.

L'amplification a été réalisée dans un volume final de 10 µL contenant 2 µL d'ADNc, 8 µL de SYBR® green (Applied biosystems™) PCR master mix et 3 µM de chaque amorce. L'automate de PCR utilisé était le 7900 HT fast real time PCR system® (Applied Biosystem™) avec un programme de température commençant par une étape de dénaturation, 2 minutes à 50°C et 10 min à 95°C puis 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C, suivie d'une courbe de fusion permettant de vérifier la spécificité de la réaction de PCR.

Chaque condition a été réalisée 4 fois pour les amastigotes et 10 fois pour les promastigotes au cours de 2 expériences indépendantes. L'amplification a été réalisée en duplicat pour chaque échantillon. En présence de l'enzyme, une quantification relative comparée à l'expression de l'actine a été calculée comme précédemment décrit (224). Les statistiques ont été calculées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5. 02®. Les données sont représentées en

moyenne \pm écart types et comparées par un test de Mann Whitney (les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives).

2.1.1.3 Caractérisation de la mutase : BfrA

Cette partie de l'étude a été réalisée à l'Université d'Orléans, CNRS, UMR 7311 au sein de l'Institut de Chimie Organique et Analytique d'Orléans (ICOA) par Thibault Rattier et Pierre Lafite sous la supervision du Professeur Richard Daniellou.

BfrA a pu être exprimée grâce au plasmide pET-28a (Novagen) dans un système *Escherichia coli* et grâce au plasmide pLEXSY-hyg2 (Jenabioscience) dans un système *Leishmania tarentolae*. Les protéines tagguées avec une histidine N-terminal ainsi obtenues ont été purifiées sur colonnes HisPur Ni-NTA (Thermo) et éluées sur un gradient d'imidazole.

L'activité hydrolytique a été évaluée pour des sucres liés au paranitrophénol (pNT) et pour les oligosaccharides en utilisant le test à l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS).

D'une part, des solutions de substrats (sucre-pNT) à 1 mM avec 100 mM d'enzyme BfrA ont été mises à 37°C pendant 2h, puis la quantité de pNT libre a été évaluée par l'absorbance à 405 nm de cette molécule. D'autre part, des substrats oligosaccharidiques ont été mis en présence de l'enzyme à une concentration variant entre 10 et 100 nM pendant 20 min et les quantités d'oligosaccharides hydrolysés ont été évaluées par la réduction du DNS en acide 3-amino-5-nitrosalicylique par lecture de la DO à 540 nm. L'influence du pH et de la température sur l'activité enzymatique de BfrA a été évaluée sur le sucrose, pour un gradient de pH de 4 à 10 et de température allant de 20 à 80°C.

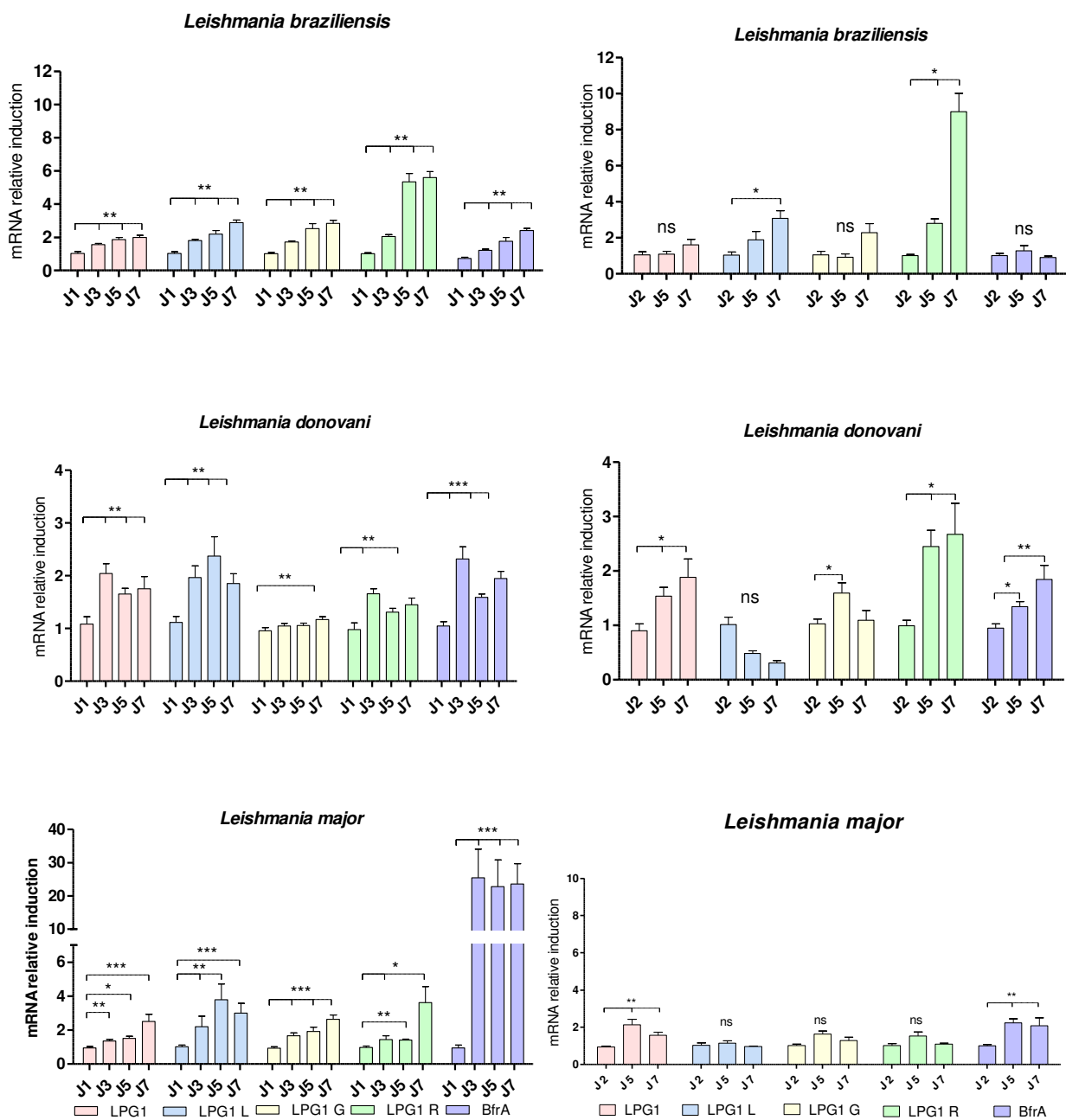
Enfin, la séquence d'acides aminés composant BfrA a été soumise sur ModWeb server grâce au logiciel MODELLER® (225) avec comme base la structure au rayon X de la β -fructofuranosidase (code 3PIJ) de *Bifidobacterium longum* pour modéliser BfrA et le logiciel NAMD (226) a permis de simuler les probables interactions protéines-ligands avec le site actif de l'enzyme. La prédiction des sites potentiels de N ou de O-glycosylation a également été obtenu en soumettant le modèle aux serveurs GlycoEP, NetNGlyc et NetOGlyc (227,228).

2.1.2 Résumé des résultats et discussion

Toutes les enzymes étudiées sont exprimées chez l'amastigote et chez le promastigote des 3 espèces étudiées. Ces 3 espèces sont particulièrement intéressantes, car *L. major* est impliquée dans des atteintes cutanées, *L. braziliensis* dans des atteintes cutanées ou cutanéomuqueuses et enfin *L. donovani* dans la leishmaniose viscérale. Le panel de glycoconjugués de ces espèces est également intéressant car les GIPLs de *L. major* présentent du Galf alors que ceux de *L. donovani* en sont dépourvus (Figure 20), et les LPG de *L. major* et *L. braziliensis* sont branchés chez le promastigote métacyclique mais pas chez le promastigote procyclique alors que celui de *L. donovani* ne présente jamais de chaînes latérales (Tableau 3).

Chez le promastigote, pour toutes les enzymes et toutes les espèces, on observe une augmentation significative au cours du temps de l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme du galactofuranose (Figure 22 A). Les promastigotes de *L. braziliensis* présentent une augmentation allant de 2 fois pour LPG1, LPG1 L et BfrA jusqu'à 6 fois pour LPG1R à J7 ($p=0.022$ pour chaque enzyme entre J1 et J7), avec une cinétique d'augmentation croissante entre J1 et J7. Ceci s'explique par l'augmentation globale du métabolisme des parasites au cours de la phase exponentielle de croissance qui sont au stade de promastigotes procycliques et passent en phase stationnaire au stade métacyclique à partir de J5 environ. LPG1R est significativement plus élevée à J7 chez *L. braziliensis* et *L. major* mais pas chez *L. donovani*, cette enzyme pourrait donc être impliquée dans la biosynthèse des chaînes latérales du LPG, qui ne sont présentes que chez les promastigotes métacycliques de *L. major* et *L. braziliensis*.

De façon intéressante, **chez l'amastigote**, les enzymes sont exprimées à un niveau similaire aux promastigotes, pour les 3 espèces, ce qui montre que l'approche d'inhibition est valide dans des perspectives thérapeutiques, s'intéressant donc aux amastigotes. Même si la paroi de l'amastigote contient peu de LPG, elle contient des GIPLs en grande quantité (50-60%). Malgré l'absence d'implication des galactofuranosyl-transférases LPG1L et R dans le métabolisme des GIPLs (186) ces enzymes sont bien exprimées aux différents temps étudiés, avec une augmentation au cours du temps significative pour *L. braziliensis* et *L. donovani*, concernant surtout LPG1R. De plus, on note que LPG1 et BrFA sont significativement induites, du moins chez *L. major* et *L. donovani* (x2).



A : promastigotes

B : amastigotes

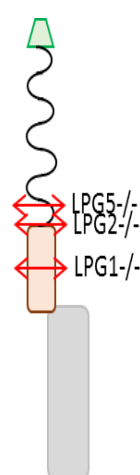
Figure 23 : Expression relative des galactofuranosyltransférases et de la mutase BfrA chez les promastigotes A et chez les amastigotes B de *L. braziliensis*, *L. donovani* et *L. major*.

Graphiques représentant les expressions relatives obtenues lors de 2 expériences avec 5 échantillons de promastigotes et 2 échantillons d'amastigotes par expérience. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

Alors que LPG1, LPG1R et LPG1L sont connues pour exister en une seule copie dans le génome de *Leishmania major*, LPG1G est présente en 3 copies (186), ce qui rend difficile la production de mutants Knock Out (KO) pour LPG1G. Zhang et al ont produit des mutants KO pour les 3 autres GalT et ont ainsi pu montrer que LPG1L et LPG1R n'étaient pas indispensables à la production du LPG, de GP63 ou des GIPLs, mais surtout qu'elles n'étaient pas nécessaires pour l'infectivité et la virulence de *L. major*. Les mutants LPG1 KO sont les plus étudiés, leur paroi présente un LPG tronqué au niveau du cœur hexasaccharidique, avant le Galf, prouvant l'implication de cette GalT dans la synthèse du LPG et des GIPLs contenant le Galf (comme les GIPLs de *L. major* mais pas ceux de *L. donovani*), mais leur PPG est intacte. Cependant ces mutants restent infectieux, même si leur virulence est diminuée (229), du fait de leur sensibilité à la lyse par le complément (197,230).

En dehors de cette GalT, d'autres enzymes impliquées dans la biosynthèse du LPG ou des autres glycoconjugués de la paroi ont été ciblées pour produire des mutants dépourvus de LPG, ou de PPG en particulier. Aucun mutant dépourvu de GIPLs ne s'est avéré viable (231). Les mutants LPG2^{-/-} et LPG5^{-/-} sont déficients pour un transporteur du GDP-mannose ou de l'UDP-galactose respectivement. Ils produisent donc un LPG tronqué après le cœur hexasaccharidique et des GIPLs intacts (quelle que soit l'espèce). Ces mutants ont donc un LPG contenant du Galf mais n'ont pas de phosphoglycane et donc pas de chaîne répétée au niveau du LPG (Tableau 4).

Tableau 4 : Caractéristiques de trois mutants déficients pour le LPG



Enzyme mutée	Impacts sur les glycoconjugués			Impact sur l'infection	
	LPG	PPG	GIPLs	Virulence	Réponse immune
LPG1 ^{-/-} GalT ajoutant le Galf	tronqué	oui	Oui type 1, hybride et type 2 sans Galf	LD √ (197) LMA √ (232) LME √ (233)	√√ IL-12 ↔ IL-4
LPG2 ^{-/-} GDP-mannose transporteur	tronqué	non	oui	LD √√√ (234) LMA √√√ (232) LME √ (233)	LMA (232) : √ IL-12, IFN-γ, IL-2 ∇ IL-4, IL-10 =>réponse humorale
LPG5 ^{-/-} UDP-galactose transporteur	tronqué	non	oui	LMA √ (232) LME √	LMA (232): ↔ IL-12 et IFN-γ √ IL-4 et IL-10

LPG : Lipophosphoglycane ; PPG : Protéophosphoglycane ; GIPLs : Phospholipides de glycoinositol ; LD : *L. donovani* ; LMA : *L. major*, LME : *L. mexicana*

Les mutants déficients pour LPG1 ne perdant que le LPG, vont avoir un panel quasiment normal de glycoconjugués au niveau de la paroi des amastigotes. Favila *et al* ont montré dans un modèle de *L. major* LPG1^{-/-}, que même si leur entrée est ralentie et silencieuse, ces parasites vont ensuite être responsables de lésions identiques à celles produites par des parasites sauvages. L'absence du LPG, va en plus limiter le recrutement des cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL-12 (Tableau 4) (232). Cette étude est particulièrement intéressante, car les mutants LPG1^{-/-} de cette espèce ont des GIPLs tronqués et gardent quand même leur capacité infectieuse pour la forme amastigote, comme cela était déjà connu pour *L. donovani* dont les GIPLs ne contiennent pas de Gal α et ne sont donc pas modifiés pour les mutants LPG1^{-/-} (197). Les amastigotes des mutants LPG2^{-/-} et LPG5^{-/-} ayant un déficit en PPG en plus d'un LPG tronqué, devraient subir un impact plus important que le déficit en LPG1. Néanmoins, Liu *et al.* ont montré que les amastigotes de *L. major* LPG2^{-/-} avaient des capacités d'invasion limitées, mais pouvaient persister indéfiniment en raison d'une réponse humorale inadaptée pour l'élimination des parasites (235), et que le mutant *L. major* LPG5^{-/-} présentait une virulence similaire au mutant LPG1^{-/-}. La variabilité inter-espèce des glycoconjugués de *Leishmania* impacte de ce fait les propriétés des mutants déficients (Tableau 4). Quoi qu'il en soit, il est clair que les modifications de surface des parasites, induites par les mutations, conduisent à une modification de l'interaction hôte-parasite, qui peut aller dans le sens d'une exacerbation de la réponse cellulaire, ou au contraire d'une majoration de l'effet tolérogène du LPG.

Il n'était pas illogique, dans ce contexte, de nous intéresser à l'effet immunomodulateur de composés furanosidiques de synthèse, ce qui a été réalisé dans la suite de ce travail.

Mais dans un premier temps, nous avons voulu tester l'hypothèse qu'en apportant des furanosides exogènes modifiés, il était possible d'interférer dans la biosynthèse des différents glycoconjugués de la paroi à visée anti-parasitaire.

Article 2: Identification, biochemical characterization, and *in-vivo* expression of the intracellular invertase BfrA from the pathogenic parasite *Leishmania major*

Sorya Belaz¹, Thibault Rattier¹, Pierre Lafite, Philippe Moreau, Françoise H. Routier, Florence Robert-Gangneux, Jean-Pierre Gangneux et Richard Daniellou

Cet article écrit en collaboration avec l'ICOA décrit la caractérisation et l'expression de l'une des enzymes impliquée dans la synthèse du LPG, la mutase BfrA.



Identification, biochemical characterization, and *in-vivo* expression of the intracellular invertase BfrA from the pathogenic parasite *Leishmania major*



Sorya Belaz ^{a,b,1}, Thibault Rattier ^{c,1}, Pierre Lafite ^c, Philippe Moreau ^c,
Françoise H. Routier ^d, Florence Robert-Gangneux ^{a,b}, Jean-Pierre Gangneux ^{a,b},
Richard Daniellou ^{c,*}

^a Laboratory of Parasitology-Myology, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, France

^b INSERM U1085/IRSET - Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail, Université Rennes 1, France

^c Univ. Orléans, CNRS, ICOA, UMR 7311, F-45067 Orléans, France

^d Department of Cellular Chemistry, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Strasse 1, 30625 Hannover, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 April 2015

Received in revised form 12 June 2015

Accepted 10 July 2015

Available online 26 July 2015

Keywords:

Invertase

Sucrose

Leishmania

Glycosylation

Leishmaniasis

ABSTRACT

The parasitic life cycle of *Leishmania* includes an extracellular promastigote stage that occurs in the gut of the insect vector. During that period, the sucrose metabolism and more specifically the first glycosidase of this pathway are essential for growth and survival of the parasite. We investigated the expression of the invertase BfrA in the promastigote and amastigote stages of three parasite species representative of the three various clinical forms and of various geographical areas, namely *Leishmania major*, *L. donovani* and *L. braziliensis*. Thereafter, we cloned, overexpressed and biochemically characterized this invertase BfrA from *L. major*, heterologously expressed in both *Escherichia coli* and *L. tarentolae*. For all species, expression levels of BfrA mRNA were correlated to the time of the culture and the parasitic stage (promastigotes > amastigotes). BfrA exhibited no activity when expressed as a glycoprotein in *L. tarentolae* but proved to be an invertase when not glycosylated, yet owing low sequence homology with other invertases from the same family. Our data suggest that BfrA is an original invertase that is located inside the parasite. It is expressed in both parasitic stages, though to a higher extent in promastigotes. This work provides new insight into the parasite sucrose metabolism.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis belongs to the group of neglected tropical diseases, as defined by the World Health Organization (WHO), which includes diseases that are endemic in developing countries.¹ The main foci of leishmaniasis are India, Africa, South America, Mediterranean basin and Middle East.^{2,3} The microorganism responsible for this widespread zoonosis is a kinetoplastid protozoan parasite of the *Leishmania* genus, transmitted through inoculation by female sandflies. About twenty *Leishmania* species can infect humans, and are not only responsible for various clinical forms (cutaneous leishmaniasis, mucocutaneous leishmaniasis or visceral leishmaniasis) and outcomes, depending mainly on the *Leishmania* species, but also on the immune background of the patient. Whereas cutaneous leish-

maniasis is usually a self-healing disease, mucocutaneous leishmaniasis is a more severe non-healing disease, and visceral leishmaniasis is usually fatal in the absence of treatment.⁴

The stages of the parasite life cycle are correlated to the infection stages in the hosts.⁵⁻⁷ In the vector salivary glands, the parasites are found as extracellular promastigotes. After inoculation by the insect bite, parasites are phagocytosed by mammalian macrophages and differentiate to their amastigote intracellular stage. The adaptation of *Leishmania* to two different environments is thus highly critical for its survival and growth. In sandflies, the parasite load was shown to be correlated with the feeding with plants containing high levels of sucrose,⁸⁻¹¹ which indicates a critical role for the enzymes involved in sucrose transport and metabolism for *Leishmania* survival and growth in insect gut. Several pathways have been described for sucrose metabolism,¹² involving either an extracellular^{13,14} or an intracellular¹⁵ invertase. Recently, a report from Lyda et al.¹⁶ identified and characterized a secreted invertase from the leishmania species *donovani* and *mexicana*, highlighting the potentiality of these enzymes as a therapeutic target to disrupt the parasite metabolism.

* Corresponding author. Univ. Orléans, CNRS, ICOA, UMR 7311, F-45067 Orléans, France. Tel.: +33238494978; fax: +33238417281.

E-mail address: richard.daniellou@univ-orleans.fr (R. Daniellou).

¹ These authors participated equally to the work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2015.07.001>

0008-6215/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

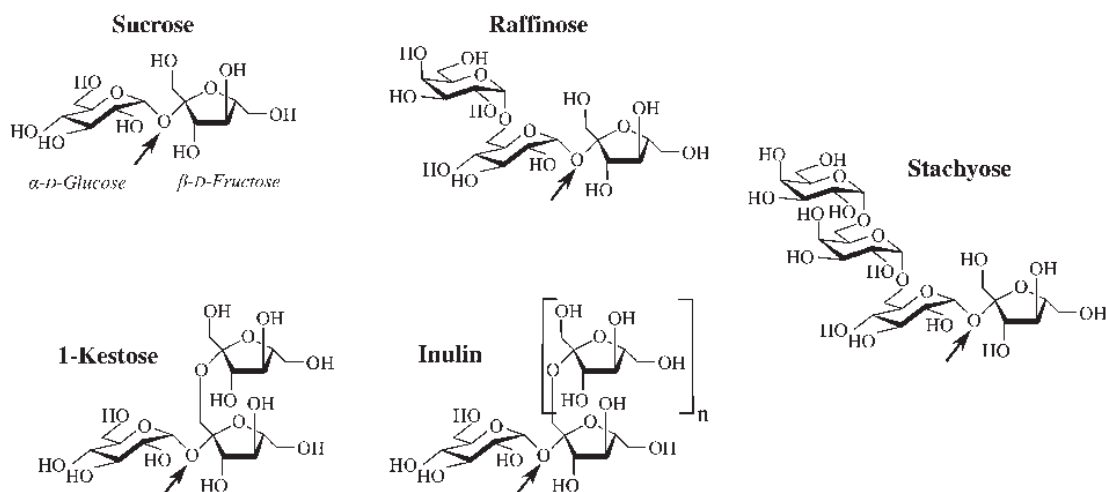


Fig. 1. Sucrose and sucrose-containing substrates tested in this study. The glucoside and fructoside moieties of sucrose are indicated, and the hydrolysis site is shown by an arrow.

Invertases (EC 3.2.1.26), or β -fructofuranosidases, are glycosides hydrolases (GHs) that catalyze the hydrolysis of sucrose into fructose and glucose (Fig. 1) by the recognition of β -D-fructose in the enzyme active site. Invertases belong to the CAZy family GH32 that contains invertases, fructan hydrolases, fructosyltransferases and sucrose-6-phosphate hydrolases.¹⁷ Several X-ray structures of GH32 family from different organisms have been reported in the literature, including bacteria,^{18–21} fungi,^{22,23} yeast^{24–26} and plants.^{27–34} Five putative genes encoding invertases have been identified in *Leishmania* genomes,^{35–38} but only one protein was cloned and enzymatically characterized as an extracellular invertase.¹⁶ Unlike *Leishmania*, no invertase is present in human genome, but another GH is responsible for sucrose hydrolysis, i.e. sucrase or α -D-glucosidase, which interacts with the α -D-glucosyl moiety of sucrose (Fig. 1).

The importance of *Leishmania* invertases in the survival and growth of the parasite in the insect vector, as well as their absence in humans, make them potential target for the design of anti-*Leishmania* active compounds.¹⁶ Analyzing their enzymatic behavior, as well as their expression level during the parasite life cycle, is thus necessary to better understand their biological role. Herein, we describe the cloning, purification and biochemical characterization of the first intracellular *Leishmania* invertase, named BfrA. Noteworthy, this particular enzyme is only highly expressed in the promastigote stage of the parasite, thus is probably essential for the parasite sucrose metabolism in the insect vector.

2. Materials and methods

2.1. Sequence analysis and primers design

L. major, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. mexicana*, and *L. braziliensis* genomes were retrieved from GeneBank database. BlastP³⁹ was used to identify invertases in these genomes, using CAZy database (www.cazy.org).⁴⁰ GH32 protein sequences were retrieved from UniProt database. Clustal Omega EMBL server was used for multiple alignments,^{41,42} and Phylogeny server was used for phylogenetic tree generation.⁴³ Specific primers were designed for RT-qPCR using CLC Workbench[®] software (Qiagen).

2.2. Promastigote parasite cultures

Leishmania strains were isolated from human patients presenting with visceral leishmaniasis (*L. donovani*) or cutaneous leishmaniasis (*L. major* and *L. braziliensis*). Parasites were grown on NNN medium, then identified and typed by the Centre National de Référence des Leishmanioses (Montpellier, France). *Leishmania* promastigotes were amplified and maintained by serial passages in Schneider's drosophila medium (Sigma[®]) supplemented with 10% decomplemented fetal calf serum (Invitrogen[®]) at 27 °C. To study the kinetics of *bfrA* expression in promastigotes, samples of cultures were taken at days 1, 3, 5 and 7.

2.3. Human blood monocytes derived macrophages

Human blood monocytes-derived macrophages were obtained by purifying monocytes from peripheral blood mononuclear cells obtained from buffy coats (supplied by Etablissement Français du Sang, Rennes, France). M-CSF-mediated differentiation of monocytes was conducted for 6 days in 6-well culture plates to obtain 10⁶ primary human macrophages per well. Differentiation and culture was performed in RPMI-1640 medium (Gibco[®]) supplemented with 10% decomplemented fetal calf serum and antibiotics (100 UI/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin), as previously described.⁴⁴

2.4. *Leishmania amastigotes*

Leishmania promastigotes grown at stationary phase (>5 days of culture) were used to infect human macrophages overnight (doi 10:1). After 3 washes, infected macrophages were cultured for another 2, 5 or 7 days, then supernatant was discarded and cells were lysed for mRNA extraction. All time points were performed in quadruplicates for each parasite species and the whole experiment was repeated at least twice.

2.5. Quantification of *bfrA* mRNA induction

Promastigotes were counted and 10⁷ promastigotes of each strain was lysed for RNA extraction at each time point. All time points were

performed in quadruplicates for each parasite species. Kinetics was repeated at least twice for each species. Total RNA were extracted with Qiagen RNeasy mini kit® and eluted in 30 µL. Then, 2 µg of each RNA sample was reverse-transcribed using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystems™). Primers were designed to amplify *bfrA* and actin in 3 species of *Leishmania*. For *bfrA* amplification from *L. major* and *L. donovani*, forward and reverse primers were 5'-GCTATAATGAGGCGACAGGG-3' and 5'-AAGGATCTGAGCATCGCTGT-3', respectively. Forward and reverse primers used for *L. braziliensis bfrA* were 5'-TTCTCTTACCACGCAGGAC-3' and 5'-CCTGGTGATTCCGATCGTA-3', respectively. Actin expression was quantified using the following primers: forward 5'-CGATAAAGCCGAAGGTGGTT-3' and reverse 5'-CCAGACTCGTCTACTCGCT-3' for *L. donovani* and *L. major*, and forward 5'-ATCAAACCAAGGTGGTTGC-3', reverse 5'-CCAGACTCGTCTACTCGCT-3' for *L. braziliensis*. Amplification was performed in a final volume of 10 µL containing 2 µL cDNA, 8 µL SYBR® green PCR master mix (Applied Biosystems™) and 3 µM of each primer. PCR reaction was performed on a 7900 HT fast real time PCR system® (Applied Biosystems™) and consisted of 2 min at 50 °C, then 95 °C for 10 min and 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Melting curves were added at the end of each run to check amplification specificity. Each sample was amplified in duplicate. *bfrA* induction was calculated by comparison to actin expression, as previously described.⁴⁵ Statistical analysis was performed using Mann–Whitney test and GraphPad Prism 5® software.

2.6. Cloning, expression and purification of BfrA protein in *E. coli*

bfrA gene (locus LmjF.23.0880 in chromosome 23) was amplified by PCR from *L. major* genomic DNA using the following primers: 5'-TTGGATCCAGCTCTCAAGCGCAGCA-3' (forward) and 5'-TTAAGCTTTCAGTGCCTCACCGTCGC-3' (reverse). BamHI and HindIII restriction sites (underlined) were respectively added up- and downstream of the gene for subsequent cloning in pET-28a(+) expression vector (Novagen). Rosetta (DE3) *E. coli* cells were used for N-terminal His-tagged protein expression. Cells were grown in LB medium at 37 °C until OD₆₀₀ reached 0.5, and then were induced by 0.5 mM IPTG at 25 °C overnight. Cells were harvested and resuspended in 50 mM Tris buffer (pH 8.5) containing 100 mM of NaCl, lysed by five freeze–thaw cycles. Lysate was clarified by centrifugation (20,000 g, 30 min). Supernatant was filtered (0.45 µm), loaded on a HisPur Ni-NTA column (Thermo), then bound protein was eluted by an imidazole gradient (10–500 mM).

2.7. Cloning, expression and purification of BfrA in *Leishmania tarentolae*

bfrA gene was initially amplified from genomic DNA by PCR using the following primers: 5'-TCTAGACTTCTCAAGCGCAGCAGCGG-3' (forward) and 5'-GTGCCTCACCGTCGCCTCAGCTCCACATT-3' (reverse). This initial PCR enabled the upstream addition of a XbaI restriction site (underlined), and the silent removal of a KpnI restriction site located near the 5' end of the gene. Then a second PCR was run using the same forward primer and the following reverse primer that added a KpnI restriction site (underlined) downstream of the gene: TGGTACCGTCCTCACCGTCGCCTT. Amplicon was then inserted in pLEXSY-hyg2 plasmid (Jena Bioscience) using added restriction sites and the insert sequence was checked by sequencing. This construct was designed so that the corresponding recombinant protein was N-terminally fused with a secretion signal peptide, and C-terminally fused with a polyhistidine tag. The resulting pLEXSY-hyg2-*bfrA* plasmid was then used to transfect *L. tarentolae* P10 cells (Jena Bioscience),⁴⁶ following the manufacturer protocol. Briefly, cells were grown in BHI medium and concentrated to 2 × 10⁸ cells/mL. Then, electroporation was run by

two pulses at 25 mF, 3.75 V/cm, with a resting time of 10 s between each pulse. Then, after an overnight culture in non-selective BHI medium, selective antibiotic (hygromycin-100 µg/mL) was added and transfected P10 were selected in liquid culture. After 2 transfers in selective medium, genomic integration of the expression cassette into the *ssu* locus was confirmed by diagnostic PCR following the manufacturer protocol. The corresponding BfrA^{leish} recombinant protein was then produced by cultivating transfected P10 in selective medium. After 24 h culture, cells were harvested, and the medium was filtrated and loaded on a HisPur Ni-NTA column. Elution and purification of BfrA^{leish} protein was carried out as described for *E. coli* recombinant BfrA protein.

2.8. Enzymatic assays

Initial screening of hydrolytic activity of BfrA was assayed using sugars linked to paranitrophenol (pNP) as substrates.⁴⁷ Enzymatic reaction was carried out at 37 °C for 2 hours in a mixture containing 100 nM BfrA and 1 mM substrate, buffered with phosphate (10 mM, pH 7.5). Reaction was stopped using Na₂CO₃ (0.5 M), and free pNP was detected at 405 nm. For enzymatic reactions using oligosaccharides as substrates, the amount of reduced sugars formed was detected using 3,5-dinitrosalicylic acid assay.⁴⁸ Briefly, after reaction of the enzyme (10–100 nM) with the substrate (20 min), DNS reagent was added (DNS 0.5% m/v, NaOH 0.8% m/v, tartrate 15% m/v final concentrations) and the solution was boiled for 10 min. After cooling, reduced DNS was quantified at 540 nm. Calibration curves were obtained using standard solutions of glucose:fructose 1:1 (0.1–1 mM). pH and temperature dependence of BfrA activity were assayed with sucrose as substrate and using respectively citrate–phosphate buffer ranging from pH 4 to 10 and temperature from 20 to 80 °C as experimental conditions. As incubation time for temperature studies is critical, it was set to 20 minutes. For all other enzymatic assays, temperature was set to 37 °C and pH to 6. Kinetic data from three independent experiments were analyzed and plotted using Prism 5 software® (GraphPad).

2.9. Molecular modeling

The amino acid sequence of BfrA was submitted to the ModWeb server (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/scgi/modweb.cgi>) using MODELLER® software.⁴⁹ Template used for homology modeling was the X-ray structure reported for *Bifidobacterium longum* β-fructofuranosidase²⁰ (PDB code 3PIJ). NAMD software⁵⁰ was used to perform all molecular dynamics (MD) simulations. Oligosaccharide ligands were created using GLYCAM06⁵¹ and Glycam Web server (<http://www.glycam.com>). BfrA model was initially immersed in a periodic water box (TIP3) and neutralized by adding Na⁺ ions. This model was equilibrated with several cycles of minimizations (steepest descent, 10,000 steps) and MD simulations (50–200 K, 500 ps). Final minimization (steepest descent, 10,000 steps) was then run to obtain the final model of free enzyme. Dynamic docking of substrate into BfrA active site was performed as previously reported for other proteins–ligand complexes models.^{52–54} Ligands were placed in BfrA model active site using fructose orientation in 3PIJ X-ray structure. The complex was then equilibrated by keeping protein backbone restrained on the model conformation. Finally, a MD simulation (200 K, 1 ns) was run and individual snapshots were randomly extracted and minimized to obtain final complex models. N- and O-glycosylation site predictions were performed using GlycoEP,⁵⁵ NetNGlyc, and NetOGlyc servers.⁵⁶

3. Results and discussion

3.1. Sequence alignment of *Leishmania* invertases

In order to identify the homologies between *Leishmania* putative invertases and other GH32 enzymes, a sequence alignment was performed. The peptidic sequences of all characterized GH32 enzymes in CaZY database were retrieved and aligned together with the sequences of GH32 enzymes found in *L. major*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. donovani*, and *L. braziliensis*. Six genes coding for GH32 enzymes were identified in several chromosomes: two on chromosome 4, two on chromosome 23, one on chromosome 27, and one either on chromosome 35 (*L. major*, *L. infantum*, *L. donovani*) or on chromosome 34 (*L. mexicana*, *L. braziliensis*). The corresponding enzymes are relatively close between *Leishmania* species (above 60% identity—except for *L. mexicana* proteins that exhibit lower identity percentage). These six proteins can be classified in two groups. The first group gathers genes located on chromosomes 23 and 27, coding for proteins that are above 45% identity, whereas the second group gathers genes from chromosome 4 and 35 (or 34) exhibiting identity percentage for the corresponding proteins above 35%. Between the two groups, the identity percentage falls to less than 18%.

To identify the sequence relationships for these six proteins, a phylogenetic tree was calculated from the multiple sequence alignment with the GH32 enzymes. For more clarity, a simplified version of the tree is represented in Fig. 2. This tree indicates that the enzymes from the first group (corresponding genes on chromosomes 23 and 27) are close to sucrose-6-phosphate hydrolases whereas the second group of *Leishmania* GH32 enzymes (genes on chromosomes 4 and 35) is closely related to plant invertases.¹⁶

In the first group, the close proximity (between 20% and 40% sequence identity) of three GH32 *Leishmania* enzymes with sucrose-6-phosphate hydrolases is striking, as no evidence of carbohydrate metabolism involving sucrose-6-phosphate was ever described for *Leishmania* or trypanosomatids. In bacteria, the phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system has been widely studied since its discovery in 1964,⁵⁷ and several sucrose-6-phosphate hydrolases have been characterized, all of them found in bacteria.^{58–63} Thus, the sequential proximity between *Leishmania* invertases from group 1 and sucrose-6-phosphate hydrolases raises the question of their potential involvement in sucrose metabolism.

The localization of catalytic residues of GH32 enzymes has been well documented.²⁹ Table 1 presents the nature of the amino acids found in conserved catalytic motifs of group 1 *Leishmania* invertases. Three carboxylic acids are necessary in the catalysis by GH32: the canonical nucleophile and acid/base, which are found in all GHs.⁶⁴ A third carboxylic residue was found to be involved for the catalysis, and was proposed to act as transition state stabilizer.⁶⁵ This particular residue, as well as the acid/base amino acid, is found in all *Leishmania* invertases. However, two invertases lack the critical nucleophilic residue in the corresponding conserved motif. Thus, only the enzyme that exhibited all three catalytic amino acids was selected for further analysis (respectively in *L. major* protein: Asp56, Glu237, and Asp180). The corresponding genes (renamed *bfrA* as the closely related *T. maritima* enzyme⁶⁶) were annotated with the locus tags *LmjF.23.0880*, *LinJ.23.1070*, *LdBPK_231060.1*, *LbrM.23.0990*, and *LmxM.23.0880* in *L. major*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. braziliensis*, and *L. mexicana* genomes, respectively.^{35,36} The conservation of *bfrA* gene among the five *Leishmania* species is high, as the sequence homology for BfrA protein was calculated to be above 90%.

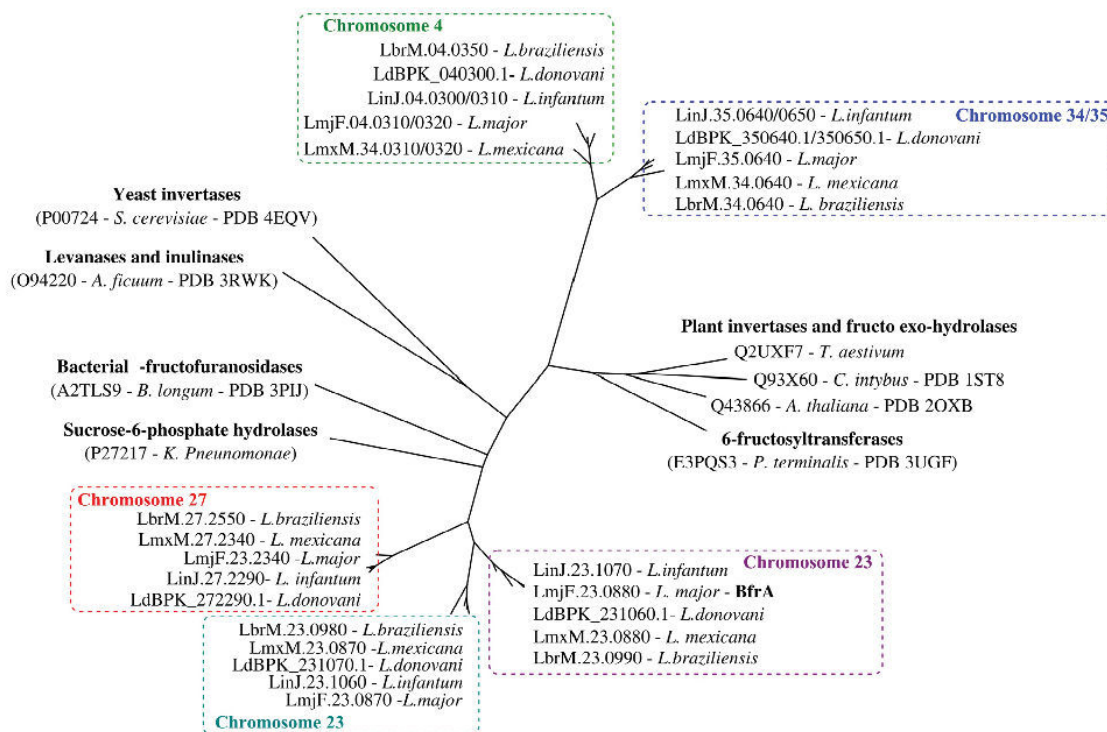


Fig. 2. Phylogenetic tree of GH32 enzymes. GH32 characterized enzymes were retrieved from CaZY and Uniprot databases and aligned using Clustal W2. *Leishmania* ortholog GH32 enzymes are indicated: BfrA, Lmaj.23.870, Lmaj.27.2340, Lmaj.35.0640, Lmaj.04.0310, and Lmaj.04.0320 are the corresponding proteins for *L. major*.

Table 1

Sequence alignment of conserved motifs in the active sites found in resolved GH32 structures and *L. major* invertases related to sucrose-6-phosphate. The 'catalytic carboxylic triad'²⁹ found in GH32 is underlined: the nucleophile, the transition state (TS) stabilizer, and the acid/base catalyst. The number residue in corresponding sequence is indicated in parentheses. Identical alignments were obtained with other *Leishmania* species

Species	PDB ID/Locus	Function	Conserved motifs (residue number)		
			Nucleophile	TS stabilizer	Acid/base
<i>Cichorium intybus</i>	1ST8	β -Fructoexohydrolase	WMNDPNG (60)	RDP (185)	WECPD (239)
<i>Thermotoga maritima</i>	1UYF	Invertase	WMNDPNG (17)	RDP (138)	IECPD (190)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2AC1	Cell-wall invertase	WMNDPNG (66)	RDP (192)	WECPD (246)
<i>Bifidobacterium longum</i>	3PIJ	β -Fructofuranosidase	WINDPNG (54)	RDP (181)	IECPD (235)
<i>Aspergillus ficuum</i>	3RWK	Endo-inulinase	WMNEPNG (43)	RDP (176)	WEVPD (233)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4EQV	Invertase	WMNDPNG (42)	RDP (171)	YECPG (223)
<i>L. major</i>	Chromosome 23 <i>LmjF.23.0870</i>	—	WMGVPCG (63)	RDP (194)	WECPD (251)
	Chromosome 23 <i>LmjF.23.0880</i> (BfrA)	—	WMNDPTG (56)	RDP (180)	WECPD (237)
	Chromosome 27 <i>LmjF.27.2340</i>	—	SMSAPCG (40)	RDP (162)	WEHPC (218)

3.2. mRNA expression of bfrA

bfrA mRNA expression was investigated in the promastigote and amastigote stages of three parasite species representative of the three various clinical forms and of various geographical areas, namely *L. major*, *L. donovani* and *L. braziliensis*.

In promastigote cultures, induction of BfrA mRNA increased over time in all species, peaking at day 7 (Fig. 3A). Maximal mRNA induction was observed for *L. major* ($\times 5.7$ on day 7, $p < 0.05$), compared to *L. braziliensis* ($\times 3.3$, $p < 0.01$) and *L. donovani* ($\times 2$, $p < 0.01$). By contrast, *bfrA* was only slightly expressed in amastigotes and did not vary significantly over time in *L. donovani* and *L. braziliensis* (Fig. 3B). In *L. major* amastigotes, *bfrA* was significantly induced on day 5 ($p < 0.05$) and on day 7 ($p < 0.05$), though to a moderate extent ($\times 1.94$ and $\times 1.58$ compared to day 2, respectively).

A recent transcriptomic study on *L. major* genome during the promastigote axenic stage also detected the expression of *bfrA* gene.⁶⁷ Yet, this study did not compare the evolution of this expression during parasite growth, as well as comparison between species and with amastigotes. Our study demonstrated that BfrA

was present in both parasite stages, yet mainly expressed in promastigotes of the three species. This is in agreement with several transcriptomic studies on amastigotes that did not detect this enzyme as up-regulated during this life-stage.^{68–71} Its induction increased over time and the strongest mRNA induction was observed at day 7, suggesting that invertase expression is highly expressed by promastigotes at stationary phase and could be important for the development and growth of the parasite in the sandfly gut.

3.3. Cloning and heterologous expression of *L. major* BfrA protein in *E. coli*

bfrA gene was amplified from *L. major* genomic DNA and cloned into expression vector pET28a(+) for production in *E. coli*. This vector adds a N-terminal His-Tag that was used for protein purification after cell lysis. Purification on Ni-NTA resin yielded good amounts of protein (4 mg/culture liter) (Fig. S1). This purified enzyme was further used to assess its catalytic activity.

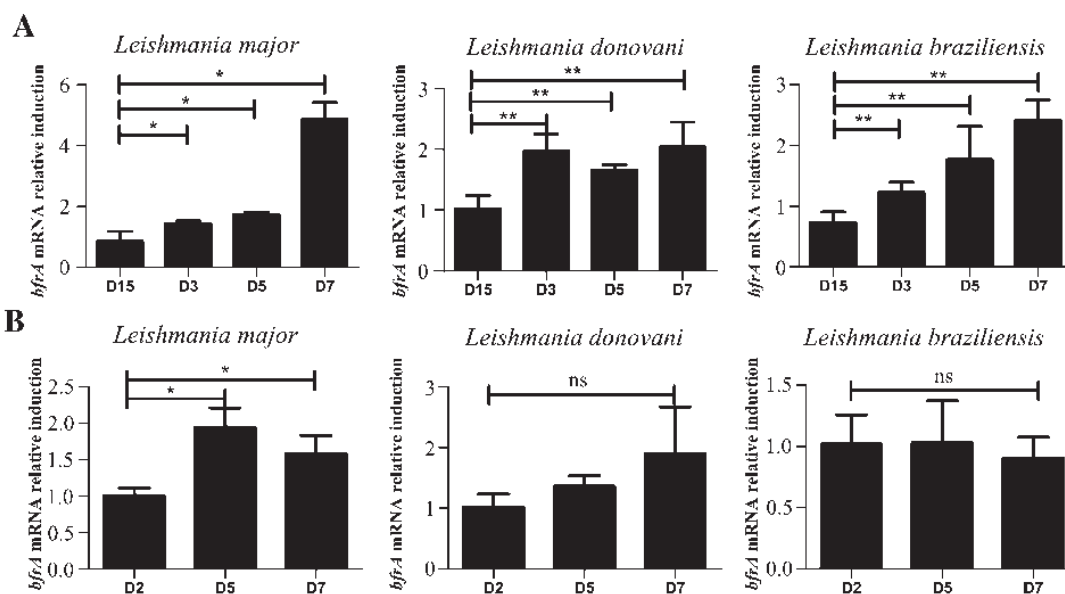


Fig. 3. Quantification of BfrA induction in *L. major*, *L. donovani*, and *L. braziliensis* promastigotes (A) and intracellular amastigotes (B) at the indicated time points. Results were normalized first using actin expression and then using day 1 expression as the 100% reference. Data are representative of two experiments performed in quadruplicates and are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance is indicated as ns: non significant $p > 0.05$, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

3.4. BfrA is a β -fructofuranosidase with a low specificity for sucrose

A first series of assays was performed using several pNP-sugars as substrates (Fig. S2). Potentially cleaved pNP could be easily monitored and quantified at 405 nm. However, BfrA exhibited no hydrolytic activity toward any of the 20 pNP-sugars tested. In particular, the absence of hydrolysis when using pNP- α -D-glucopyranose as substrates confirmed that BfrA is not a sucrose, as it did not recognize the α -D-glucopyranose moiety of sucrose (Fig. 1).

Sucrose hydrolysis by BfrA was then assessed using the classical 3,5-dinitrosalicylic assay⁴⁸ to quantify the amount of reduced sugar. After calibration using equimolar concentrations of fructose and glucose, sucrose hydrolysis was detected. It followed the classical Michaelis–Menten model (Fig. 4A) and the catalytic constants were determined and calculated (Table 2). The Michaelis constant K_M observed (152 mM) and the catalytic rate k_{cat} (114 s⁻¹) are similar to those reported for other GH32 enzymes.^{25,66,72} Like all glycosidases, the hydrolytic activity is pH-dependent, exhibiting an optimal pH in a narrow range between 5 and 7 (Fig. 4B), significantly decreasing above pH 7. As it will be seen later, this is in

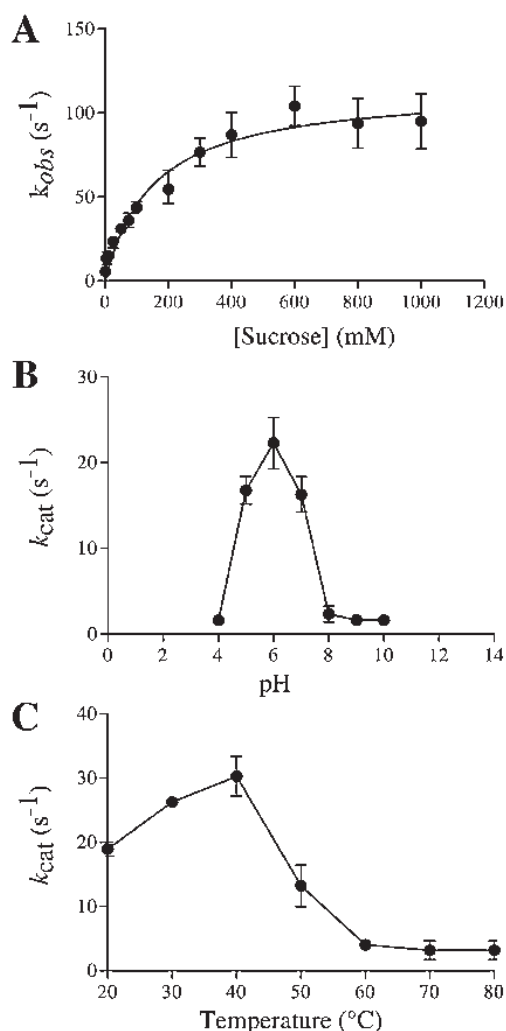


Fig. 4. (A) Michaelis–Menten fit of sucrose hydrolysis catalyzed by BfrA. pH (B) and temperature (C) dependence of sucrose hydrolysis by BfrA. Mean values and SD error bars were calculated from 3 independent experiments.

Table 2

Kinetic parameters of recombinant BfrA for the hydrolysis of several fructose-containing polysaccharides. Substrate structures are depicted in Fig. 1

	Relative activity ^a (%)	K_M^b (mM)	k_{cat}^b (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ .mM ⁻¹)
Sucrose	100	152 ± 30	114 ± 7	0.75
Raffinose	109	141 ± 30	118 ± 14	0.86
Stachyose	297	168 ± 42	409 ± 27	2.4
1-Kestose	5.6	n.r.	n.r.	n.r.
Inulin	10.9	0.9 ± 0.3 ^c	4.2 ± 0.2	4.6 ^c

^a Activity measured for a substrate concentration of 100 mM (18 g/L for inulin).
^b Mean values and standard deviations were calculated from 3 independent experiments.

^c For inulin, K_M is expressed in g/L.

n.r.: non relevant.

agreement with the intracellular localization of BfrA, as it has been estimated that *Leishmania* can maintain an intracellular pH close to 7, whereas the extracellular pH is more alkaline.⁷³ Optimal temperature for enzymatic activity was 40 °C (Fig. 4C), although remaining high at physiological temperatures of the host organisms (27–28 °C for insects, 37 °C in humans).

Raffinose and stachyose are β (1→6)-galactosylated derivatives of sucrose that are commonly found in vegetables. Kestose and inulin are fructan polysaccharides that are found in many plants, and were reported to be specific substrates for several GH32 enzymes.^{20,74} For raffinose and stachyose, the measured activity and catalytic constants were of the same order of magnitude, but stachyose exhibited a higher k_{cat} value (409 vs. 114 s⁻¹). Interestingly, the structure of the substrate shows that the number of branched β (1→6)-galactoses to the glucose moiety of sucrose is correlated to an increase of the enzyme specificity (e.g. k_{cat}/K_M). Unlike galactosylated sucrose derivatives, it appeared that fructan polysaccharides are not efficient substrates of BfrA, since the K_M and k_{cat} constants could not be determined for kestose, and inulin was only slowly hydrolyzed (Table 2). This was unexpected, as the closest proteins in the phylogenetic tree have both fructan and sucrose hydrolysis activity.^{20,66} GH32 enzymes can be classified according to their specificity for fructan vs. sucrose.⁷⁵ Pure invertases will be specific for sucrose (with a K_M value below 10 mM), whereas inulinases and fructoexohydrolases are more versatile and can hydrolyze more compounds, specifically fructan-containing polysaccharides. This puts into question the endogenous activity and substrate of BfrA, as no compounds tested exhibited low K_M constant, neither sucrose nor fructan polysaccharides.

3.5. Modeling of invertase and mechanistical implications

A homology model of the protein was built, and substrate docking simulations were run. So far, eleven X-ray structures of GH32 enzymes have been solved and reported.^{18–28,31–34} Among them, the X-ray structure of *B. longum* β -D-fructofuranosidase (PDB code 3PIJ)²⁰ was chosen, as the sequence homology between the template and target proteins is 55% (35% identity). The optimized model is shown in Fig. S3. It exhibits the classical domains found in GH32 structures: an N-terminal five-bladed β -propeller and a C-terminal β -sandwich module.²⁰ The identity of catalytic residues of BfrA predicted from sequence alignment (Table 1) was then confirmed by structural alignment with GH32 enzymes: Asp56 acts as the nucleophile, whereas Glu237 is the acid/base residue involved in the reaction. Docking of sucrose into BfrA active site was then performed to identify and localize the active site residues involved in substrate binding (Fig. S3A). As previously reported for other GH32 enzymes, the binding of sucrose is mainly done through a network of hydrogen bonds with the fructose moiety.^{19,22,26,29,34,65}

3.6. Production of BfrA_{leish} in *L. tarentolae*

BfrA sequence was submitted to SignalP server^{76,77} and no canonic secretion signal peptides were detected, thus indicating the most likely intracellular localization of the protein. Still, to gain insight about the cellular localization of BfrA, we decided to express it in a eukaryotic host system similar to *L. major*. *L. tarentolae* was chosen as an expression host to produce BfrA because of its close genetic proximity with *L. major*. Unfortunately the cloning and expression of the intracellular form of BfrA could not be successfully achieved in our hands. Therefore, the cloning strategy was selected to produce a recombinant BfrA_{leish} fused with a secretory sequence peptide. The glycosylation pattern of secreted or membrane proteins by *L. tarentolae* was expected to be identical to that of *L. major*.⁷⁸ As a consequence, secreted BfrA_{leish} would be used to study the influence of glycosylation on protein activity, as *L. tarentolae* was shown to *O*- and *N*-glycosylate secreted recombinant proteins⁷⁹ as well as assessing the potential secretion of the protein in *L. major*. In our case, *N*- and *O*-glycosylation putative sites were predicted using two programs: GlycoEP and NetGlyc.^{55,56} These programs identified four potentially *N*-glycosylated asparagines, namely Asn38, 380, 389, and 494, and six *O*-glycosylation putative sites, Ser 36, and Thr 17, 40, 140, and 503 (Fig. S3B).

bfrA gene was cloned in the expression vector, and *L. tarentolae* cells were successfully transfected with the corresponding construct. Recombinant protein was further purified by affinity chromatography from the cultivation medium and SDS-PAGE analysis of the purified extract demonstrated the purity and the glycosylation of BfrA_{leish}. However, this recombinant enzyme was not able to hydrolyze any of the substrates recognized by BfrA expressed in *E. coli*. Thus, glycosylation of the secreted protein might prevent the substrates to be efficiently hydrolyzed by BfrA_{leish}.

Still, this gives strong clues about the cellular localization of BfrA in *L. major* cells. Sucrose hydrolysis activity was previously detected not only inside *Leishmania* cells¹⁵ but also as an extracellular activity.¹⁴ According to our results, BfrA can be hypothesized to be the intracellular invertase. Moreover, a recent work identified one of the secreted invertase,¹⁶ which gene is located on the chromosome 4 of *L. major* (see Fig. 2). In addition, Gontijo et al. determined the catalytic constants for the secreted sucrose-hydrolyzing enzyme.¹⁴ K_M and k_{cat} constants were respectively 4 mM and $1.6\ s^{-1}$. These constants are not consistent with the K_M and k_{cat} values determined for BfrA (Table 1). In our case, the low activity of the enzyme outside the pH 5–7 range is also consistent with the intracellular pH reported for *Leishmania*. Moreover, when BfrA sequence was submitted to SignalP server^{76,77} no signal peptides were detected. Experimentally, expression of BfrA as a secreted protein in *Leishmania* cells (BfrA_{leish}) yielded an inactive protein. Combining these results leads to the convincing assumptions that BfrA is an intracellular invertase.

4. Conclusion

In this work, we provide the description of an invertase of the GH32 family in the *Leishmania* genus, the first enzyme of the sucrose metabolism and bring new insight into the parasitic metabolic pathways. Despite owing common biochemical characteristics for this family, its poor sequence homology with other GH32 invertases is of high interest in view of medical chemistry development. Our data also suggest that the glycosylated form of BfrA is inactive and that its location is most likely intracellular. It is highly expressed in the promastigote stage, and to a lesser extent in amastigote stage of the three studied parasitic species, making it a putative target for antileishmanian drug development.

Acknowledgments

We thank Christelle Manuel for technical assistance.

Appendix: Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.carres.2015.07.001.

References

- Butler D. *Nature* 2007;**449**:158–9.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. *PLoS ONE* 2012;**7**:e35671.
- Van Griensven J, Zijlstra EE, Hailu A. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;**8**:e3023.
- Hussain H, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, Green IR, Gibbons S. *Chem Rev* 2014;**114**:10369–428.
- Alexander J, Russell DG. In: Baker JR, Muller R, editors. *Advances in parasitology*. Academic Press; 1992, p. 175–254.
- Sacks DL. *Exp Parasitol* 1989;**69**:100–3.
- Zilberstein D, Shapira M. *Annu Rev Microbiol* 1994;**48**:449–70.
- Bray RS. *J Protozool* 1983;**30**:314–22.
- Schlein Y. *Parasitol Today* 1986;**2**:175–7.
- Schlein Y, Jacobson RL. *Med Vet Entomol* 1999;**13**:65–71.
- Schlein Y, Jacobson RL. *Nature* 2001;**414**:168.
- Chatterjee AN, Ghosh JJ. *Nature* 1960;**185**:322.
- Blum JJ, Oppendoes FR. *J Eukaryot Microbiol* 1994;**41**:228–31.
- Gontijo NF, Melo MN, Riani EB, Almeida-Silva S, Mares-Guia ML. *Exp Parasitol* 1996;**83**:117–24.
- Singh A, Mandal D. *Int J Parasitol* 2011;**41**:817–26.
- Lyda TA, Joshi MB, Andersen JF, Kelada AY, Owings JP, Bates PA, et al. *Mol Cell Biochem* 2015;**404**:53–77.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V. *Nucleic Acids Res* 2009;**37**:D233–8.
- Alberto F, Bignon C, Sulzenbacher G, Henrissat B, Czjzek M. *J Biol Chem* 2004;**279**:18903–10.
- Alberto F, Jordi E, Henrissat B, Czjzek M. *Biochem J* 2006;**395**:457–62.
- Bujacz A, Jedrzejczak-Krzepkowska M, Bielecki S, Redzymba I, Bujacz G. *FEBS J* 2011;**278**:1728–44.
- Park J, Kim M-I, Park Y-D, Shin I, Cha J, Kim CH, et al. *J Biol Chem* 2012;**287**:31233–41.
- Nagem RaP, Rojas AL, Komeeva OS, Eneyskaya EV, Kulmuniskaya AA, et al. *J Mol Biol* 2004;**344**:471–80.
- Pouyez J, Mayard A, Vandamme A-M, Roussel G, Perpète EA, Wouters J, et al. *Biochimie* 2012;**94**:2423–30.
- Álvoro-Benito M, Polo A, González B, Fernández-Lobato M, Sanz-Aparicio J. *J Biol Chem* 2010;**285**:13930–41.
- Álvoro-Benito M, Sainz-Polo MA, González-Pérez D, González B, Plou FJ, Fernández-Lobato M, et al. *J Biol Chem* 2012;**287**:19674–86.
- Sainz-Polo MA, Ramírez-Escudero M, Lafriya A, González B, Marín-Navarro J, Polaina J, et al. *J Biol Chem* 2013;**288**:9755–66.
- Hothorn M, Van Den Ende W, Lammens W, Rybin V, Scheffzek K. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;**107**:17427–32.
- Hothorn M, Wolf S, Aloy P, Greiner S, Scheffzek K. *Plant Cell* 2004;**16**:3437–47.
- Lammens W, Le Roy K, Schroeven L, Van Laere A, Rabijns A, Van den Ende W. *J Exp Bot* 2009;**60**:727–40.
- Lammens W, Le Roy K, Yuan S, Vergauwen R, Rabijns A, Van Laere A, et al. *Plant J* 2012;**70**:205–19.
- Matrai J, Lammens W, Jonckheer A, Le Roy K, Rabijns A, Van den Ende W, et al. *Proteins* 2008;**71**:552–64.
- Verhaest M, Ende WVD, Roy KL, De Ranter CJ, Laere AV, Rabijns A. *Plant J* 2005;**41**:400–11.
- Verhaest M, Lammens W, Le Roy K, De Coninck B, De Ranter CJ, Van Laere A, et al. *Acta Crystallogr D* 2006;**62**:1555–63.
- Verhaest M, Lammens W, Le Roy K, De Ranter CJ, Van Laere A, Rabijns A, et al. *New Phytol* 2007;**174**:90–100.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. *Science* 2005;**309**:436–42.
- Downing T, Imamura H, Decuyper S, Clark TG, Coombs GH, Cotton JA, et al. *Genome Res* 2011;**21**:2143–56.
- Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. *Nat Genet* 2007;**39**:839–47.
- Rogers MB, Hillel JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, Depledge DP, et al. *Genome Res* 2011.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. *J Mol Biol* 1990;**215**:403–10.
- Henrissat B. *Biochem J* 1991;**280**(Pt 2):309–16.
- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, et al. *Nucleic Acids Res* 2010;**38**:W695–9.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. *Mol Syst Biol* 2011;**7**:539.
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, et al. *Nucleic Acids Res* 2008;**36**:W465–9.

44. Suleman M, Gangneux J-P, Legentil L, Belaz S, Cabezas Y, Manuel C, et al. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;**58**:2156–66.
45. Robert-Gangneux F, Drogoul A-S, Rostan O, Piquet-Pellorce C, Cayon J, Lisbonne M, et al. *PLoS ONE* 2012;**7**:e33413.
46. Breitling R, Klingner S, Callewaert N, Pietrucha R, Geyer A, Ehrlich G, et al. *Protein Expres. Purif.* 2002;**25**:209–18.
47. Guillotin L, Lafite P, Daniellou R. *Biochemistry* 2014;**53**:1447–55.
48. Bernfeld P. *Methods in enzymology*. Academic Press; 1955, p. 149–58.
49. Sali A, Blundell TL. *J Mol Biol* 1993;**234**:779–815.
50. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, et al. *J Comput Chem* 2005;**26**:1781–802.
51. Kirschner KN, Yongye AB, Tschampel SM, González-Outeiriño J, Daniels CR, Foley RJ, et al. *J Comput Chem* 2008;**29**:622–55.
52. Slade D, Dunstan MS, Barkauskaite E, Weston R, Lafite P, Dixon N, et al. *Nature* 2011;**477**:616–20.
53. Dunstan MS, Barkauskaite E, Lafite P, Knezevic CE, Brassington A, Ahel M, et al. *Nat. Comm.* 2012;**3**.
54. Amaral M, Levy C, Heyes DJ, Lafite P, Outeiro TF, Giorgini F, et al. *Nature* 2013;**496**:382–5.
55. Chauhan JS, Rao A, Raghava GPS. *PLoS ONE* 2013;**8**:e67008.
56. Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, et al. *EMBO J* 2013;**32**:1478–88.
57. Kundig W, Ghosh S, Roseman S. *Proc Natl Acad Sci USA* 1964;**52**:1067–74.
58. Chassy BM, Victoria Porter E. *Biochem Biophys Res Commun* 1979;**89**:307–14.
59. Engels V, Georgi T, Wendisch VF. *FEMS Microbiol Lett* 2008;**289**:80–9.
60. Hayakawa M, Aoki H, Kuramitsu HK. *Infect Immun* 1986;**53**:582–6.
61. Thompson J, Nguyen NY, Sackett DL, Donkersloot JA. *J Biol Chem* 1991;**266**:14573–9.
62. Thompson J, Robrish SA, Immel S, Lichtenthaler FW, Hall BG, Pikis A. *J Biol Chem* 2001;**276**:37415–25.
63. Brückner R, Wagner E, Götz F. *J Bacteriol* 1993;**175**:851–7.
64. Zechel DL, Withers SG. *Acc Chem Res* 2000;**33**:11–8.
65. Meng G, Fütterer K. *Nat Struct Biol* 2003;**10**:935–41.
66. Liebl W, Brem D, Gotschlich A. *Appl Microbiol Biotechnol* 1998;**50**:55–64.
67. Rastrojo A, Carrasco-Ramiro F, Martín D, Crespillo A, Reguera RM, Aguado B, et al. *BMC Genomics* 2013;**14**:223.
68. Alcolea PJ, Alonso A, Gómez MJ, Postigo M, Molina R, Jiménez M, et al. *BMC Genomics* 2014;**15**:849.
69. Li Q, Zhao Y, Ni B, Yao C, Zhou Y, Xu W, et al. *Parasitol Res* 2008;**103**:821–8.
70. Lahav T, Sivam D, Volpin H, Ronen M, Tsigankov P, Green A, et al. *FASEB J* 2011;**25**:515–25.
71. Saxena A, Lahav T, Holland N, Aggarwal G, Anupama A, Huang Y, et al. *Mol Biochem Parasitol* 2007;**152**:53–65.
72. Thompson J, Nguyen NY, Robrish SA. *J Bacteriol* 1992;**174**:3227–35.
73. Glaser TA, Baatz JE, Kreishman GP, Mukkada AJ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;**85**:7602–6.
74. Ehrmann MA, Korakli M, Vogel RF. *Curr Microbiol* 2003;**46**:391–7.
75. Vandamme EJ, Derycke DG. *Adv Appl Microbiol* 1983;**29**:139–76.
76. Choo KH, Tan TW, Ranganathan S. *BMC Bioinformatics* 2009;**10**(Suppl. 15):S2.
77. Petersen TN, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H. *Nat Methods* 2011;**8**:785–6.
78. Basile G, Peticca M. *Mol Biotechnol* 2009;**43**:273–8.
79. Klatt S, Rohe M, Alagesan K, Kolarich D, Konthur Z, Harti D. *J Proteome Res* 2013;**12**:396–403.

2.2. Evaluation *in vitro* de l'effet antiparasitaire d'analogues furanosidiques

Bien que la preuve du concept ait été validée à l'aide des analogues d'UDP-furanose, leur synthèse étant difficile en grandes quantités, il s'est avéré difficile d'envisager le développement de ces produits à visée thérapeutique. Dans ce contexte nos collaborateurs chimistes nous ont fourni d'autres analogues de type alkyl-furanoses, dont la synthèse était envisageable en grandes quantités, permettant des évaluations *in vitro* puis *in vivo*. Parmi ces analogues, les octyl-galactofuranosides avaient le plus fort potentiel. Ainsi, nous nous sommes attachés à caractériser leur mode d'action.

2.2.1 Description chimique des analogues

Les analogues alkyl-furanosidiques produits par l'ENSCR reproduisent le résidu naturel, β -D-galactofuranose. Il s'agit d'un hexose ($C_6H_{12}O_6$) contenant un hétérocycle à 4 atomes de carbone (C_1 à C_4) et un oxygène, le cycle furane. Dans l'élongation du LPG, le groupement hydroxyle positionné en C_1 va permettre la liaison avec l'alkyl-glycérol lipide du cœur hexa saccharidique, ce groupement hydroxyle a donc été lié à un groupement octyl (C_8H_{17}) pour produire des analogues bloquant l'élongation du LPG. Par ailleurs, les précédents travaux montraient une bonne activité antiparasitaire de l'analogue UDP-galactofuranose ayant un groupement acétamide ($NHCOCH_3$ ou $NHAc$) à la place du groupement hydroxyle sur le carbone en C_6 . L'avantage de ce groupement est sa taille raisonnable, ainsi que la possibilité de remplacer le groupe acétyl par une chaîne d'acide gras (permettant ainsi d'inclure cette molécule dans une formule liposomale par exemple). Deux autres groupements azotés ont également été utilisés pour ce travail, une amine (NH_2) plus polaire et basique que l'acétate, mais présentant un encombrement stérique moins important que le précédent groupement, et un azoture (N_3) apolaire, permettant d'envisager un traçage de la molécule par sonde (type « chimie click»). Ainsi 4 analogues octyl-furanosidiques (Figure 24 : β -D-galactofuranose (Galf) naturel et ses 4 analogues furanosidiques) ont été évalués quant à leur efficacité et leur mécanisme d'action sur *L. donovani*: β -D-galactofuranose-octyle (Galf-oct) (**1**), 6-amino- β -D-galactofuranose-octyl (NH_2 -Galf) (**2**) 6-N-acetamido- β -D-galactofuranose-octyl ($NHAc$ -Galf) (**3**) et 6-azido- β -D-galactofuranose-octyl (N_3 -Galf) (**4**).

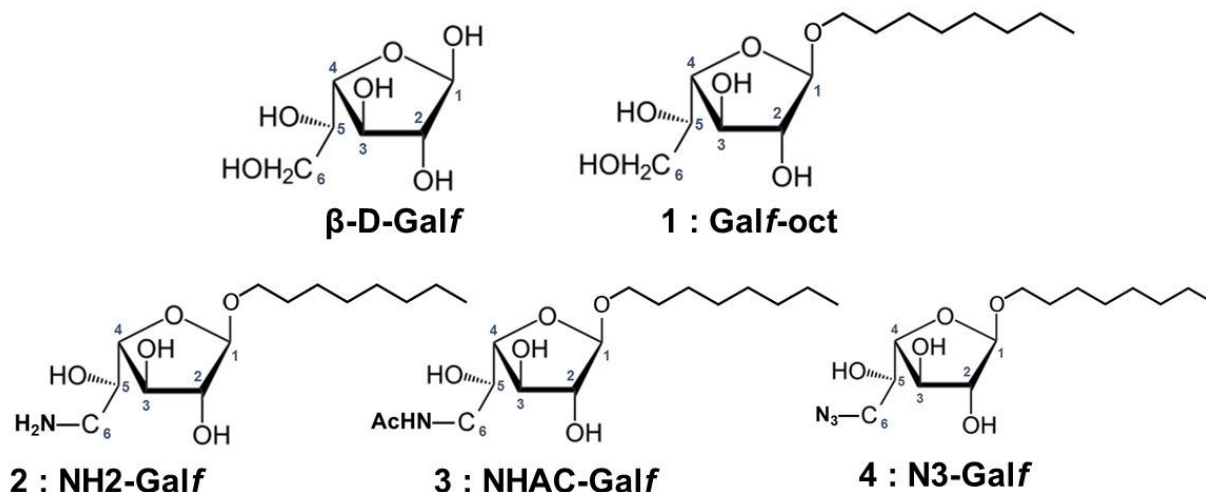


Figure 24 : β -D-galactofuranose (Galf) naturel et ses 4 analogues furanosidiques

- (1): β -D-galactofuranose-octyle (Galf-oct)
- (2): 6-amino- β -D-galactofuranose-octyl (NH₂-Galf)
- (3): 6-N-acetamido- β -D-galactofuranose-octyl (NHAc-Galf)
- (4): 6-azido- β -D-galactofuranose-octyl (N₃-Galf)

L'octyl- β -D-galactopyranose, qui est un alkyl-pyranose basé sur le même hexose que le galatofuranose mais avec un cycle hétérogène à 6 carbones a été utilisé comme molécule témoin et l'octyle seul a également été utilisé comme témoin de l'activité du groupement osidique seul.

2.2.2 Activité anti-promastigotes des dérivés du Galf-oct

Cette partie de l'étude a été débutée avant mon arrivée au laboratoire par Muhammad Suleman avec qui j'ai pu découvrir la thématique « leishmanie » en image, dès mon arrivée, avec l'analyse en microscopie électronique des promastigotes. J'ai ensuite accompagné Suleman pour la fin du travail sur les promastigotes et j'ai pris le relais pour la partie « amastigotes » de ce travail.

2.2.2.1 Evaluation de l'effet antiparasitaire sur les promastigotes

L'évaluation de la sensibilité a été réalisée par méthode de dilution limite.

Une solution de milieu de Schneider contenant 10^5 /ml promastigotes de *L. donovani* en phase de croissance exponentielle (à J 3) a été traitée par chaque composé à des concentrations variant de 0,9 μ M à 3,2 mM. Des conditions contrôles ont été réalisées d'une part sans aucun traitement et d'autre part, en utilisant un traitement antiparasitaire connu ayant un effet sur les promastigotes, la miltéfosine (HePC). Après 48h de culture à 27° C, les différentes solutions de promastigotes traités ou non ont été diluées de 2 en 2 en plaques 96 puits et remises en culture à 27°C pendant 72h. Puis, la présence de promastigotes mobiles (correspondant à la viabilité) a été évaluée au microscope inversé dans chaque puits et l'IC₅₀, dose permettant la réduction du nombre de promastigotes de 50% comparée à la condition non traitée, a ainsi été évaluée. Chaque condition a été réalisée en triplicat.

Tableau 5: Evaluation des IC50 des dérivés du Galf et du contrôle

Composé	Radical en C ₆	IC ₅₀ (μM)
1 : Galf-oct	-OH	8,96 ± 2.5
2 : NH₂-Galf	-NH ₂	41,6 ± 8,3
3 : NHAc- Galf	-NHAc	800
4 : N₃-Galf	-N ₃	1360 ± 16,6
HePC	NC	3,38

NC : Non concerné

L'IC₅₀ obtenue pour la miltéfosine est proche des valeurs connues dans la littérature (236), validant ainsi ces résultats. Le composé présentant l'effet antiparasitaire le plus intéressant sur les promastigotes est le Galf-oct, de même le NH₂-Galf présente un effet mais avec un ordre de grandeur 5 fois plus important de l'IC₅₀, cependant cet effet reste plus intéressant que l'effet antiparasitaire quasi-inexistant des composés 3 et 4. L'encombrement stérique plus important des groupements -NHAc et N₃ peut expliquer la faible efficacité associée à ces groupements. Comme vu pour l'invertase BfrA précédemment décrite, les sites actifs des enzymes ne permettent pas toujours la fixation de si gros résidus. Pour étayer cette hypothèse une étude de l'interaction des différents composés avec la paroi parasitaire a été réalisée dans la suite de ce travail.

2.2.2.2 Evaluation de la cytotoxicité des analogues sur THP-1 et macrophages humains issus de Buffy coat

La CC₅₀ ou concentration du produit testé entraînant une cytotoxicité pour 50% des macrophages humains issus de Buffy coat ou des THP-1 a été évalué par un test au MTT (Bromure de 3-(4,5-diméthylthazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium).

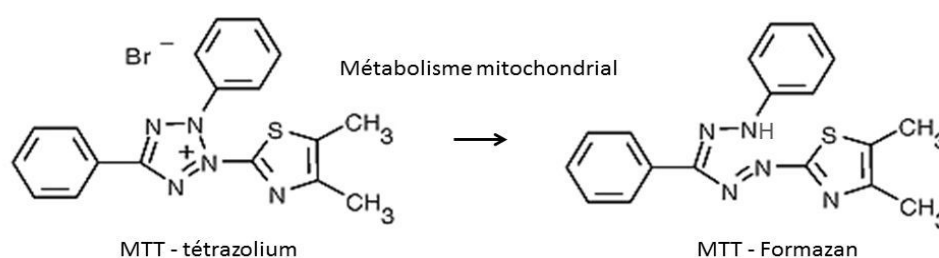


Figure 25: Principe du test MTT

Pour cela des cultures de THP-1 ou de macrophages issus de PBMC (10⁵ macrophages par puits) ont été mises en présence des différents analogues du Galf-oct ou de la miltéfosine à des concentrations variant entre 5 et 3200 μM pendant 24h à 37°C sous atmosphère contenant 5% de CO₂. Puis les cultures ont été lavées et incubées en présence de 100 μl de MTT à 5 mg/ml (Molecular Probes, CA) pendant 2h à 37°C dans les puits d'une microplaque 96 puits. Le MTT, jaune est réduit en formazan qui est un produit violet par l'activité métabolique mitochondriale des cellules vivantes. Puis le milieu a été retiré et remplacé par 100 μl de diméthylsulfoxyde (DMSO) pour stopper la réaction de réduction. L'activité

métabolique est donc évaluée par une mesure de la DO du formazan à 540 nm. La lecture a été réalisée sur un SpectroStar Nano et les CC_{50} ont été calculées avec le logiciel MARS en prenant comme référence équivalent à 100% de survie, la DO des puits témoins n'ayant subi aucun traitement. Chaque condition a été réalisée en triplicat.

Les valeurs d' IC_{50} et de CC_{50} pour chaque dérivé ont permis d'établir l'index de sélectivité de chacune des molécules. Plus celui-ci est élevé plus une molécule peut être utilisée aux doses efficaces sans craindre d'effets secondaires.

Tableau 6 : Evaluation de la cytotoxicité et de l'index de sélectivité sur des macrophages de la lignée THP-1 et des macrophages humains (HM) issus de PBMC

Composé	THP-1 CC_{50} (μ M)	HM CC_{50} (μ M)	IS (CC_{50}/IC_{50})	
			THP-1	HM
1 : Galf-oct	1508,4 \pm 0,03	1434,4 \pm 0,4	168,3	159,7
2 : NH2-Galf	804,6 \pm 0,08	736,6 \pm 0,1	19,3	17,7
3 : NHAc- Galf	1608,8 \pm 0,08	1595,4 \pm 0,4	2,01	1,99
4 : N₃-Galf	ND	747,4 \pm 0,3	ND	0,55
HePC	146,1 \pm 0,03	128,1 \pm 0,3	43,2	37,9

CC_{50} : Cytotoxicité ; HMG : Macrophages Humains issus de PBMC ; IS : Index de sélectivité ; ND : non déterminé

Ces résultats montrent une très faible cytotoxicité de tous les composés testés, comparée à celle de la miltéfosine (qui est attendue puisque cette molécule a été initialement développée à visée anti-cancéreuse). Concernant les possibilités d'usage à visée thérapeutique, le Galf-oct montre une excellente efficacité antiparasitaire associée à une faible cytotoxicité pour les macrophages (lignée cellulaire ou non) et donc un très grand index de sélectivité 4 fois plus élevé que celui de la miltéfosine. Le NH2-Galf malgré un index de sélectivité 2 fois plus faible que celui de la miltéfosine reste un composé efficace à la différence du NHAc-Galf et du N3-Galf, qui même s'ils sont peu cytotoxiques ne présentent pas une efficacité suffisante pour poursuivre leur développement à visée thérapeutique.

Ces résultats doivent être interprétés avec prudence. En effet l'utilisation des promastigotes pour mesurer les IC_{50} des produits testés est très pratique et plus simple que de réaliser les tests sur des amastigotes axéniques ou sur des amastigotes intracellulaires. Or une grande diversité d'efficacité est connue pour certains produits, entre les promastigotes et les amastigotes intracellulaires, comme c'est le cas pour les dérivés de l'antimoine (51). Ainsi l'efficacité sur les promastigotes ne préjuge pas forcément de l'efficacité thérapeutique sur les amastigotes intracellulaires ou *in vivo*, l'efficacité sur les amastigotes intracellulaires a donc également été évaluée dans la suite de ce travail (2.2.2).

2.2.2.3 Interaction membrane-dérivés du Galf : évaluation par RMN-STDD

La RMN-STD « Saturation Transfer Difference » est une méthode de résonance magnétique nucléaire permettant d'évaluer les interactions entre un ligand et son récepteur, selon une technique mise au point par Mayer et Meyer (237), sans recourir à aucune modification du ligand ni du récepteur. Le principe repose sur l'évaluation du temps de relaxation des protons d'un ligand mis en excès en solution avec son récepteur (en quantité beaucoup plus faible, permettant de ne traiter que les signaux émis par le ligand). Dans un premier temps, les signaux émis par les protons sont évalués avant irradiation, c'est le spectre « off » du fait de l'excès de ligand, il correspond au spectre du ligand seul. Après un temps d'irradiation, les protons liés au récepteur vont avoir un temps de relaxation plus court et donc émettre un signal d'autant plus faible que leur liaison avec le récepteur est forte, ainsi on obtient le spectre « on ». La différence du spectre « off » moins le spectre « on » permet d'obtenir le spectre « STD » pour lequel le proton ayant la plus forte interaction va présenter la différence la plus importante et se voir attribuer une valeur de liaison de 100% et les autres sont évalués de façon relative à ce proton 100% (Figure 26).

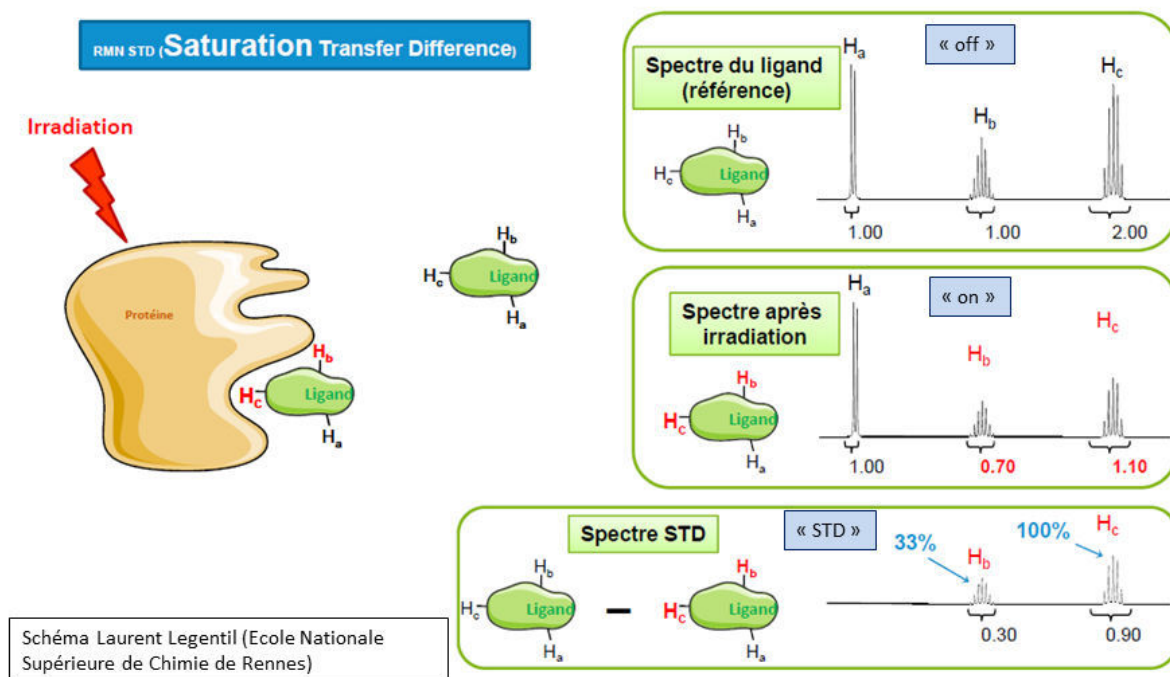


Figure 26: Principe de la RMN-STD, adapté de Guégan et Daniellou 2012 (238)

Le récepteur liant les dérivés de galactofuranose n'étant pas connu un traitement plus complexe a été appliqué, la RMN-STDD « Saturation Transfer Double Difference » permettant l'étude de cellules entières et non juste du récepteur. Le spectre STD des cellules seules est mesuré puis soustrait au spectre STD des cellules accompagnées du ligand en excès, permettant d'éliminer le bruit de fond dû aux différents constituants cellulaires.

Pour ce travail, les cellules étudiées sont des promastigotes de *Leishmania donovani* en phase exponentielle de croissance (à J3 de culture en milieu liquide). Les parasites ont été centrifugés pendant 15 min à 2500 G pour éliminer le milieu de culture, puis laver tout

d'abord avec du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) puis avec un tampon PBS deutéré (milieu nécessaire en RMN du proton pour éliminer le bruit de fond provoqué par les protons du milieu analytique et pour fixer la fréquence de référence sur celle du deutérium). Chaque échantillon analysé contient 2 à $2,7 \cdot 10^8$ parasites seuls pour obtenir le spectre STD des cellules seules, avec les dérivés furanosidiques à une concentration de 1,5 mg/ml (ligands ainsi en excès) ou avec le galactose comme contrôle négatif. Les interactions avec l'octanol seul et avec l'octyl-galactopyranose ont également été mesurées pour évaluer l'importance de la chaîne octyle et du cycle furanose, respectivement.

Le PBS deutéré n'étant pas un milieu favorable à la culture cellulaire, la mobilité des parasites a été vérifiée en fin d'acquisition pour s'assurer que les spectres acquis ne correspondaient pas à des cellules mortes.

L'acquisition a été réalisée à l'ENSCR sur un spectromètre Bruker Advance III 400-MHz.

La condition témoin parasite + galactose montre bien une absence de spectre (pas d'interaction de ce composé avec la paroi parasitaire), de même que les dérivés du Galf seuls en solution (pas d'interaction des composés entre eux en solution), les spectres observés ne sont donc pas des artéfacts.

Les résultats obtenus montrent une affinité maximale (fixée à 100%) à l'extrémité de la chaîne octyle pour tous les composés y compris le galactopyranose et la chaîne octyle seule. Cette forte affinité (supérieure à 80%) concerne les 6 derniers carbones de la chaîne pour tous les composés étudiés, ainsi la chaîne carbonée, pôle lipophile de nos composés, semble l'élément clé de l'ancrage membranaire des dérivés dans la bicouche lipidique parasitaire également lipophile.

Concernant le cycle furanose de Galf-oct, les protons des carbones 1, 2 et 3 présentent une forte affinité (72% et 84% respectivement pour C_1 et C_2 , C_3) alors que le proton en C_6 est moins affiné (52%). Cette partie très polaire de notre composé devrait moins bien interagir dans la membrane phospholipidique apolaire et ces fortes valeurs d'interaction semblent en faveur d'une interaction de ces protons avec la membrane.

Ceci est également observé pour NH₂-Galf et NHAc-Galf dont les protons portés par les carbones 1, 2 et 3 présentent des affinités variant de 49% à 72% et une affinité plus faible des protons portés par le carbone 6 de 33 et 37%, respectivement, pour l'un des protons et de 62 et 39%, pour le deuxième proton en C_6 .

Ces 2 composés semblent moins affins que le Galf-oct et cette différence correspond à la différence d'activité du Galf-oct, de NH₂-Galf et de NHAc-Galf, dont l'efficacité varie dans le même sens que l'affinité de ces protons. Le cycle furanose semble donc important pour l'activité antiparasitaire de nos composés.

L'analyse des spectres pour le N3-Galf n'a pas permis d'obtenir des spectres interprétables et l'observation microscopique des parasites en fin d'acquisition a montré des parasites immobiles et présentant des dégradations de leur forme, la mort des parasites avec ce

traitement en excès explique probablement l'impossibilité d'obtenir les spectres pour ce composé. (Figure 2, Article 3)

2.2.2.4 Evaluation de la fluidité membranaire par résonance paramagnétique électronique

Le galactofuranose étant un constituant clé du LPG et donc de la paroi des leishmanies en particulier des promastigotes, l'action des analogues sur les membranes parasitaires doit être explorée. Naturellement les membranes sont constituées d'une bicouche lipidique au sein de laquelle les phospholipides se déplacent librement. La fluidité de la membrane parasitaire de promastigotes de *L. donovani* traités par les différents dérivés du galactofuranose a été évaluée par résonance paramagnétique électronique. Cette technique repose sur la mesure du spectre d'absorption d'un électron isolé soumis à un rayonnement micro-onde, dans un champ magnétique fixe. L'électron isolé est fourni par une sonde. Pour l'étude de la fluidité membranaire, la sonde choisie est une sonde radicalaire, l'acide 5-doxylstéarique qui se comporte comme les lipides membranaires et possède un radical O° proche de la tête polaire de la molécule permettant d'évaluer les mouvements de molécules dans la zone hydrophile plus externe de la membrane (239), ce qui est attendu pour nos dérivés étant donné la courte chaîne carbonée qu'ils présentent.

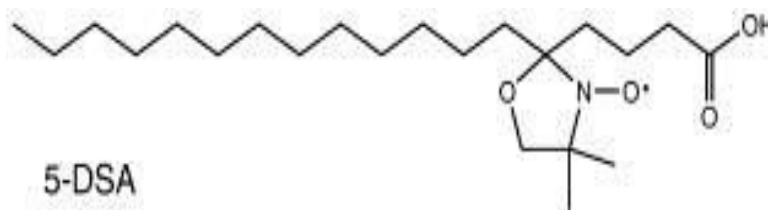


Figure 27 : Acide 5-doxylstéarique selon Sgherri C. *et al.* (239)

Le spectre d'absorption de la sonde varie selon son environnement et donc selon les mouvements de la sonde au sein de la membrane. Le spectre obtenu permet de calculer le paramètre d'ordre S selon les équations d'Ogura *et al.* (240), qui est inversement proportionnel à la fluidité membranaire.

Pour ce travail, des promastigotes de *L. donovani* en phase exponentielle de croissance (J3) ont été traités pendant 48h à 27°C par les dérivés du Galf les plus efficaces (Galf-oct, NH2-Galf) à leur IC_{50} précédemment mesurée, ou par la Miltéfosine (HePC) comme témoin. Au vu de l'importante interaction de la chaîne alkyl sur les membranes, les parasites ont également été traités par l'octyl-galactopyranose et par l'octyl seul comme contrôle.

L'analyse de la fluidité membranaire montre encore un effet plus important pour le Galf-oct et un effet similaire mais moins important pour NH2-Galf. Ces 2 composés entraînent une rigidification de la membrane des parasites, qui n'est pas retrouvée pour NHAc-Galf, ni pour les composés témoins octyl-galactopyranose et chaîne octyl seule. Cet effet est également retrouvé de façon moins importante pour notre molécule témoin, la miltéfosine. Ceci est très intéressant car le mode d'action de la miltéfosine est connu et passe par une désorganisation des constituants membranaires.

L'effet antiparasitaire du Galf-oct semble donc en lien avec une forte interaction avec la membrane parasitaire, aboutissant à l'intégration du composé au sein de la bicouche lipidique avec une action stabilisante des membranes. Cet effet semble étonnant pour une si petite molécule. Cependant, notons que la pince polaire des groupements hydroxyles en C₅ et C₆ existant sur le galactofuranose est préservée dans le Galf-oct et dans NH₂-Galf (pince entre les groupements -NH₂ et -OH), qui présente également cet effet rigidifiant sur les membranes. Cette pince est absente lorsque le groupement N3 (apolaire) vient remplacer le groupement hydroxyle, et masquée par l'acétate lorsque le groupement NHAc vient remplacer l'hydroxyle. L'effet rigidifiant pourrait donc être le résultat d'une interaction avec le récepteur du galactofuranose, associé à la chaîne octyl très lipophile. (Figure 3, Article 3)

La miltéfosine est connue pour son activité antiparasitaire grâce à son effet rigidifiant de membrane, mais d'autres molécules ont fait l'objet de publications récentes en lien avec une rigidification de la membrane (241,242), comme par exemple le parthenolide, mais qui a comme inconvénient d'être extrait à partir d'une plante, ne permettant pas pour le moment sa synthèse en grande quantité. Là encore, cette molécule, comme la miltéfosine, présente une certaine efficacité anti-cancéreuse et est associée à de lourds effets secondaires (243).

2.2.2.5 Visualisation de l'effet des dérivés du Galf sur des promastigotes par microscopie électronique à transmission

Les quantités importantes de LPG dans la paroi des promastigotes laissent imaginer un effet membranaire des analogues du Galf, ce qui a pu être observé en microscopie électronique à transmission. Cette analyse a été réalisée en collaboration avec la plateforme MRic (Biosit, Université Rennes 1).

Au moment de cette analyse, le Galf-oct semblait le plus efficace concernant son activité antiparasitaire et a donc été privilégié. Le NHAc-Galf qui présentait une plus faible efficacité antiparasitaire a été utilisé comme molécule témoin. Les promastigotes en phase de croissance stationnaire (>J5) ont été comptés et 5.10⁸ parasites ont été incubés pendant 48h à 27°C avec les composés 1 et 3 à la concentration de 125 µg/ml ou non traité pour réaliser une condition témoin. Les cultures ont ensuite été lavées et fixées dans une résine Epoxy puis coupées à l'ultratome en section de 80 nm. Ces coupes ont été fixées sur les grilles puis colorées pour l'observation en microscopie électronique à transmission (Microscope Jeol 1400 TEM et caméra Gatan Orius).

Les promastigotes non traités sont bien définis, ils présentent une membrane plasmique sous laquelle un réseau de microtubules est présent sur les coupes transversales à très fort grossissement (x 80 000) et des organites internes intacts. Après 48h de traitement par le Galf-oct, 90% des promastigotes sont complètement désorganisés, en particulier au niveau de la membrane plasmique. Celle-ci est effeuillée et parfois même rompue, entraînant une fuite du contenu intracellulaire et des organites internes hors de la cellule. Le réseau de microtubules n'est plus retrouvé sous la membrane. Le NHAc-Galf ne provoque pas cet effet destructurant et seule une déformation de la forme globale des promastigotes est observée mais avec une membrane plasmique et des organites internes qui sont bien conservés (figure 4, Article 3)

2.2.2.6 Etude de la mort cellulaire des promastigotes traités : Apoptose ou nécrose ??

Les résultats précédents pour le Galf-oct et NH₂-Galf montrent un effet antiparasitaire associé à une désorganisation de la paroi, ceci évoque plutôt une mort par nécrose, qui aboutit à une fuite du contenu cellulaire par des pores membranaires. Pour étayer ou infirmer cette hypothèse nous avons étudié le métabolisme de la phosphatidylsérine chez les promastigotes traités par le Galf-oct et NH₂-Galf. En effet, ce phospholipide intracellulaire est externalisé dès les phases primaires en cas de mort cellulaire par apoptose. Ainsi la présence à la surface externe des cellules de phosphatidylsérine est en faveur d'une mort cellulaire par apoptose.

Pour étudier ce phospholipide, nous avons utilisé la cytométrie en flux, avec un marquage double Annexin-V-Alexa fluor qui reconnaît d'une part la phosphatidylsérine et l'iodure de propidium (PI) qui est un agent intercalant de l'ADN et ne peut rentrer dans les cellules qu'en cas de dommages membranaires, c'est-à-dire en cas de nécrose ou dans les phases tardives de l'apoptose (kit Dead cell apoptosis, Molecular Probes®). D'autre part la localisation de la phosphatidylsérine a été évaluée pour des promastigotes traités par Galf-oct par microscopie confocale après un marquage avec l'annexin V-PE (kit apoptosis detection, BD, Pharmingen).

Les promastigotes traités par Galf-oct présentent une augmentation de la fixation de l'annexin-V en microscopie confocale comparé aux promastigotes non traités. Cette observation est confirmée par la cytométrie en flux, les promastigotes traités par Galf-oct ou NH₂-Galf pendant 24h présentent un marquage intense pour l'annexin-V avec plus de 80% des cellules positives contre seulement 71% pour le témoin positif d'apoptose (traitement par la staurosporine) et des moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) également plus importantes que celle des parasites traités par la staurosporine. L'analyse du marquage par l'iodure de propidium ne montre pas d'augmentation du nombre de cellules positives ni d'augmentation de la MFI. Malgré la visualisation de la dégradation des membranes parasitaires après traitement par le Galf-oct, cette analyse montre que la mort cellulaire des promastigotes traités fait intervenir un mécanisme d'apoptose et non de nécrose comme les images de microscopie électronique pouvaient le laisser penser. Ainsi la reconnaissance du Galf-oct par un récepteur membranaire spécifique, évoquée par les résultats de STDD RMN, entraîne peut-être une cascade de signalisation aboutissant au déclenchement de l'apoptose. (Figure 5, Article 3)

Article 3 : Alkyl galactofuranosides strongly interact with *Leishmania donovani* membrane and provide antileishmanial activity

Muhammad Suleman, Jean-Pierre Gangneux, Laurent Legentil, Sorya Belaz, Yari Cabezas, Christelle Manuel, Rémy Dureau, Odile Sergent, Agnès Burel, Franck Daligault, Vincent Ferrières et Florence Robert-Gangneux

Les résultats de l'évaluation in vitro de l'effet antiparasitaire des dérivés du Gal β -oct sur les promastigotes (et une petite partie sur les amastigotes) ont fait l'objet de cette publication parue dans AAC en 2013.

Alkyl Galactofuranosides Strongly Interact with *Leishmania donovani* Membrane and Provide Antileishmanial Activity

Muhammad Suleman,^a Jean-Pierre Gangneux,^{a,b} Laurent Legentil,^{d,e} Sorya Belaz,^a Yari Cabezas,^{d,e} Christelle Manuel,^a Rémy Dureau,^{d,e} Odile Sergent,^a Agnès Burel,^c Franck Daligault,^f Vincent Ferrières,^{d,e} Florence Robert-Gangneux^{a,b}

INSERM U1085-IRSET (Institut de Recherche en Santé Environnement et Travail), Université Rennes 1, Rennes, France^a; Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Service de Parasitologie-Mycologie, Rennes, France^b; mRIC (microscopy-Rennes Imaging Center), Université Rennes 1, Rennes, France^c; Ecole Nationale Supérieure de Chimie, CNRS UMR 6226, Rennes, France^d; Université Européenne de Bretagne, Rennes, France^e; Université de Nantes, FRE CNRS 3478, Nantes, France^f

We investigated the *in vitro* effects of four alkyl-galactofuranoside derivatives, i.e., octyl- β -D-galactofuranoside (compound 1), 6-amino- β -D-galactofuranoside (compound 2), 6-*N*-acetamido- β -D-galactofuranoside (compound 3), and 6-azido- β -D-galactofuranoside (compound 4), on *Leishmania donovani*. Their mechanism of action was explored using electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) and nuclear magnetic resonance (NMR), and ultrastructural alterations were analyzed by transmission electron microscopy (TEM). Compound 1 showed the most promising effects by inhibiting promastigote growth at a 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of $8.96 \pm 2.5 \mu\text{M}$. All compounds exhibit low toxicity toward human macrophages. Compound 1 had a higher selectivity index than the molecule used for comparison, i.e., miltefosine (159.7 versus 37.9, respectively). EPR showed that compound 1 significantly reduced membrane fluidity compared to control promastigotes and to compound 3. The furanose ring was shown to support this effect, since the isomer galactopyranose had no effect on parasite membrane fluidity or growth. NMR showed a direct interaction of all compounds (greatest with compound 1, followed by compounds 2, 3, and 4, in descending order) with the promastigote membrane and with octyl-galactopyranose and octanol, providing evidence that the *n*-octyl chain was primarily involved in anchoring with the parasite membrane, followed by the putative crucial role of the furanose ring in the antileishmanial activity. A morphological analysis of compound 1-treated promastigotes by TEM revealed profound alterations in the parasite membrane and organelles, but this was not the case with compound 3. Quantification of annexin V binding by flow cytometry confirmed that compound 1 induced apoptosis in >90% of promastigotes. The effect of compound 1 was also assessed on intramacrophagic amastigotes and showed a reduction in amastigote growth associated with an increase of reactive oxygen species (ROS) production, thus validating its promising effect.

The World Health Organization (WHO) ranks leishmaniasis as the second most important protozoan parasitic disease after malaria for its grave morbidity, high mortality, and global distribution, involving 88 countries or territories to which it is endemic. The estimated incidence is as high as 2 million new cases per year, including 0.5 million cases of visceral leishmaniasis (VL) and 1.5 million of cutaneous leishmaniasis, with 350 million people at risk (1). The recommendations for the treatment of leishmaniasis have recently been actualized (1, 2). Conventional drugs used for the treatment of VL (antimonials and amphotericin B) require prolonged administration, have toxicity risks, and are currently facing challenges of resistance in certain regions of endemicity, such as India (3). New therapeutic agents, such as liposomal amphotericin B and miltefosine, have demonstrated their efficacy in large field clinical trials, but their widespread use is limited by adverse events, cost, and intravenous use or teratogenicity, respectively. Combining therapies of the existing drugs remains another solution but carries the risk of cumulative toxicity (4, 5). Therefore, there is a need to investigate novel cost-effective therapeutic approaches (6, 7), all the more because currently no reliable human vaccine is available (8).

The external structure of the *Leishmania* parasite presents attractive targets for generating future antileishmanial drugs, particularly lipophosphoglycan (LPG), which is the main molecular structure covering the parasite surface and is known to be responsible for its survival and virulence (9). It has already been demonstrated that attenuated virulence or death of the parasite is due to alterations in the LPG structure (10, 11). The core structure of

LPG, which is common to all *Leishmania* species, consists of a hexasaccharide containing a nonacetylated glucosamine unit and two mannopyranose entities linked to a rare β -D-galactofuranose residue and ends with two galactopyranoses. The whole is attached to inositol, which allows linkage with the phospholipid anchor, and one of the mannoses is substituted by a glucose-1-phosphate (12).

The presence of rare galactofuranoses is a characteristic shared by some microorganisms, including trypanosomatids, like *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*, as well as mycobacteria and *Aspergillus* (13). Indeed, it is well documented that galactofuranose (Galf) and Galf-containing glycans play a vital role in the life cycle and pathogenesis of the parasite and in mediating important host-parasite interactions (14). The complete absence of Galf in mammals makes it an interesting target for development of new chemotherapeutic strategies, particularly against leishmaniasis (13, 15). Our group and other teams previously reported an inhibitory effect of octyl galactofuranosides (16) or bicatenary thiogalacto-

Received 25 June 2013 Returned for modification 3 September 2013

Accepted 21 January 2014

Published ahead of print 27 January 2014

Address correspondence to Florence Robert-Gangneux, florence.robert-gangneux@univ-rennes1.fr.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.01350-13

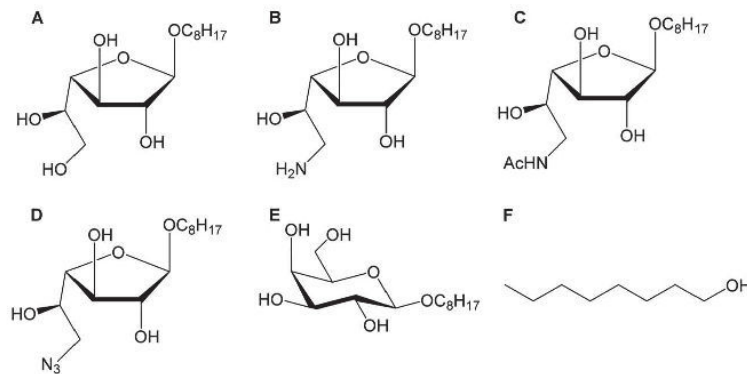


FIG 1 Structures of Galf derivatives evaluated against *Leishmania*. (A) Octyl-β-D-galactofuranoside/compound 1; (B) 6-amino-galactofuranoside/compound 2; (C) 6-*N*-acetamido-β-D-galactofuranoside/compound 3; (D) 6-azido-galactofuranoside/compound 4; control compounds, like (E) octyl-β-D-galactopyranoside/compound 5; and (F) octanol/compound 6.

furanosides (17) on mycobacterial strains. These results led us to investigate such effects on *Leishmania*, since the glycocalyx of this microorganism shares some common characteristics with mycobacteria. Therefore, four different synthetic octyl galactofuranoside derivatives were synthesized and analyzed for their ability to interfere with *Leishmania donovani* promastigote survival or growth. Additional experiments were conducted to explain their mode of interaction with the parasite membrane and to characterize parasite damage, using electron paramagnetic resonance (EPR), nuclear magnetic resonance (NMR), transmission electron microscopy (TEM), and annexin V binding. The effects of the most powerful compounds were verified with intramacrophagic amastigotes.

MATERIALS AND METHODS

Chemistry. The different galactofuranose derivatives were obtained using highly specific synthesis pathways. Starting with octyl galactofuranoside 1, the three other target molecules were synthesized as previously described (18) (Fig. 1). The synthesis relied on a common intermediate, the octyl-6-azido-6-2,3-di-*O*-benzoyl-6-deoxy-galactofuranoside (compound 4b). First, reduction of compound 4b provided 6-amino derivative 2b, which can be either deprotected or acetylated to give compounds 2 and 3b, respectively. Subsequent cleavage of the ester groups of compound 3b gave compound 3 in 30% yields starting with compound 4b. In parallel, direct deprotection of the benzoyl protecting groups of compound 4b under basic conditions provided the free octyl-6-azido-galactofuranoside (compound 4). Details about the synthesis can be provided upon request. The four resulting products, namely, octyl-β-D-galactofuranoside (compound 1), 6-amino-galactofuranoside (compound 2), 6-*N*-acetamido-β-D-galactofuranoside (compound 3), and 6-azido-galactofuranoside (compound 4), were then tested (19). In some experiments, two other compounds were used as controls, i.e., octyl-β-D-galactopyranoside (compound 5) (Galp-Oct) and octanol (compound 6) (Fig. 1). Miltefosine (hexadecylphosphocholine [HePC]) was used as a reference molecule with proven efficacy against visceral leishmaniasis (20).

Cell cultures. (i) *Leishmania donovani* promastigotes. The *L. donovani* strain was isolated from a human patient positively diagnosed with VL and was typed by the Centre National de Référence des Leishmanioses (Montpellier, France) as MHOM/SD/97/LEM3427, Zym MON-18. Schneider's drosophila medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Invitrogen) was used to amplify parasites from amastigotes freshly isolated from mice and to maintain serial passages of *L. donovani* promastigotes at 27°C. *L. donovani* cultures at 3 to 5 days

(exponential growth phase) were used to determine the antiparasitic effect of the different derivatives of galactofuranose. For cell infection experiments, promastigote cultures at stationary phase were used.

(ii) **THP-1-derived human macrophages.** The THP-1 (human acute monocytic leukemia) cell line was differentiated into macrophages after overnight stimulation with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) as described earlier (21). The cell line was maintained at 37°C with 5% CO₂ using RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% decomplexed fetal calf serum (FCS), 100 IU/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin.

(iii) **Human blood monocyte-derived macrophages.** Human blood monocyte-derived macrophages (HMØ) were obtained by purifying monocytes from peripheral blood mononuclear cells obtained from blood buffy coats (supplied by Etablissement Français du Sang, Rennes, France), as described earlier (22). Briefly, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-mediated differentiation of monocytes was conducted for 6 days to obtain primary human macrophages; cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% decomplexed FCS. The culture conditions were similar to those mentioned for THP-1 macrophages.

Macrophage cytotoxicity assay. The cytotoxicity test was performed with macrophages derived from THP-1 and HMØ by an MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay as described earlier (23). Briefly, the THP-1-derived macrophages were matured overnight (96-well plate) with the culture conditions mentioned above at a final density of 10⁵ macrophages/well. The medium was removed, and fresh medium was added with the final concentrations of different Galf derivatives (5 μM to 3,200 μM) and HePC (3 μM to 2,457 μM). The macrophages were further incubated for 24 h before proceeding with MTT. Briefly, the medium was removed carefully and replaced by 100 μl of MTT (Molecular Probes, CA) solution at 0.5 mg/ml according to the manufacturer's protocol. The plates were incubated for 2 h at 37°C; afterwards, the medium was removed, and 100 μl of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added in each well. Absorbance was read at 540 nm using a SpectroStar Nano instrument (BMG Labtech, USA) to determine the amount of formazan production, which determines the relative cell viability. Data were analyzed using the MARS data analysis software program. The cytotoxicity concentration for 50% of cells (CC₅₀) for Galf derivative-treated conditions was determined by setting the optical density of the control to 100%. All conditions were performed in triplicate.

Promastigote growth inhibition assay. The *in vitro* antiparasitic effect of the synthesized galactofuranose derivatives was evaluated on promastigotes by using a culture microtitration method as previously described (19, 24, 25). Briefly, *L. donovani* promastigote parasites expo-

nentially propagated (day 3 of culture) were incubated with different concentrations of GalF derivatives (1 μM to 3,200 μM) and HePC (0.9 μM to 2,457 μM) under sterile conditions. The concentration of parasites was set at $10^5/\text{ml}$ (10,000 promastigotes/well), and each condition was tested in triplicate. After 48 h of incubation, serial 2-fold dilutions of the suspensions were performed in 96-well microplates using Schneider's drosophila culture medium, to reach the dilution limit of residual viable parasites. Subsequently, the plates were incubated for 3 additional days and were examined using an inverted microscope at a magnification of $\times 200$ or $\times 400$. Evaluation of parasite survival was assessed by determining the presence or absence of mobile promastigotes in each well, and evaluation of parasite growth was done by obtaining the last dilution titer for which the well contained at least one parasite; comparison was done between treated and untreated conditions. The effects of galactofuranose derivatives on *L. donovani* promastigote growth were expressed as the reduction percentage of parasite growth obtained for each drug concentration, by comparison to untreated wells, and the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was determined. The selectivity index (SI) was calculated as $\text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$, as described earlier (26). Each experiment was repeated at least thrice.

Promastigote cytotoxicity assay. A commercial cell cytotoxicity assay (CellTox Green; Promega) was also used to determine the IC_{50} of compounds. This assay is based on the intensity of fluorescence detection after binding of a fluorescent dye to DNA of cells with impaired membrane integrity. Fluorescence intensity is proportional to cell death. The experiment was performed following the manufacturer's instructions. Briefly, serial dilutions (160 μM to 0.156 μM) of compounds were incubated with 75×10^3 parasites ($1.5 \times 10^6/\text{ml}$) in a black 96-well microplate for 24 h. Then, 100 μl of CellTox reagent diluted to 1/500 was added per well, placed for 1 min on a rotating agitator, and then incubated for 15 min at room temperature (RT). Fluorescence was detected on a fluorocytometer (Gemini) using 485- to 500-nm (excitation) and 520- to 530-nm (emission) filters. Results were acquired by using SoftMax Pro Gemini XS software and converted to Excel format. Experiments were performed in quadruplicate and repeated twice.

STDD-NMR. The quantification of molecular interaction of *L. donovani* promastigotes (whole cells) and compounds 1, 2, 3, 4, 5, and 6 were analyzed by saturation transfer double difference (STDD)-NMR. Galactose was used as a negative control. Parasite cultures at exponential growth stage (3 to 5 days) were harvested by centrifugation at $2,500 \times g$ for 15 min at 4°C . The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) buffer (pH 7). The same steps were repeated twice using deuterated PBS (previously exchanged with D_2O ; pH = 7.5 to 7.8). Each sample tube was filled with an amount of *L. donovani* ranging from 2×10^8 to 2.7×10^8 cells per tube. The product tested was introduced at a concentration of 1.5 mg/ml and completed to 500 μl of deuterated PBS. This concentration of 1.5 mg/ml was chosen to ensure observing properly the effects and avoiding a too-long acquisition time, which could lead to cell degradation. All samples were checked by microscopy after the experiments to ensure that these conditions did not affect cell integrity during data acquisition.

STD-NMR experiments were recorded at 298 K on a Bruker Advance III 400-MHz spectrometer. The on-resonance irradiation and the off-resonance of the cell suspension were performed at 7 ppm and +100 ppm, respectively; the resulting difference between both spectra constitutes the saturation transfer difference (STD) spectrum. Acquisition of an STD-NMR spectrum for each compound was made in the absence of cells as a reference in order to verify the absence of STD effect under these experimental conditions. The STD-NMR reference spectrum of the cell suspension without compound was used for the double-difference filter. The final STDD spectra were obtained by manually subtracting the cell STD spectrum from each of the (cells plus compound) spectra. Intensities of all STD effects were calculated through integrals over the respective signals in a ^1H NMR reference spectrum. The largest STD effect in each spectrum was set to 100%, and relative intensities were determined. Hence, suffi-

cient comparisons of relative STD effects between the different compounds were possible, but absolute binding intensities could not be determined.

EPR. The fluidity of the *L. donovani* promastigote membrane was determined by a spin-labeling method using electron paramagnetic resonance (EPR), as described previously (27). *L. donovani* promastigotes were incubated with the obtained IC_{50} of different GalF derivatives (compounds 1, 2, and 3) or with controls (compounds 5, 6, and HePC) for 48 h at 27°C . Standard controls having membrane fluidifying and stabilizing effects, namely, Tween 20 and ursodeoxycholic acid (UDCA), respectively, were used (27, 28). To investigate the reversibility and specificity of the rigidifying effect observed with compound 1, *L. donovani* promastigotes were initially incubated with compound 1 for 48 h and then washed using PBS and treated with Tween 20 or UDCA for 30 min before EPR analysis. Afterwards, the parasites were washed twice with PBS and were spin labeled with 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-doxylstearic acid (DSA) (Sigma-Aldrich), a fatty acid exhibiting a stable nitroxide radical ring at the C-5 position. After three washing steps with PBS, the resulting promastigote sample was transferred to a disposable glass capillary. The EPR spectra of untreated and treated labeled samples were acquired at room temperature on a Bruker Elexsys EPR spectrometer operating at 3,509-G center field, 20-mW microwave power, 9.86-GHz microwave frequency, 1.77-G modulation amplitude, and 100-kHz modulation frequency. The fluidity of the labeled membrane was quantified by calculating the order parameter S according to equations described previously (29). The S value is inversely proportional to the membrane fluidity; an increase in the value of S is interpreted as a decrease in membrane fluidity and vice versa. All conditions were performed in triplicate and obtained from three identical experiments.

TEM. *L. donovani* promastigotes were incubated with two different galactofuranose derivatives (compounds 1 and 3) at 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5×10^8 promastigotes/sample) for 48 h at 27°C . Afterwards, the parasites were washed twice with PBS and then centrifuged and fixed for 4 h with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2), rinsed, and then post-fixed for 3 h with 1.5% OsO_4 in the same buffer. Samples were washed and dehydrated in a graded series of increasing concentrations of ethanol (50, 70, 80, 90, and 100% [vol/vol]). Pure ethanol was then exchanged by propylene oxide, and samples were gradually infiltrated with increasing concentrations (30, 50, 70, and 100% [vol/vol]) of epoxy resin (mixed with propylene oxide) for a minimum of 3 h per step. Samples were left overnight in pure epoxy resin. Infiltration was continued the next day with 2,4,6-Tris dimethylaminomethyl phenol-30 (DMP30)-epoxy resin for 3 h. Samples were finally embedded in a new mix of DMP30-epoxy resin and polymerized at 60°C for 24 h. Ultrathin sections (80 nm) were then cut with a UCT Leica ultramicrotome, placed on grids, poststained for 30 min with uranyl acetate and then for 20 min with lead citrate, and viewed with a Jeol 1400 TEM supplied with a Gatan Orius camera.

Analysis of PS externalization by flow cytometry. Apoptosis-like cell death is characterized by the exposure of phosphatidylserine (PS) at the cell membrane. PS externalization was determined according to the manufacturer's protocol using the commercial Dead Cell apoptosis kit (Molecular Probes), with annexin V-Alexa Fluor 488 and propidium iodide (PI). Annexin V binds to the cell by exploiting its high Ca^{2+} -dependent affinity for PS, whereas PI labeling is observed following necrosis. Briefly, *L. donovani* promastigotes were incubated with or without compound 1 or 2 at their respective IC_{50} s for 24 h, washed twice using PBS, and resuspended in annexin binding buffer at 1×10^7 parasites/100 μl . Staurosporine (STS) was used as a positive control for apoptosis and incubated with parasites at a final concentration of 2.5 μM . Five microliters of annexin V solution and 1 μl PI at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were added, and the mixture was incubated for 15 min at room temperature, following the manufacturer's instructions. Afterwards, 400 μl of annexin binding buffer was added, and the fluorescence of the stained parasites was analyzed using a Beckman Coulter FC500 cytometer; fluorescence emission was quantified using CXP analysis software.

TABLE 1 *In vitro* IC₅₀s of various galactofuranose derivatives for *L. donovani* promastigote growth and determination of CC₅₀s toward human macrophages

Compound	IC ₅₀ (μM) ^a (mean ± SEM)	CC ₅₀ (μM) ^a (mean ± SEM)		Selectivity index (CC ₅₀ /IC ₅₀)	
		HMØ	THP-1	HMØ	THP-1
1	8.96 ± 2.5	1,431.4 ± 0.4	1,508.4 ± 0.03	159.7	168.3
2	41.6 ± 8.3	736.6 ± 0.1	804.6 ± 0.08	17.7	19.3
3	800 ± 0	1,595.4 ± 0.4	1,608.8 ± 0.03	1.99	2.01
4	1,360 ± 16.6	747.4 ± 0.3	ND	0.55	ND
HePC	3.38 ± 0	128.1 ± 0.3	146.1 ± 0.03	37.9	43.2

^a Each concentration (serial dilutions) was tested in triplicate in three independent experiments. IC₅₀, 50% inhibitory concentration; CC₅₀, cytotoxic concentration; HMØ, blood-derived human macrophages; ND, not determined.

Confocal microscopy analysis of annexin V binding. *L. donovani* promastigotes (10⁷) were treated with compound 1 at IC₅₀ for 24 h or left untreated, later washed once using PBS, and labeled for morphological visualization using carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen) during 5 min at a 2 μM concentration for 10⁷ parasites/ml. Then, parasites were labeled with annexin V-phycoerythrin (PE) (apoptosis detection kit; BD Pharmingen) according to the manufacturer's instructions. After a washing step with PBS, parasites were observed by using a Leica TCS SP5 microscope (Leica Microsystems). Images were processed using LAS-AF software (Leica Microsystems).

Amastigote growth inhibition assay. Human macrophages (THP-1) were cultured in 8-well Labtech slides and infected for 24 h with untreated *L. donovani* promastigotes at a 20:1 promastigote/macrophage ratio. Wells were washed 5 times using culture medium to remove all extracellular promastigotes and were incubated with either compound 1, 2, or 3 at 80 μM or HePC at 7.66 μM for 48 h at 37°C. The cells were washed once with medium and stained with May-Grünwald Giemsa (MGG) stain, and the percentage of infected macrophages was determined (presence of intracellular parasites) via microscopic examination using a 100× oil immersion lens. A minimum of 200 macrophages were counted in different locations of each stained well for both treated and untreated conditions. Data were analyzed by setting values of multiplying amastigotes (>2 parasites/cell) to 100% for untreated wells and comparing with values obtained with treated conditions. All conditions were done in triplicate and repeated at least three times.

Detection of ROS production. To determine the generation of reactive oxygen species (ROS) in *L. donovani*-infected macrophages, we used the cell-permeating probes dihydrorhodamine 123 (DHR) and dihydroethidium (DHE) for measuring the production of peroxide and superoxide species, respectively. The techniques were optimized as described previously (30) with some modifications. DHR 123 (Molecular Probes) was used to detect increased fluorescence after passive diffusion across the parasite membrane, where it reacts with hydrogen peroxide in the presence of peroxidases from cationic rhodamine 123 emitting green fluorescence, which localizes in the mitochondria. DHE (Molecular Probes) forms a red fluorescent product (ethidium) upon reaction with superoxide anions. HMØ were infected with *L. donovani* (10:1) for 24 h, followed by treatment with 80 μM compound 1 or 2 for 24 h. Lipopolysaccharide (LPS) was used as a control to stimulate HMØ ROS production. Cells were washed with PBS and then centrifuged and incubated with either DHR or DHE in a 1-ml volume for 60 min and 20 min, respectively. Cells were washed once with cold PBS, and fluorescence was measured by flow cytometry using a Beckman Coulter FC500 cytometer. Quantification of fluorescence emission was analyzed using CXP analysis software.

Statistical analysis. Data were expressed as arithmetic means ± standard errors of the means (SEM) and compared using the Mann-Whitney test. Statistical analysis was made using the GraphPad Prism v5 software program (GraphPad Software, USA). Statistically significant results are indicated as follows: □, *P* < 0.05; □□, *P* < 0.01; □□□, *P* < 0.001.

RESULTS

Inhibition of *L. donovani* promastigote growth by Galf derivatives *in vitro*. Several Galf derivatives showed inhibition of parasite growth, notably compounds 1 and 2, with IC₅₀s of 8.96 ± 2.5 μM and 41.6 ± 8.3 μM, respectively. Contrasting with that, compounds 3 and 4 showed limited or no effect on parasite growth even at high concentrations compared to results under the control untreated condition (Table 1). Overall, the efficacies of the four compounds could be ranked as compound 1 being the most effective, followed by compounds 2, 3, and 4, in decreasing order of effectiveness. To gain further insight into the mechanism of action of Galf derivatives and particularly to investigate whether the strong effects shown by compound 1 were due to the octyl chain or to the sugar ring structure, we subsequently tested its structural isomer compound 5 (*n*-octyl-β-D-galactopyranoside) and compound 6 (octyl chain alone). We found no effects on the growth of *L. donovani* promastigotes using optimal concentrations of compound 5 or 6. In parallel, *L. donovani* promastigotes were cultured with HePC, and the calculated IC₅₀ was 3.38 μM under experimental conditions similar to those for other Galf derivatives (Table 1). The determination of IC₅₀ using the CellTox Green assay confirmed that the best antileishmanial activity was obtained with compound 1 (IC₅₀ = 2.4 μM; 95% confidence interval [CI], 0.39 to 14.7 μM) and suggested that this compound had an effect on membrane integrity. Indeed, the principle of this assay relies on the intracellular penetration of a dye and fluorescence detection after binding to DNA, which can occur only in the case of membrane alterations. Results with this assay led to a somewhat similar IC₅₀ for compound 2 but with a huge unreliable confidence interval (95% CI = 0.3 to 39.7) and did not yield any result for the remaining compounds or for HePC (data not shown).

Galf derivatives have low cytotoxic effect on human macrophages. The MTT assay showed that Galf derivatives did not present any cytotoxic effects against either THP-1 or HMØ at optimum biological activity concentrations. The CC₅₀ of compounds 1, 2, 3, and 4 toward HMØ was high, ranging from 1,431.3 ± 0.4 μM to 747.3 ± 0.3 μM, whereas it was 128.1 ± 0.3 μM for HePC (Table 1). The selectivity index (SI) was calculated for the Galf derivatives; the most significant SI was obtained for compound 1, which was 4.2 times better than that of HePC with blood-derived human macrophages (159.7 versus 37.9, respectively). Similar results were obtained with the THP-1 cell line (Table 1). Due to its higher IC₅₀, the SI of compound 2 was lower than that of HePC.

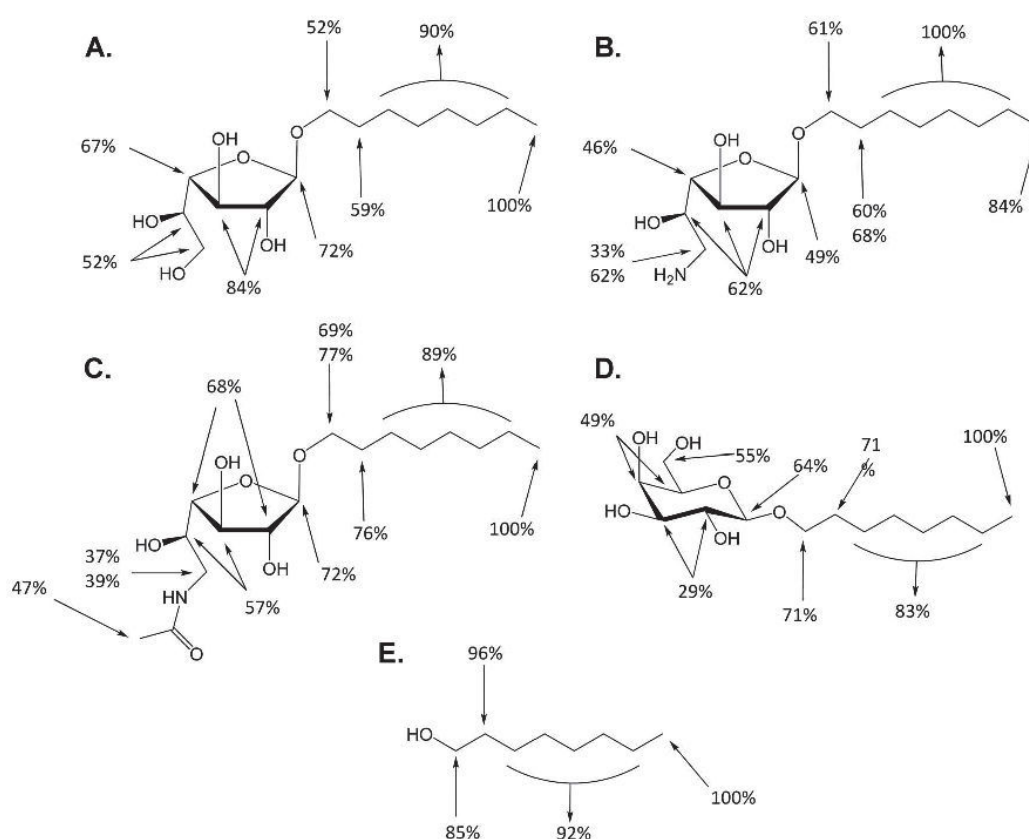


FIG 2 Quantification of molecular interactions of Galf derivatives with the promastigote membrane by STDD-nuclear magnetic resonance. Interaction results obtained for compound 1 (A), compound 2 (B), compound 3(C), compound 5(D), and compound 6 (E) are shown. The terminal protons of the alkyl chain yielded the highest STD effect in each spectrum and thus was set to 100%, and the relative intensities of other molecular structures were determined. Data are representative of two independent experiments.

STDD-NMR spectroscopy demonstrates molecular interaction between *L. donovani* promastigotes and galactofuranose derivatives. STD-NMR nowadays constitutes a reliable and cheap tool for observing interactions between ligands and their biological receptors or ligands (31). In order to determine the level of interaction between the galactofuranose derivatives and *Leishmania donovani* membrane assemblages, we used a second generation of STD-NMR, termed saturation transfer double difference (STDD-NMR), which can be an effective tool when using whole cells (32, 33). The double STD (STDD) spectrum is obtained from the difference between the STD spectrum of a sample containing cells and their presumed ligand and the STD spectrum obtained with the sole cells, thus eliminating noise due to other molecular components present in the cell surface.

Octyl galactofuranosides were all tested at a concentration of 1.5 mg/ml, below the compound 1 critical micelle concentration, which is 1.78 mg/ml, thus avoiding a micellar state. Such concentrations were previously shown to be needed to measure an interaction between a compound and the membrane (34). The resultant effects were expressed as percentages, giving 100% to the highest signal, which is in all cases the signal for the terminal protons of the alkyl chain. Compounds 1, 2, and 3 showed similar results, namely, a strong STD effect on the alkyl chain and relative

close intensities for all the other sugar ring protons (Fig. 2). Although interaction intensities of the sugar ring were similar for the three above-cited compounds, they were somewhat higher for the compound 1 sugar motif (52% to 84%) than for compound 2 (33% to 62%) and compound 3 (37% to 72%) (Fig. 2). Compound 4 did not yield any workable spectrum despite repeated experiments.

To correlate these assays to the *in vitro* experiments, STDD spectra of compound 5 (*n*-octyl-galactopyranoside) and compound 6 (*n*-octanol) were also set up and showed also a similar pattern of interaction for the alkyl chain (high transfer saturation) but a lower one for each of the galactopyranose sugar ring protons (29% to 55% interaction only) (Fig. 2). A negative control using galactose, which led to no STD effect at all, confirmed that the observed signals were not an artifact.

Compounds 1 and 2 exert a rigidifying effect on the *L. donovani* promastigote membrane. To further explore the consequences of this molecular interaction of galactofuranose derivatives with *L. donovani* promastigotes, we evaluated their effect on membrane fluidity using the EPR technique. Three Galf derivatives yielding distinctive effects on parasite growth *in vitro* were selected, i.e., compounds 1, 2, and 3. A significant increase in the value of *S* (order parameter *S*) in parasites treated with compound

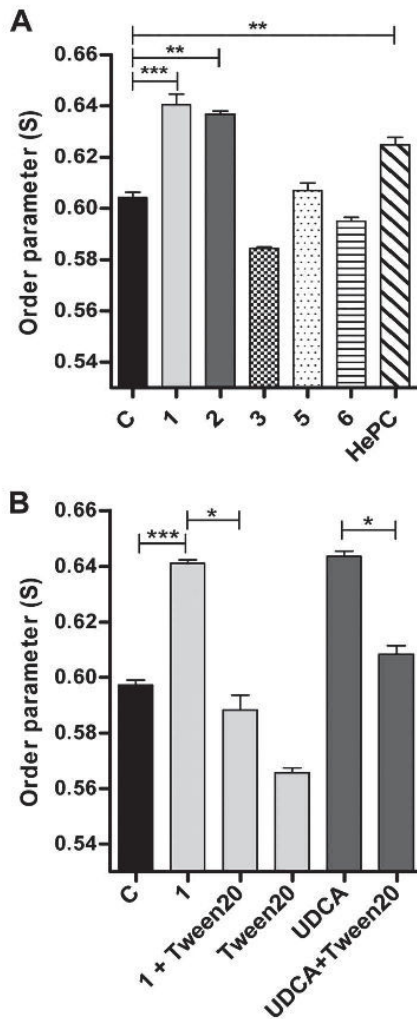


FIG 3 Analysis of membrane fluidity by electron paramagnetic resonance. Parasites were incubated with or without the Galf derivatives for 2 days and then incubated with spin label 5-DSA. (A) Treatment with compounds 1 and 2 at their respective IC_{50} and with compounds 3, 5, and 6 at $>400 \mu\text{M}$ concentrations; lane C represents untreated control parasites. (B) Reversal of rigidifying effect of compound 1 after treatment with Tween 20 and similar effects observed after treatment with the rigidifying control UDCA followed by Tween 20. Data are expressed as means \pm SEM and are representative of three independent experiments; each condition was tested in triplicate. Significance of results is expressed as follows: $\square\square$, $P < 0.001$; \square , $P < 0.01$; \square , $P < 0.05$.

1 at the IC_{50} was obtained ($S = 0.64 \pm 0.004$ versus 0.604 ± 0.002 in treated and untreated control parasites, respectively; $P < 0.0001$) (Fig. 3A). Since S is inversely proportional to the membrane fluidity, compound 1 appears to significantly rigidify the *L. donovani* phospholipidic membrane. Similar results were obtained for compound 2, with an S value of 0.63 ± 0.001 ($P < 0.001$). In contrast, when parasites were treated with the least-effective compound, compound 3, no significant difference in the value of the order parameter was observed ($S = 0.584 \pm 0.0006$; P value is not significant [ns]), indicating that this compound had no effect on promastigote membrane fluidity. Two other compounds, 5 and 6, which showed interaction by NMR, which was

lower, but no antiparasitic effects, were also analyzed for their effects on membrane fluidity. Neither significantly modified membrane fluidity (Fig. 3A).

To further validate the rigidifying effect of compound 1, we verified the effect of treatment with Tween 20 and ursodeoxycholic acid (UDCA). Results showed the reversal of the rigidifying effect of compound 1, with an S value of 0.566 ± 0.002 and an S value of 0.588 ± 0.005 ($P < 0.05$) before and after Tween 20 treatment, respectively, yielding results similar to those for parasite treatment with Tween 20 alone ($S = 0.566 \pm 0.002$; $P = \text{ns}$). Additionally, UDCA was added to the *L. donovani* promastigotes for 1 h of incubation as a stabilizing control (28) and confirmed a rigidifying effect at a level similar to that obtained with compound 1 ($S = 0.643 \pm 0.002$). This effect due to UDCA could be also reversed by treatment with Tween 20 ($S = 0.608 \pm 0.003$; $P < 0.05$) (Fig. 3B).

Transmission electron microscopy analysis of *L. donovani* promastigotes treated with compound 1 reveals profound structural alterations. We investigated the nature and extent of damage to *L. donovani* promastigotes caused by compound 1, using TEM. Compound 3, which had little effect on parasite growth, was used as a control. Untreated promastigotes presented well-defined, intact cellular structural details (Fig. 4A), notably on higher magnification ($\times 80,000$). In particular, the surface remained intact, which is essential for the viability of promastigotes, and the subpellicular microtubules structure is intact, as shown in longitudinal or cross-sectional views (Fig. 4A, panels c, e, and f). Conversely, after 48 h of incubation with compound 1, about 90% of parasites showed severe alterations (Fig. 4B, panels g and k), extending from the phospholipidic membrane to inside organelles (Fig. 4B, panels h and l). Structural abnormalities included prominent surface changes, including the detachment of the plasma membrane from the layer of subpellicular microtubules (Fig. 4B, panels i and m) or a complete interruption of the plasma membrane (Fig. 4B, panels j and l) leading to extensive damage of cytoplasmic organelles, such as the cell nucleus, kinetoplast, mitochondria, and storage compartments, and a leakage of damaged organelles outside the cell. Beside these striking effects observed with compound 1, compound 3 did not lead to major alterations of membrane integrity but rather induced some deformations (Fig. 4C), which had no visible consequences for intracellular organelles, thus probably explaining the lack of effect on parasite survival and growth.

Compound 1 induces apoptosis in *L. donovani* promastigotes. A confocal analysis of promastigotes labeled with annexin V and CFSE revealed an increase in surface binding of annexin V after treatment with compound 1 (Fig. 5A) compared to that for untreated parasites. Flow cytometry analysis of promastigotes treated with compound 1 or 2 showed a dramatic increase in annexin V binding, with 91.1% and 81.5% of labeled cells, respectively, compared to that for untreated parasites (4.4%). The mean fluorescence intensity (MFI) of annexin V⁺ parasites was significantly higher than that of untreated ones ($P < 0.05$) (Fig. 5B and C). In contrast, PI labeling was very low in control parasites and did not increase after treatment, confirming that parasite damage induced apoptosis and that death was not due to necrosis.

Compound 1 controls intramacrophagic amastigote growth through stimulation of ROS production. To examine the capacity of Galf derivatives to control the intramacrophagic amastigote multiplication, THP-1-derived macrophages were infected with

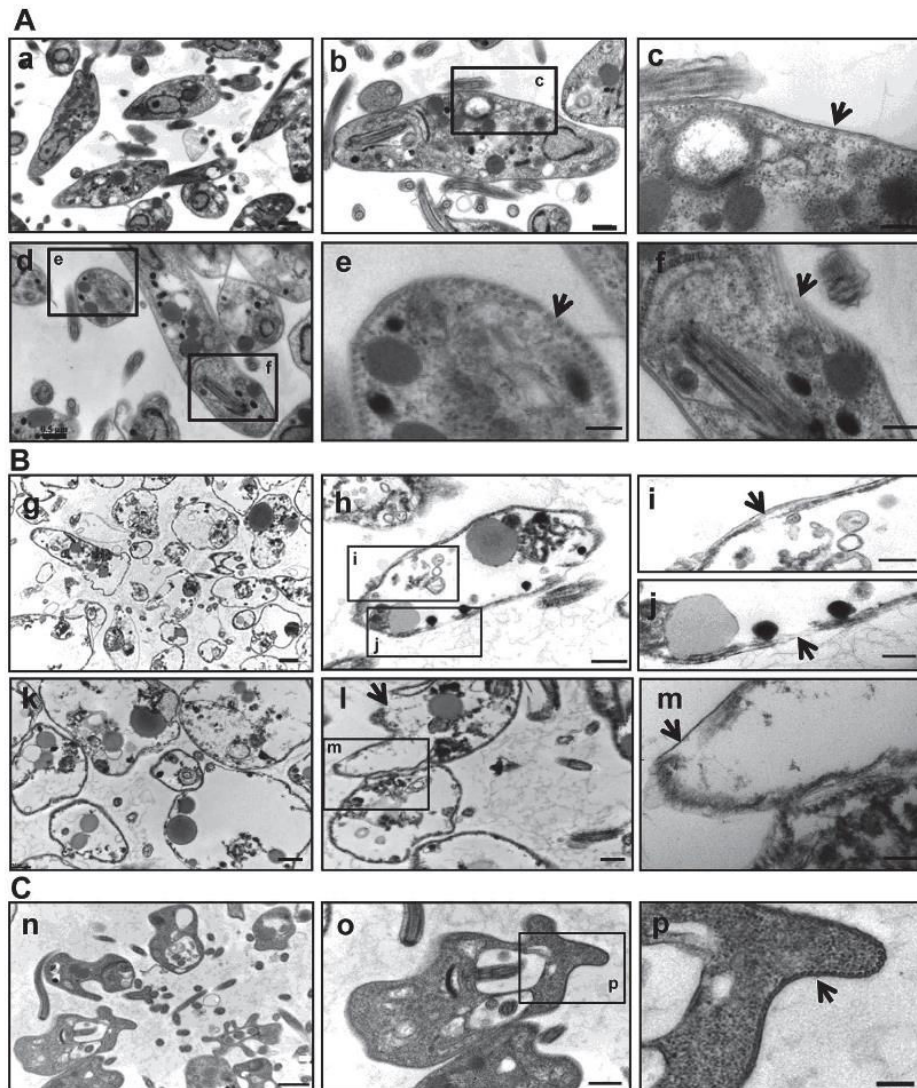


FIG 4 Ultrastructural analysis of *L. donovani* promastigotes by transmission electron microscopy. (A) Untreated promastigotes with intact cytoplasmic organelles (a and d), intact plasma membrane (arrow) (b and c), or intact subpellicular microtubules (arrow) (e and f). (B) Promastigotes treated with compound 1, showing a high proportion of altered parasites (g and k), partial (h and i, arrow) or complete (m, arrow) detachment of the plasma membrane from the layer of subpellicular microtubules or complete disruption of the plasma membrane (j and l, arrow), or destruction of numerous intracellular organelles. (C) Compound 3-treated promastigotes, showing deformation of the plasma membrane (n and o) but no membrane rupture (p, arrow). Data are representative of two independent experiments. Scale bars represent 1 μm (a, g, and n) at magnification $\times 12,000$ (12K), 0.5 μm (b, d, h, k, and o) at magnification 25K, or 0.2 μm (c, e, f, i, j, m, and p) at magnification 80K.

L. donovani promastigotes for 24 h and then treated with the different compounds for 48 h. Compounds 1 and 2 significantly reduced amastigote multiplication ($P < 0.05$), whereas only moderate effects were observed with compound 3 (Fig. 6). HePC used as a control showed effective inhibition of amastigotes multiplication inside infected macrophages in a manner similar to that of compound 1 (Fig. 6).

To investigate the mechanism by which macrophages control amastigote growth, we quantified ROS production by flow cytometry. The MFI of DHR⁺ infected macrophages was significantly

increased in parasites treated with compounds 1 and 2, but to a greater extent with compound 2 ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively) (Fig. 7A), indicating peroxide production in these cells. Similarly, superoxide detection was increased in infected macrophages treated with compounds 1 and 2 ($P < 0.05$) (Fig. 7B) compared to that for untreated macrophages.

DISCUSSION

Recent first-line drugs against leishmaniasis include miltefosine, paromomycin, and liposomal amphotericin B, which present

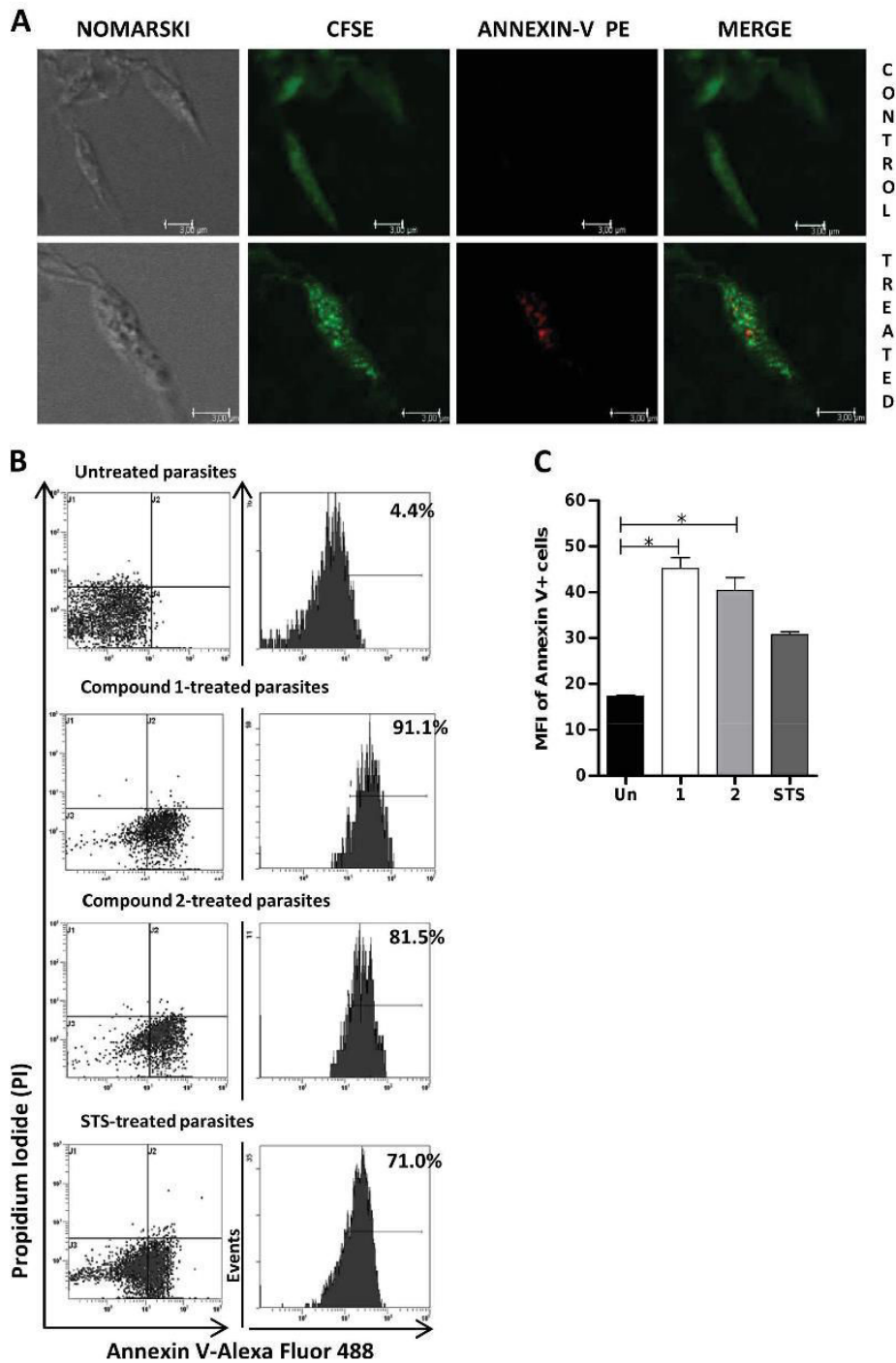


FIG 5 Quantification of apoptotic promastigotes. (A) Confocal microscopy examination of *L. donovani* promastigotes incubated with compound 1 at its IC_{50} (lower panel) or left untreated (upper panel) and then labeled with CFSE and annexin V-PE. Representative slides from triplicate experiments are shown. (B) Flow cytometry analysis of *L. donovani* promastigotes labeled with annexin V-AF488 and PI. Staurosporine (STS) was used as a positive control for apoptosis. The left panels show dot plots from control or treated parasites, and right panels show the quantification of annexin V-positive cells. Each panel is representative of triplicate experiments. (C) Mean fluorescence intensity (MFI) of annexin V⁺ promastigotes, treated with compound 1 (1), compound 2 (2), or STS or left untreated (Un). Results are expressed as means \pm SEM of data from triplicate experiments, and significance is expressed as follows: \square $P < 0.05$.

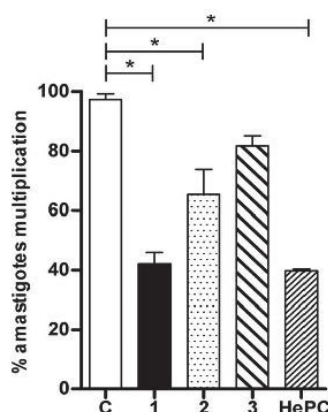


FIG 6 Inhibition of intramacrophagic *L. donovani* amastigote multiplication after treatment with Galf derivatives. THP-1 macrophages were infected by *L. donovani* promastigotes for 24 h and then treated for 48 h with different compounds. Results are presented as percentages of infected macrophages with multiplying amastigotes, determined by comparison to the values of untreated control wells (lane C) arbitrarily set to 100%. Significant results are shown as “□” ($P < 0.05$). Data are representative of three independent experiments.

multiple shortcomings, such as resistance and side effects (35, 36). Therefore, novel therapeutic approaches, particularly those aimed at exploring new horizons for the development of efficient antileishmanial molecules, are required (37–39). Current advances in our understanding of the biosynthesis of Galf-containing glycoconjugates have opened a new field of research, since these compounds are found at the surface of several widespread human pathogens, including *Leishmania* (13). Interestingly, galactose is also present in mammalian cells but exclusively in the hexopyranosyl form, thus making furanosides a specific target for intervention therapies (40).

Since UDP-Galf is essential for the biosynthesis of all glycoconjugates containing a Galf moiety, we first generated UDP-Galf derivatives with the aim of interfering with LPG synthesis or with *Mycobacterium smegmatis* growth, with promising results (19, 41). However, synthesis of UDP-Galf derivatives is a complex process, and further experiments are currently limited by the quantities of compounds synthesized.

In this work, we focused on synthetic alkyl galactofuranoside derivatives that fulfill two main criteria: (i) the presence of a C-6 alterable galactofuranose ring linked to a lipophilic C_8 tail, and (ii) their availability in large quantities. We demonstrated that activity of Galf derivatives against *L. donovani* promastigotes varied according to the group substituted at the C-6 position. Compound 1 showed the strongest effect on promastigote growth, whereas compound 2 had a moderate IC_{50} and compounds 3 and 4 were found to be poorly active. Additionally, we demonstrated that the activity of these furanoside compounds was specific by incubating parasites with a structural isomer of compound 1, i.e., compound 5 (Galp-Oct), and with the octyl chain, i.e., compound 6, solely. Both of them had no biological effect, implying that the activity is conferred by the furanoside ring. Our IC_{50} results using HePC on promastigotes are in coherence with previously published data (26, 42), thus allowing reliable comparison of efficacy between our molecules and a reference treatment.

The uniqueness of Galf derivatives relies in their low cell tox-

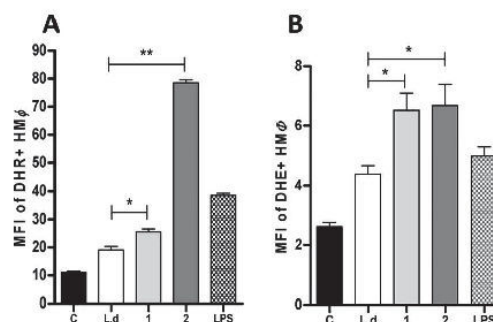


FIG 7 Quantification of reactive oxygen species (ROS) production by macrophages. Human macrophages (HMØ) were infected (lanes L.d, 1, 2, and LPS) or not (lane C) with *L. donovani* and then treated overnight with compound 1 (1) or compound 2 (2) or LPS or left untreated (L.d). (A) peroxide levels were measured using the specific fluorescent dye dihydrorhodamine (DHR). (B) Superoxide detection was quantified using dihydroxyethidium (DHE) staining. Significant results are shown as “□” ($P < 0.05$). Data are representative of two independent experiments.

icity. In our hands, the CC_{50} values obtained for THP-1 and HMØ were 6- to 12-fold lower than those with HePC, which showed cytotoxic levels similar to those described earlier by others (26, 43). Compound 1 had the most interesting SI, which was 4-fold higher than that of HePC.

Regarding the contrasting results obtained with the various C-6-modified octyl galactofuranosides, the poor inhibition observed with compound 3 (6- N_3 -) and compound 4 (6-NHAc-) suggests that the presence of a polar moiety at this terminal position is important to obtain an inhibitory effect on *L. donovani* promastigotes. Besides, we could rule out an effect due to the inherent auto-organization property of alkyl glycosides, which could possibly facilitate compound penetration into the membrane since the concentrations tested were well below the critical micelle concentration value (1.78 mg/ml for compound 1), and thus its activity was not due to a surfactant property. In addition, according to Weniger et al. (44), the biological activity of any drug cannot be attributed to cytotoxicity when its SI is \square 10, which was the case here.

These first observations suggested a specific interaction with the parasite membrane which could decrease parasite growth or modify cell recognition and prompted us to explore more deeply the properties of these compounds. To confirm the hypothesis that the products directly interact with *L. donovani* membrane assemblages, we proceeded to the setting up of STDD-NMR with whole cells. This technique yielded spectra showing that all of them could interact with the membrane through the octyl chain. We can therefore stress the fact that this part of the molecules is the closest to the membrane and could probably act as a lipophilic anchor or could possibly be recognized by enzymes presenting a hydrophobic pocket. Additionally, a moderately stronger interaction of the furanoside ring than of the pyranoside ring was observed by NMR, emphasizing the role of the specific sugar structure in the biological effects observed on *Leishmania* survival and infectivity.

Since molecular interaction through the octyl chain seems essential to anchor the molecule but unlikely to support the specificity of the biological effect, we used EPR to further investigate the potential role of the furanose form on the promastigote mem-

brane. It appeared that compounds 1 and 2 had a significant rigidifying effect on the promastigote membrane, similar to the UDCA stiffening control, an effect which was not observed with compound 3 or 5, both of which otherwise had little biological effect on parasite growth. Huge membrane and intracellular damages induced by compound 1 but not by the poorly efficient compound 3 were evidenced using TEM. In other studies reporting the effect of drugs like HePC and diterpenoid alkaloids, parasite death seems to result from intracellular damages rather than primary membrane damage (37, 45). This is consistent with the results of our cytotoxicity assay using CellTox green dye, which can efficiently enter cells and bind to DNA only in the presence of membrane alterations. In our hands, this assay was reliable to determine an IC₅₀ only for compound 1, which reinforces the finding that this drug can alter the parasite membrane. The initial membrane damage could then lead to promastigote apoptosis, as suggested by the high level of annexin V-positive parasites after treatment with compound 1, and subsequently to intracellular damages. These results definitely confirm that compound 1 is a potent drug against the promastigote stage of *L. donovani*.

Finally, since the ultimate goal of anti-*Leishmania* drug development is to combat the amastigote stage, we verified the effect of the most effective compounds, 1 and 2, on a model of human macrophages infected with *L. donovani*. Both compounds reduced intracellular amastigote growth, though compound 2 was efficient to a lesser degree. As a first attempt to explore the mode of action against amastigotes, we characterized ROS production by infected macrophages, and we obtained evidence that both compounds stimulate peroxide and superoxide production. Since an oxidative burst is the hallmark of an efficient antileishmanial response, as observed *in vivo* (46), this could explain the enhanced parasite control *in vitro*. Further explorations are needed to determine the mechanism of the effect on amastigotes more accurately, but these primary results are promising and are in agreement with a very recent article in which the authors showed an immunomodulatory effect of galactofuranosyl glycosides on macrophages (47).

In conclusion, we demonstrated for the first time a significant biological effect of two octyl galactofuranoside derivatives on *L. donovani* promastigotes and amastigotes, particularly compound 1, octyl-β-D-galactofuranoside, whose activity is supported by the furanose motif and seems to tightly interact with the parasite membrane. Thus, alkyl galactofuranosides could be an attractive basis for further drug development against this neglected disease.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant of Agence Nationale pour la Recherche (ANR BLANC 7181). R.D. thanks Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche for a grant. We also acknowledge the European Union (FEDER), the Region Bretagne, the Conseil Général d'Ille-et-Vilaine, Rennes Métropole, and the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) for financial support of the project Membratox.

We acknowledge Jean-Paul Guégan (ENSCR) for his valuable help in NMR experiment acquisition.

We have no transparency issues to declare.

REFERENCES

- WHO. 2010. Control of the leishmaniases. World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 2010(959):xii–xiii, 1–186, back cover.
- Buffet PA, Rosenthal E, Gangneux JP, Lightburne E, Couppie P, Morizot G, Lachaud L, Marty P, Dedet JP. 2011. Therapy of leishmaniasis in France: consensus on proposed guidelines. *Presse Med.* 40:173–184. (In French.) <http://dx.doi.org/10.1016/j.lpm.2010.09.023>.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:111–126. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.19.1.111-126.2006>.
- Gangneux JP, Dullin M, Sulahian A, Garin YJ, Derouin F. 1999. Experimental evaluation of second-line oral treatments of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:172–174.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* 5:873–882. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1748>.
- Matlashewski G, Arana B, Kroeger A, Battacharya S, Sundar S, Das P, Sinha PK, Rijal S, Mondal D, Zilberstein D, Alvar J. 2011. Visceral leishmaniasis: elimination with existing interventions. *Lancet Infect. Dis.* 11:322–325. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70320-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70320-0).
- Mondal S, Bhattacharya P, Ali N. 2010. Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 8:919–944. <http://dx.doi.org/10.1586/eri.10.78>.
- Mutiso JM, Macharia JC, Kiio MN, Ichagichu JM, Rikoi H, Gicheru MM. 2013. Development of *Leishmania* vaccines: predicting the future from past and present experience. *J. Biomed. Res.* 27:85–102. <http://dx.doi.org/10.7555/JBR.27.20120064>.
- Novozhilova NM, Bovin NV. 2010. Structure, functions, and biosynthesis of glycoconjugates of *Leishmania* spp. cell surface. *Biochemistry* 75: 686–694. <http://dx.doi.org/10.1134/S0006297910060027>.
- Kleccka B, Lamerz AC, van Zandbergen G, Wenzel A, Gerardy-Schahn R, Wiese M, Routier FH. 2007. Targeted gene deletion of *Leishmania* major UDP-galactopyranose mutase leads to attenuated virulence. *J. Biol. Chem.* 282:10498–10505. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M700023200>.
- Spath GF, Epstein L, Leader B, Singer SM, Avila HA, Turco SJ, Beverley SM. 2000. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania* major. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:9258–9263. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.160257897>.
- McConville MJ, Schnur LF, Jaffe C, Schneider P. 1995. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem. J.* 310(Part 3):807–818.
- Tefsen B, Ram AF, van Die I, Routier FH. 2012. Galactofuranose in eukaryotes: aspects of biosynthesis and functional impact. *Glycobiology* 22:456–469. <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwr144>.
- de Lederkremer RM, Colli W. 1995. Galactofuranose-containing glycoconjugates in trypanosomatids. *Glycobiology* 5:547–552. <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/5.6.547>.
- Oppenheimer M, Valenciano AL, Sobrado P. 2011. Biosynthesis of galactofuranose in kinetoplastids: novel therapeutic targets for treating leishmaniasis and Chagas' disease. *Enzyme Res.* 2011:415976. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/415976>.
- Legentil I, Audic JL, Daniellou R, Nugier-Chauvin C, Ferrieres V. 2011. Studies of a furanoside as antimycobacterial agent loaded into a biodegradable PBAT/sodium caseinate support. *Carbohydr. Res.* 346:1541–1545. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2011.04.025>.
- Davis CB, Hartnell RD, Madge PD, Owen DJ, Thomson RJ, Chong AK, Coppel RL, von Itzstein M. 2007. Synthesis and biological evaluation of galactofuranosyl alkyl thioglycosides as inhibitors of mycobacteria. *Carbohydr. Res.* 342:1773–1780. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2007.04.027>.
- Ferrières V, Bertho J-N, Plusquellec D. 1998. A convenient synthesis of alkyl D-glycofuranosiduronic acids and alkyl D-glycofuranosides from unprotected carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 311:25–35. [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00197-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00197-9).
- Dureau R, Robert-Gangneux F, Gangneux JP, Nugier-Chauvin C, Legentil I, Daniellou R, Ferrieres V. 2010. Synthetic UDP-furanoses inhibit the growth of the parasite *Leishmania*. *Carbohydr. Res.* 345:1299–1305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2010.02.020>.
- Rahman M, Ahmed BN, Faiz MA, Chowdhury MZ, Islam QT, Sayeedur R, Rahman MR, Hossain M, Bangali AM, Ahmad Z, Islam MN, Mascie-Taylor CG, Berman J, Arana B. 2011. Phase IV trial of miltefosine in adults and children for treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Bangladesh. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85:66–69. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0661>.
- Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P. 1996. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J. Leukoc. Biol.* 59:555–561.

22. van Grevenynghe J, Rion S, Le Ferrec E, Le Vee M, Amiot L, Fauchet R, Fardel O. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages. *J. Immunol.* 170:2374–2381.
23. Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, Sasamoto K, Hamamoto T, Suzuki K, Watanabe M. 1999. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.* 36:47–50. <http://dx.doi.org/10.1039/A809656B>.
24. Gangneux JP, Sulahian A, Garin YJ, Derouin F. 1996. Lipid formulations of amphotericin B in the treatment of experimental visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90:574–577. [http://dx.doi.org/10.1016/S0035-9203\(96\)90330-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0035-9203(96)90330-2).
25. Buffet PA, Sulahian A, Garin YJ, Nassar N, Derouin F. 1995. Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:2167–2168. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.39.9.2167>.
26. Morais-Teixeira E, Damasceno QS, Galuppo MK, Romanha AJ, Rabello A. 2011. The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106:475–478. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000400015>.
27. Sergeant O, Pereira M, Belhomme C, Chevanne M, Huc L, Lagadic-Gossmann D. 2005. Role for membrane fluidity in ethanol-induced oxidative stress of primary rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313:104–111. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.104.078634>.
28. Guldutuna S, Deisinger B, Weiss A, Freisleben HJ, Zimmer G, Sipos P, Leuschner U. 1997. Ursodeoxycholate stabilizes phospholipid-rich membranes and mimics the effect of cholesterol: investigations on large unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1326:265–274. [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2736\(97\)00030-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2736(97)00030-8).
29. Ogura R, Sugiyama M, Sakanashi T, Ninomiya T. 1988. ESR spin-labeling method of determining membrane fluidity in biological materials—tissue culture cells, cardiac mitochondria, erythrocytes and epidermal cells. *Kurume Med. J.* 35:171–182. <http://dx.doi.org/10.2739/kurumemedj.35.171>.
30. Carvalho L, Luque-Ortega JR, Lopez-Martin C, Castanys S, Rivas L, Gamarro F. 2011. The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:4204–4210. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00520-11>.
31. Bhunia A, Bhattacharjya S, Chatterjee S. 2012. Applications of saturation transfer difference NMR in biological systems. *Drug Discov. Today* 17:505–513. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2011.12.016>.
32. Claassen B, Axmann M, Meinecke R, Meyer B. 2005. Direct observation of ligand binding to membrane proteins in living cells by a saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy method shows a significantly higher affinity of integrin α IIb β 3 in native platelets than in liposomes. *J. Am. Chem. Soc.* 127:916–919. <http://dx.doi.org/10.1021/ja044434w>.
33. Pereira A, Pfeifer TA, Grigliatti TA, Andersen RJ. 2009. Functional cell-based screening and saturation transfer double-difference NMR have identified haplosamate A as a cannabinoid receptor agonist. *ACS Chem. Biol.* 4:139–144. <http://dx.doi.org/10.1021/cb800264k>.
34. Sylla B, Guégan J-P, Wieruszkeski J-M, Nugier-Chauvin C, Legentil L, Daniellou R, Ferrières V. 2011. Probing β -(1 \rightarrow 3)-D-glucans interactions with recombinant human receptors using high-resolution NMR studies. *Carbohydr. Res.* 346:1490–1494. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2011.03.038>.
35. Bhargava P, Singh R. 2012. Developments in diagnosis and antileishmanial drugs. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2012:626838. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/626838>.
36. Luque-Ortega JR, de la Torre BG, Hornillos V, Bart JM, Rueda C, Navarro M, Amat-Guerri F, Acuna AU, Andreu D, Rivas L. 2012. Defeating *Leishmania* resistance to miltefosine (hexadecylphosphocholine) by peptide-mediated drug smuggling: a proof of mechanism for trypanosomatid chemotherapy. *J. Control Release* 161:835–842. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.05.023>.
37. Sanchez-Moreno M, Gomez-Contreras F, Navarro P, Marin C, Ramirez-Macias I, Olmo F, Sanz AM, Campayo L, Cano C, Yunta MJ. 2012. In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:387–397. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr480>.
38. Ramirez-Macias I, Marin C, Salas JM, Caballero A, Rosales MJ, Villegas N, Rodriguez-Dieguez A, Barea E, Sanchez-Moreno M. 2011. Biological activity of three novel complexes with the ligand 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-one against *Leishmania* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:813–819. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq537>.
39. Coimbra ES, Libong D, Cojean S, Saint-Pierre-Chazalet M, Solgadi A, Le Moyec L, Duenas-Romero AM, Chaminade P, Loiseau PM. 2010. Mechanism of interaction of sitamaquine with *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:2548–2555. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq371>.
40. Pedersen LL, Turco SJ. 2003. Galactofuranose metabolism: a potential target for antimicrobial chemotherapy. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:259–266. <http://dx.doi.org/10.1007/s000180300021>.
41. Peltier P, Belanova M, Dianiskova P, Zhou R, Zheng RB, Pearcey JA, Joe M, Brennan PJ, Nugier-Chauvin C, Ferrieres V, Lowary TL, Daniellou R, Mikusova K. 2010. Synthetic UDP-furanoses as potent inhibitors of mycobacterial galactan biogenesis. *Chem. Biol.* 17:1356–1366. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.10.014>.
42. Vermeersch M, da Luz RJ, Tote K, Timmermans JP, Cos P, Maes L. 2009. In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:3855–3859. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00548-09>.
43. Foucher AL, Rachidi N, Gharbi S, Blisnick T, Bastin P, Pemberton IK, Spath GF. 2013. Apoptotic marker expression in the absence of cell death in staurosporine-treated *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:1252–1261. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01983-12>.
44. Weniger B, Robledo S, Arango GJ, Deharo E, Aragon R, Munoz V, Callapa J, Lobstein A, Anton R. 2001. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J. Ethnopharmacol.* 78:193–200. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00346-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00346-4).
45. Gonzalez P, Marin C, Rodriguez-Gonzalez I, Hitos AB, Rosales MJ, Reina M, Diaz JG, Gonzalez-Coloma A, Sanchez-Moreno M. 2005. In vitro activity of C20-diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25:136–141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.08.010>.
46. Robert-Gangneux F, Drogoul AS, Rostan O, Piquet-Pellorce C, Cayon J, Lisbonne M, Herbelin A, Gascan H, Guiguen C, Samson M, Gangneux JP. 2012. Invariant NKT cells drive hepatic cytokinic microenvironment favoring efficient granuloma formation and early control of *Leishmania donovani* infection. *PLoS One* 7:e33413. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033413>.
47. Sasaki GL, Rattmann YD, Santana-Filho AP, Riter DS, Iagher F, Trindade ES, da Silva MD, Santos AR, de Souza LM, Iacomini M, Gorin PA. 2013. Galactofuranosyl glycosides: immunomodulatory effects on macrophages and in vivo enhancement of lethality on sepsis. *Chem. Biol. Interact.* 205:29–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2013.05.014>.

2.2.3 Effet des dérivés du Galf sur les amastigotes

2.2.3.1 Evaluation de l'effet antiparasitaire sur les amastigotes

L'activité anti-amastigotes a été tout d'abord évaluée par comptage en microscopie optique.

Des macrophages humains cultivés en RPMI sur lame 8 puits (Nunc™ Lab-tek™ II chamber slide (Thermo Fisher Scientific)), ont été infectés par *L. donovani* (DOI 10/1). Après plusieurs lavages en PBS, les macrophages infectés ont été traités 48h par les différents dérivés du Galf à 80 µM (en milieu RPMI). Le Galf-oct a quant à lui été testé également à 40, 20, et 10 µM. Après plusieurs rinçages les lames ont été colorées au MGG et le taux d'infection a été mesuré en microscopie optique à l'objectif X50 à immersion. Pour chaque puits au moins 200 cellules infectées ont été comptées. Chaque condition a été réalisée en triplicat ou en quadruplicat et répétée au moins 2 fois. Les résultats sont présentés en fixant arbitrairement le taux d'infection des contrôles à 100%.

Les résultats (Figure 6, Article 3) montrent une réduction significative de 58% de la multiplication des parasites après traitement par le Galf-oct et de 34% pour le NH2-Galf. Une tendance de 17% de réduction de la multiplication est observée après traitement par NHAC-Galf (non significative).

L'activité du Galf-oct est la plus intéressante, identique à l'activité antiparasitaire du témoin miltéfosine qui permet une réduction de 60% de la multiplication des parasites dans les macrophages.

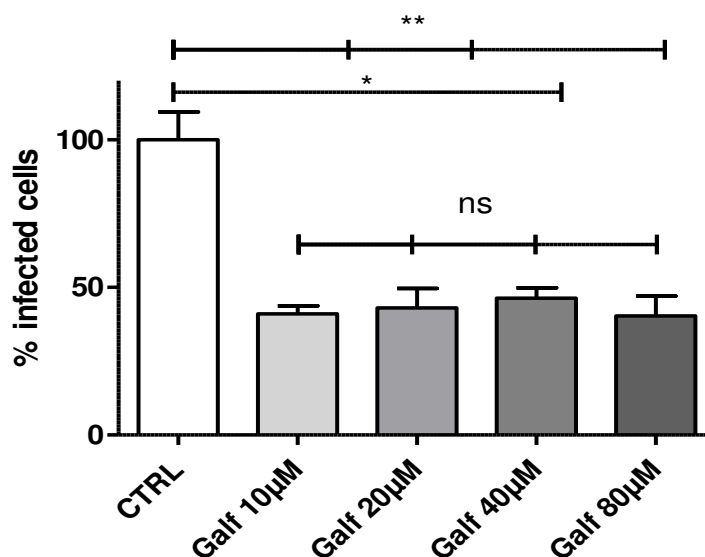


Figure 28 : Pourcentage de cellules infectées par *L. donovani* après traitement par Galf-oct à 10, 20, 40 et 80 µM

Graphique représentant le résultat le résultat d'une expérience en quadruplicat. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$

La réduction de la multiplication des parasites dans les macrophages est la même, environ 60% de réduction, quelle que soit la dose testée (Figure 28).

L'effet observé sur les promastigotes était concentration-dépendant permettant de mesurer une IC-50. Alors que sur les amastigotes, l'effet ne semble pas concentration-dépendant et la mesure de l'IC-50 n'a pas été possible (même en descendant à des concentrations très basses de Galf-oct). L'activité antiparasitaire sur les amastigotes, n'est peut-être donc pas uniquement due à une action directe des dérivés du Galf sur les parasites, mais pourrait être associée à une activité immunomodulatrice favorable à l'élimination des parasites par les cellules infectées, comme nous allons le voir dans la partie 2.2.3.3

2.2.3.2 Visualisation de l'effet des dérivés du Galf sur des amastigotes par microscopie électronique à transmission

Pour observer plus précisément l'effet du Galf-oct et du NH₂-Galf sur les amastigotes, des macrophages humains infectés et traités par ces 2 produits à 80 µM pendant 48h ont été observés en microscopie électronique.

Pour cela, les cultures ont été réalisées en boîte de Pétri stériles permettant après lavages de fixer directement les cellules en résine époxy dans la boîte de culture en conservant l'adhérence et la forme des macrophages, et de récolter ensuite les cellules dans la résine pour faire la découpe à l'ultratome et la coloration, selon le même mode opératoire que pour les promastigotes (cf. 2.2.2.5).

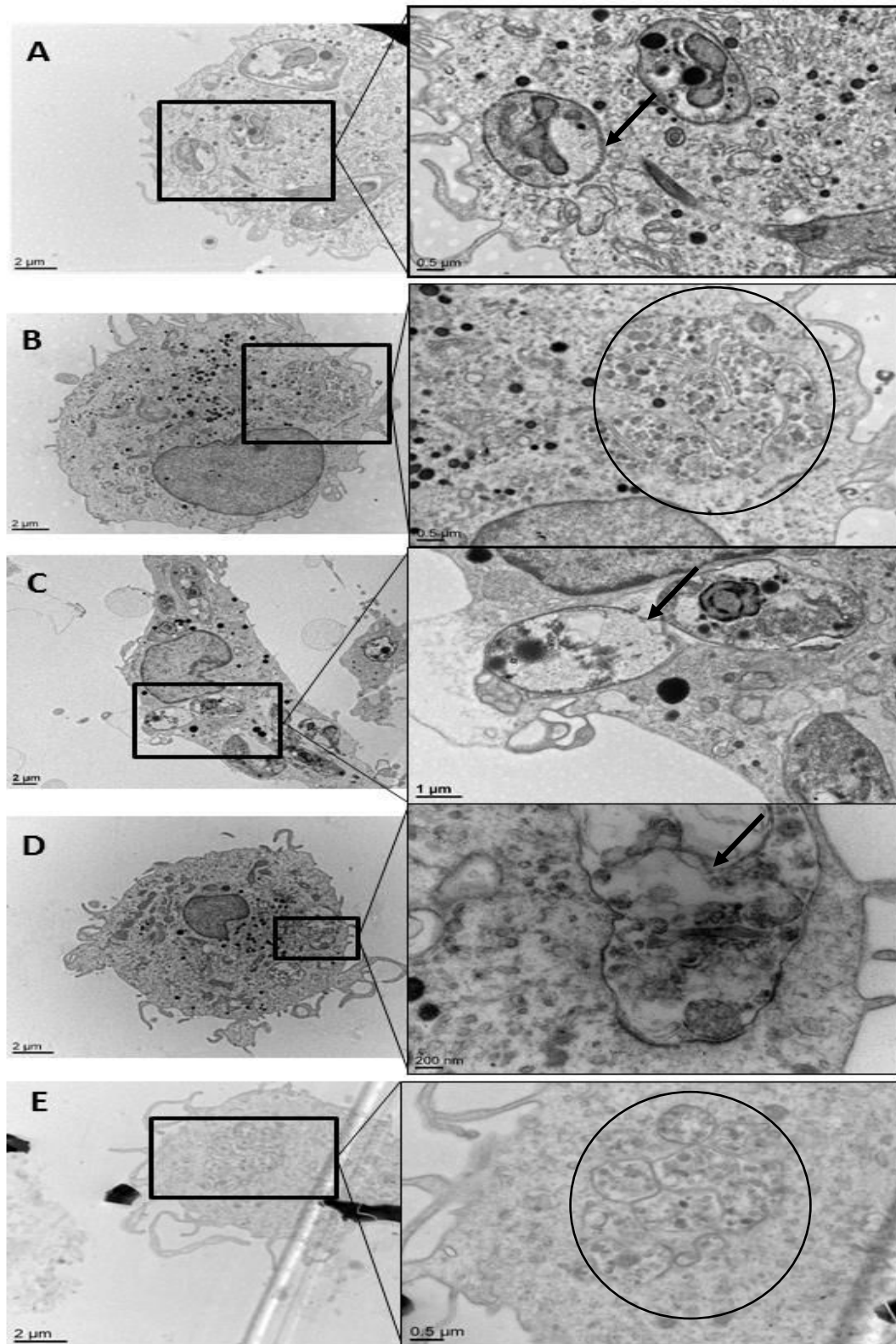


Figure 29 : Image par microscopie électronique à transmission de l'effet du GalF-oct (B, C, D) et de NH₂-GalF (E) comparé à un témoin intecté non traité (A)

Les amastigotes et les promastigotes dans les macrophages contrôles non traités sont bien définis, ils présentent une membrane plasmique sous laquelle un réseau de microtubules est présent sur les coupes transversales à très fort grossissement (Figure 29 A flèche noire) (x 80 000) et des organites internes intacts (Figure 29 A). Après 48h de traitement par le Galf-oct, on observe une réduction du nombre de cellules infectées, et au sein des cellules infectées, certains parasites sont très abimés et on ne reconnaît plus les organites internes (Figure 29 B et E cercles noirs) que ce soit après un traitement par Galf-oct (Figure 29 B) ou après un traitement par le NH₂-Galf (Figure 29 E). En dehors de ces parasites détruits, il y a aussi des parasites quasiment intacts au plus faible grossissement, mais pour lesquels on observe au très fort grossissement un effeuillage de la membrane au sein de la vacuole parasitophore (Figure 29 C et D Flèche noire).

Par ailleurs après traitement par NH₂-Galf des signes de souffrances cellulaires ont été observés (données non présentées).

2.2.3.3 Evaluation de la production de ROS et de NO par les macrophages infectés puis traités

L'immunité efficace anti-leishmanie, passe par une réponse orientée Th1 et aboutit à la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) en particulier des espèces nitrées oxygénées comme le monoxyde d'azote (159). Nous avons donc quantifié ces dérivés oxygénés après traitement.

2.2.3.3.1 Détection des ROS produit par des macrophages infectés puis traités par les dérivés du Galf

Nous avons évalué la production de ROS par les macrophages avec le kit de marquage au dihydroéthidium (DHE) (Molecular Probes® Invitrogen™ réf : D-1168) et le kit de marquage à la dihydrorhodamine 123 (DHR) (Molecular Probes® Invitrogen™ réf : D-632). Le DHE permet la détection des anions superoxydes O₂^{•-}. En effet, cette molécule qui fluoresce dans le bleu, diffuse librement dans le cytoplasme des cellules et s'oxyde en éthidium au contact des anions superoxydes. L'éthidium va ensuite s'intercaler à l'ADN dans le noyau et n'a pas le même spectre de fluorescence que le DHE, il est excité à 488 nm et émet à 585 nm. La DHR pénètre également librement dans les cellules, elle n'émet pas de fluorescence mais son oxydation par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), qui est un autre ROS, aboutit à la formation de rhodamine, qui elle, fluoresce (excitation à 505 nm et émission à 530 nm).

Des macrophages issus de PBMC ont été différenciés en macrophages selon le protocole décrit dans la partie 2.1.1.1, puis infectés par *L. donovani* (DOI 10/1) pendant une nuit ou non infectés et traités par le Galf-oct et par NH₂-Galf à 80 µM pendant 48h. Des contrôles non traités ont également été réalisés pour les 3 polarisations macrophagiques.

Après décollement et lavage au PBS, les macrophages ont été incubés à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 20 min avec la solution de DHE à 5µM ou pendant 1h avec la solution de DHR à 5µM. La fluorescence émise a ensuite été mesurée par cytométrie en flux avec le laser à 488 nm et le filtre FL1 pour le marquage à la DHR et FL2 pour le marquage au DHE.

En comparaison avec la production de ROS après stimulation par le LPS, on observe bien une inhibition de cette production pour les macrophages infectés par *L. donovani*. Après

traitement par le Galf-oct et NH2-Galf, il y a récupération de la capacité de production des ROS, la production d'H₂O₂ est augmentée par les 2 dérivés du Galf testés au-delà de la production d'H₂O₂ après stimulation par le LPS. Après traitement par NH2-Galf, la production d'O₂^{•-} est supérieure à celle obtenue après stimulation par le LPS, ceci peut être en rapport avec la cytotoxicité de NH2-Galf qui a été observé en MET.

(Figure 7 de l'article 3)

2.2.3.3.2 Evaluation de la production de NO par les macrophages infectés puis traités par les dérivés du Galf

Le NO est produit suite à l'induction d'iNOS, l'évaluation de l'expression d'iNOS a donc été évaluée pour des macrophages humains issus de PBMC, infectés par *L. donovani* puis traités par le Galf-oct ou par NH2-Galf pendant 48h, selon la méthode décrite dans la partie 3.2.3. Brièvement, après extraction des ARN totaux, la quantité de transcrits d'iNOS a été comparée à la quantité de transcrit d'un gène de ménage (18S) permettant d'évaluer l'induction ou la répression de ce gène.

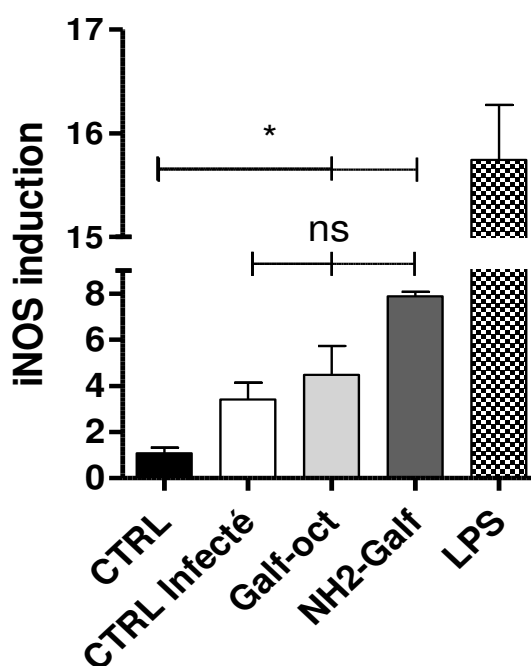


Figure 30 : Induction d'iNOS par des macrophages infectés puis traités par Galf-oct et NH2-Galf.
Graphique représentant une expérience réalisée en triplicat à partir de macrophages d'un donneur.

L'expression d'iNOS est significativement augmentée dans les macrophages infectés puis traités par les 2 dérivés du Galf comparés aux macrophages contrôles non infectés. Mais en comparaison avec les macrophages infectés la tendance à l'induction n'est pas significative sur cette expérience. Cette analyse a été complétée avec un plus grand nombre de donneurs et sur des macrophages prépolarisés (voir Partie 3).

Le principe du dosage NO est basé sur la réaction de Griess. Il s'agit d'une réaction de diazotation en deux étapes : les nitrites forment un sel de diazonium avec l'acide sulfanilique qui est ensuite couplé avec une amine (N-naphtyléthylène diamine) pour donner un colorant azoïque qui absorbe à 540 nm.

La production de NO a été évaluée dans les surnageants de cultures des macrophages non infectés, ou infectés par *L. donovani*, puis traités par le Galf-oct ou le NH₂-Galf à 80 µM pendant 48h. Des contrôles non traités ont également été réalisés. Après centrifugation, 150µl de surnageant ont été mis en contact avec un volume équivalent de solution de Griess (mélange extemporané d'une solution de sulfanilamide à 5.44% dans de l'acide chlorhydrique (HCl) et d'une solution d'α-naphtyléthylène diamine à 0.128% dans l'HCl) pendant 10 min à température ambiante. Une gamme de NaNO₂ de 0.78µM à 50µM est également réalisée et testée selon le même protocole.

L'absorbance est lue à 540 nm à l'aide du SPECTROstar^{nano} BMG LABTECH et les concentrations en NO sont calculées à l'aide du logiciel MARS data analysis.

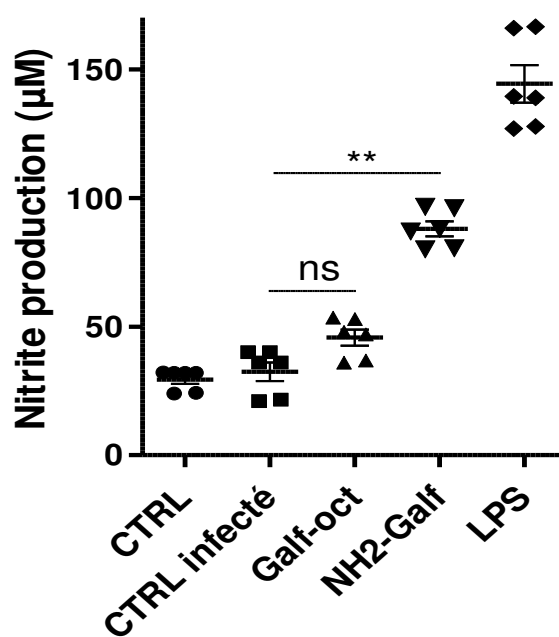


Figure 31 : NO produits par des macrophages infectés puis traités par Galf-oct et NH₂-Galf
Graphique représentant les résultats de 2 expériences réalisées en triplicat.

Les macrophages infectés puis traités par le NH₂-Galf produisent significativement ($p = 0.0022$) plus de NO que les macrophages infectés non traités. Une tendance à la production de NO est également observée après traitement par le Galf-oct mais non significative ($p = 0.0542$).

Le traitement par ces 2 dérivés du Galf semble donc en faveur de la mise en place d'une réponse immune efficace contre les leishmanies.

2.2.4 Localisation intracellulaire du Galf grâce à des dérivés furanosidiques fluorescents

Devant l'action visiblement immunomodulatrice des dérivés du Galf, nous nous sommes demandés si les molécules agissaient uniquement à la membrane des macrophages ou si elles étaient capables de pénétrer dans les cellules pour y exercer une action antiparasitaire. L'utilisation de traceurs fluorescents couplés au Galf-oct nous a semblé une approche intéressante pour répondre à cette question et aider à caractériser son mode d'action sur les amastigotes. Nous avons utilisé deux constructions de Galf-oct : couplé à la rhodamine ou à la fluorescéine.

Des macrophages humains issus de PBMC cultivés sur lames ont été infectés par *L. donovani* (DOI 1/10) puis traités pendant 6h ou 18h par le Galf-oct couplé à la Rhodamine 6G ou à la fluorescéine ou par la Rhodamine seule. Après marquage nucléaire les lames ont été observées au microscope à épifluorescence. En parallèle, des macrophages infectés et traités dans les mêmes conditions ont été colorés au MGG pour évaluation de l'activité antiparasitaire par comptage microscopique.

L'observation en épifluorescence a montré une fluorescence cytoplasmique, prouvant que les analogues marqués peuvent entrer dans les cellules et sont distribués de façon uniforme dans le cytoplasme de tous les macrophages, sans co-marquage au niveau nucléaire et sans renforcement du marquage autour des amastigotes. La diminution de l'infectivité et de la multiplication intracellulaire des amastigotes, connue pour le Galf-oct, a bien été retrouvée pour cet analogue couplé à la rhodamine ($p < 0.05$), mais pas pour celui marqué à la fluorescéine. Etonnement, cet effet était plus important pour le composé marqué à la rhodamine comparé au Galf-oct seul ($p < 0.05$). Parallèlement, une tendance antiparasitaire ($p = 0.11$) était visible avec la rhodamine seule pouvant expliquer cet effet synergique.

Au total, ces 2 analogues couplés diffusent de façon identique dans le cytoplasme des cellules infectées malgré leurs propriétés physicochimiques très éloignées, mais seul le marquage à la rhodamine permet de conserver une efficacité antiparasitaire. Au vu de cette bonne diffusion et de leur différence d'efficacité antiparasitaire, leur utilisation pourra aider à la compréhension du mécanisme d'action du Galf-oct, et surtout à l'étude de sa diffusion *in vivo* dans des études ultérieures sur modèle murin.

Article 4: Synthesis and biological properties of galactofuranosyl-containing fluorescent dyes

Laurent Legentil, Sorya Belaz, Jean-Pierre Gangneux, Florence Robert-Gangneux et Vincent Ferrières

Ces résultats ont fait l'objet de la courte publication suivante parue en janvier 2017 dans Bioorganic and medicinal Chemistry Letters.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

Synthesis and biological properties of galactofuranosyl-containing fluorescent dyes



Laurent Legentil^a, Sorya Belaz^{b,c}, Jean-Pierre Gangneux^{b,c}, Florence Robert-Gangneux^{b,c,1}, Vincent Ferrières^{a,*}

^a Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, CNRS, UMR 6226, 11 Allée de Beaulieu, CS 50837, 35078 Rennes Cedex 7, France

^b INSERM U1085-IRSET (Institut de Recherche en Santé Environnement et Travail), Université Rennes 1, Rennes, France

^c Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Service de Parasitologie-Mycologie, Rennes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2016

Revised 29 November 2016

Accepted 30 November 2016

Available online 1 December 2016

Keywords:

Carbohydrates

Galactofuranosides

Fluorescence

Leishmania

Macrophages

ABSTRACT

Two fluorescent galactofuranosides were synthesized and their biological activities evaluated on non-infected and *Leishmania* infected macrophages. Both tagged scaffolds were able to penetrate macrophages. Compared to the activity of the parent octyl galactofuranoside used as a reference, the fluorescein-conjugate showed altered biological properties while the rhodamine 6G one synergistically acted with the lipid chain to significantly increase antiparasitic activity.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The presence of hexoses with striking five-membered ring was highlighted only in non-mammal living kingdom. As a consequence, these natural compounds, and the related biological pathways, are targets of choice for the development of some molecular tools useful to increase basic knowledge and/or to fight some related diseases. These diseases include especially tuberculosis and leishmanial infections. The first one is caused by *Mycobacterium tuberculosis* which infects millions of people each year throughout the world.¹ On the other hand, the leishmaniasis disease is mainly endemic in Eastern Africa, Brazil, India, Middle East and Mediterranean countries. Signs of infection by *Leishmania* species can vary and range from skin disorders to deadly visceral forms.² In both cases, WHO calls on governments, scientists, civil society and private companies to unite to stop the constant growth of these diseases.

Several teams have shown that furanosyl-containing conjugates may impact both *M. tuberculosis* and *L. donovani* lifecycle.³ For instance, it was established that non-natural nucleotide-furanoses can be recognized and transferred by galactofuranosyl transferases on growing galactan.^{4,5} Such nucleotides act at an early stage of this biological process and they significantly disturb the biosynthesis of this key galactan. Several UDP-analogues were also produced

in order to inhibit this transferase and also the key UDP-galactopyranose mutase.^{6–12} Considering recent knowledges related to the glycoconjugates part of *Mycobacteria* and *Leishmania* cell walls, some studies have focused on the biological impact of furanosyl-containing glycolipids.^{2,13–19} Until now, the best results were obtained using a bicatenar thiofuranoside as a potent biocide agent against *M. tuberculosis*.¹⁵ Nevertheless, the corresponding mode of action was not elucidated.

Octyl galactofuranoside (GalfOct) is a very simple glycolipid, whose structure however differs from the one of standard alkyl glycosides by the presence of the carbohydrate polar head in a furanose form. Leveraging its amphiphilic properties²⁰ has recently led us to investigate the impact of this compound on microorganisms that are able to biosynthesize and to metabolize furanosyl-containing conjugates.²¹ A more detailed study was performed on *Leishmania donovani* using a small library of GalfOct derivatives.¹⁸ The furanose form clearly contributes to a significant decrease of membrane fluidity leading to profound alterations in the leishmanial promastigote membrane and organelles. It was also shown that GalfOct was able to decrease intramacrophagic amastigote multiplication. This result led us to propose herein furanosyl-containing fluorescent dyes to characterize the intracellular distribution of GalfOct and to help understanding of the mechanism of interaction of furanosides with the intracellular parasites.

* Corresponding author.

E-mail address: vincent.ferrieres@ensc-rennes.fr (V. Ferrières).

¹ Both authors have equally contributed as last co-authors for this study.

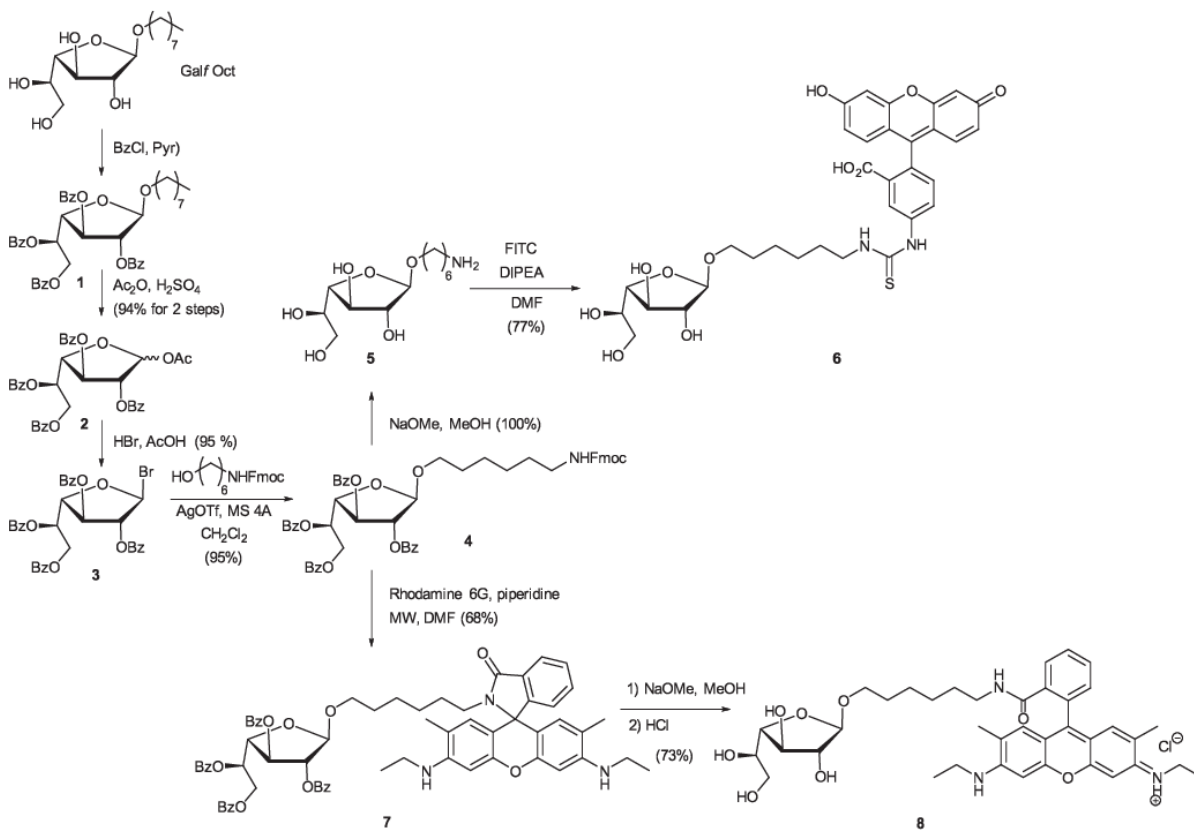
Considering the respective size of the furanolipid and the most common fluorescent dyes, significant alterations of physicochemical and biological properties cannot be ruled out. Nevertheless, we were encouraged by recent studies in which a lipid chain was partly substituted by a fluorescent tag.^{22–24} Therefore, we focused our attention on the conjugation of our furanoside with xanthen derivatives like (i) fluorescein, known for its low cellular permeability in assays involving living cells, or (ii) the red-shifted fluorescent rhodamine 6G because its positive charge strengthens interactions with negatively charged membranes.²⁵ Interestingly, these two related structures show a maximum of fluorescence in different pH range and would thus allow to monitor the trafficking of Gal/Oct in presence of infected macrophages, whatever the nature of the microenvironment. Moreover, the latter probe overcomes *in vivo* auto-fluorescent issues and ensures good diffusion through organic tissues (Scheme 1).

The synthesis of the targeted fluorophores was based on a common intermediate **4** bearing a masked terminal amino function on the lipid part. Its synthesis started from Gal/Oct that was obtained in one step according to a modified Fischer glycosylation of octanol.²⁰ Subsequent benzylation, acetylation and bromination under standard conditions afforded the furanosyl donor **3** in a good 85% overall yield. The desired building block **4** was then obtained with 95% yield by glycosylation of the commercially available *N*-Fmoc-protected 6-amino-1-hexanol using silver(I) triflate as the promoter. Further full removal of basic-sensitive esters and carbamate groups was efficiently performed under Zemplén conditions. Finally selective thiocarbonylation in a dimethylformamide (DMF) solution in the presence of diisopropylethylamine (DIPEA)

using fluorescein isothiocyanate (FITC) afforded the desired fluorescein conjugate **6** in 77% yield. Its structure was corroborated by 1D and 2D NMR spectroscopy: signal at δ 4.86 ppm correlated with a $^3J_{H1,H2}$ 1.9 Hz coupling constant, and signal at δ 109.4 ppm for C-1 highlighted the five-membered ring and the desired 1,2-*trans* β -configuration. Maximum excitation and emission wavelengths were measured in phosphate buffered saline (PBS) solution (pH 7) at 468 nm and 520 nm, respectively.

The rhodamine conjugate was prepared slightly differently, following a procedure described by Adamczyk and Grote.²⁶ Transacylation of the starting ethyl ester rhodamine 6G in DMF was thus performed in the presence of piperidine. This base allowed selective deprotection of the terminal amino function that could subsequently add to the carbonyl atom ethyl ester of rhodamine 6G to give, after elimination of ethanol, the desired benzoylated derivative **7**. The reaction was performed under microwave activation (100 W) at 90 °C and allowed to access the target conjugate **7** in only 30 min in 68% yield. The presence of a ^{13}C NMR signal at δ 65 ppm characteristic of the sp^3 -hybridized carbon attach to a nitrogen indicated the major formation of the closed spirolactam form. Final debenzoylation was carried out as described above. The resulting water soluble rhodamine 2'-amide **8** was obtained as the open cationic specie following acidification with hydrochloric acid. This was corroborated by the disappearance of the ^{13}C NMR signal at δ 65 ppm. The measurement of fluorescent properties afforded $\lambda_{\text{ex}} = 528$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 552$ nm in PBS.

The synthetic furanosyl-containing fluorescent probes were then investigated using macrophages infected by leishmanial parasites. Two effects were monitored: the trafficking of Gal/Oct



Scheme 1. Synthesis of the galactofuranosyl-containing fluorophores **6** and **8**.

labeled with fluorescein or rhodamine, and the possible alteration of the biological properties following the labelling. On one hand, *L. donovani* promastigotes grown at stationary phase (>5 days of culture) were used to infect human macrophages overnight (doi 10:1). After 3 washes, infected macrophages were treated for 6 or 18 h with 80 μM of conjugate **6** or **8**, or with 80 μM of fluorescein, rhodamine 6G or of Gal/Oct used as controls (Fig. 1A–D). After three washes and fixation with 4% formalin, nuclei were labeled with Hoechst 33342 at 0.001 μM for 30 min. Then pictures of each condition were taken using epifluorescence microscopy (Nie, Nikon®) with a 50 \times oil immersion lens. All conditions were done in triplicate and repeated three times. Conjugate **8** was also tested once (in triplicate) using confocal microscopy on uninfected cells (Fig. 1E).

On another hand, amastigotes growth inhibition rate was calculated on the infected cells incubated for 48 h with 80 μM of either compounds **6** or **8**, fluorescein, rhodamine 6G or Gal/Oct as treated control or medium alone as untreated control. Then slides were washed three times and colored with May Grünwald Giemsa stain. The enumeration of infected cells and intraparasitic multiplication was determined via microscopic examination using a 100 \times oil immersion lens. A minimum of 200 macrophages were counted on each well for every condition. Amastigotes multiplication rate was computed taken into account infected cells harboring two or more amastigotes in their cytoplasm. All conditions were done in quadruplicate and repeated twice. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test and GraphPad Prism 5® software. Results were considered significant for $p < 0.05$.

On one hand, no trace of fluorescein was found either in the membrane or inside the macrophage (Fig. 1D). On the other hand, compounds **6**, **8** and rhodamine 6G were shown to enter in all macrophages after 6 h incubation (Fig. 1A–C) and to stay in cytoplasm for at least 18 h (data not shown). Intracytoplasmic distribution was uniform throughout the cytoplasm and no co-labelling with Hoechst was observed in nuclei (Fig. 1). No accumulation dyes was observed around amastigote nuclei as well. Regarding antiparasitic effect, compound **6** and fluorescein alone presented no significant effect, whereas compound **8** significantly reduced

macrophage infection ($p < 0.05$) and amastigote multiplication ($p < 0.05$) after 48 h treatment, even without accumulation around amastigote nuclei (Fig. 2). Surprisingly, there was a significantly higher efficacy of the compound **8** compared to Gal/Oct ($p < 0.05$) (Fig. 2). In addition, we observed phenotypic surface alterations on MGG-stained slides after treatment with rhodamine 6G alone (data not shown).

Thus the effect of Gal/Oct-rhodamine 6G **8** could be favored by a cytotoxic effect on macrophages of rhodamine 6G itself even if there was no significant effect of rhodamine 6G on macrophagic infection (Fig. 2). In addition modification of the global charge or the hydrophilic properties induced by the presence of covalently linked rhodamine 6G could explain the better antiparasitic effect of compound **8** compared to Gal/Oct. These properties were described elsewhere as responsible for the cytotoxicity of rhodamine 6G compared to other rhodamine on other cell lines.^{27,28} It could have also participated to the stiffening of the membrane induced first by the alkyl furanoside.¹⁸ Taken together, these observations suggest a synergistic effect of rhodamine 6G and Gal/Oct. Remarkably, and despite the same site of anchorage, the fluorescein ring inhibited the antiparasitic effect of Gal/Oct. The lack of effect of compound **6** was not due to an inhibition of intracellular diffusion of compound **6**, as fluorescence was observed inside cells (Fig. 1), but most likely to a modification of Gal/Oct properties due to its linkage to fluorescein. As fluorescein itself has low cellular permeability, its detection inside cells suggests that the labeled compound gained entry through the Gal/Oct moiety.

In conclusion, this paper reports for the first time the synthesis of two fluorescent labeled galactofuranosyl-containing conjugates, one green fluorescein-based probe and one red rhodamine 6G derivative. In addition to the determination of their physicochemical properties, we also evaluated their impact in an *in vitro* model. This study highlighted the difficulty to foresee the impact of a grafted tag onto a very small molecule on the resulting biological properties. Herein, the Galf derivative bearing a fluorescein dye showed low toxicity on macrophages while the presence of rhodamine 6G at the end of the lipid chain of Gal/Oct significantly improved antileishmanial activity.

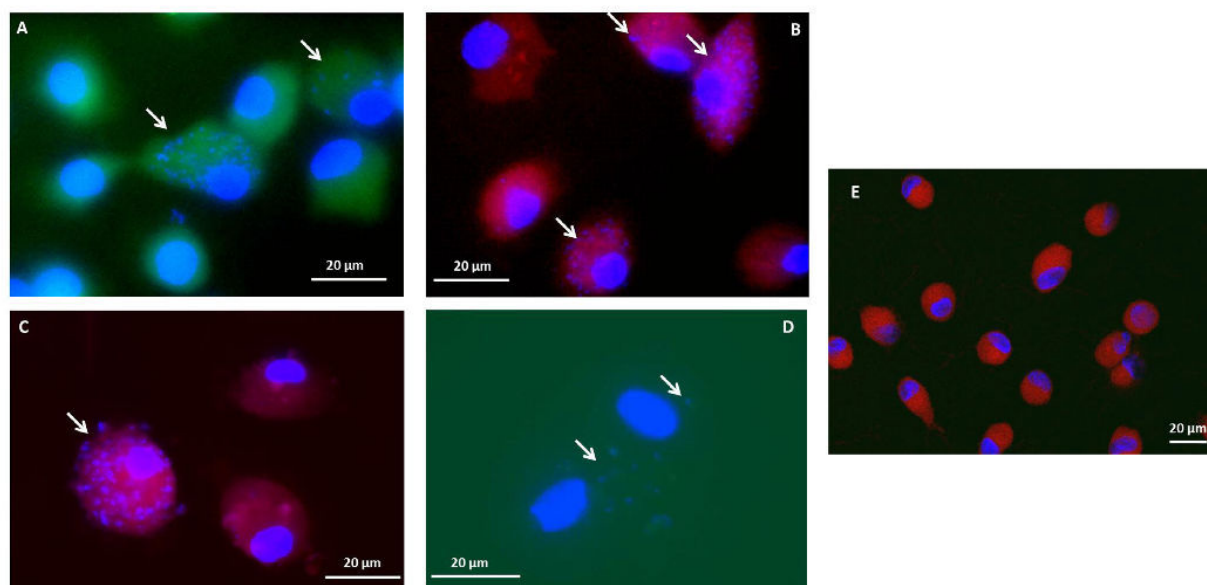


Fig. 1. Cell imaging after labelling with fluorescent compounds. Epifluorescence pictures (A, B, C and D) of *Leishmania* infected macrophages (arrow) treated for 6 h with compound **6** (A), compound **8** (B), rhodamine 6G (C) or fluorescein (D) (50 \times oil immersion lens). Confocal picture (E) of uninfected macrophages treated with compound **8** for 6 h (20 \times lens).

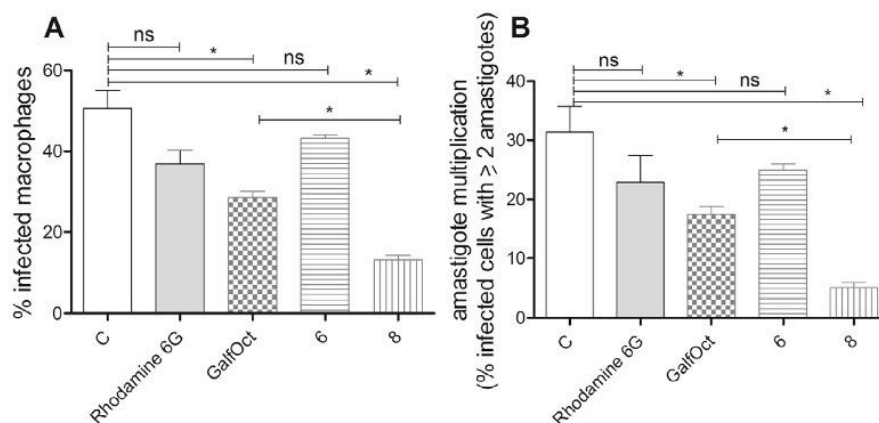


Fig. 2. Effect of labeled or native Gal/Oct on cell invasion and *Leishmania* parasite growth. Rate of infected macrophages (A) or intracytoplasmic amastigote multiplication (B) after 48 h treatment with compound **6** or **8**, compared to untreated macrophages (C) or macrophages treated with the reference furanose (Gal/Oct) or with rhodamine 6G. All compounds were used at a concentration of 80 μ M.

Further investigations on the action mechanism and in particular the impact on the membrane of the parasite are under way. Therefore, one should be careful when drawing conclusions on cellular interactions using labeled compounds, or before their use in *in vivo* models.

Acknowledgments

The authors are grateful to the GlycoOuest network, supported by the Région Bretagne and the Région Pays de la Loire.

A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.11.090>.

References

- Lowary TL. *Acc Chem Res.* 2016;49:1379.
- Cabezas Y, Legentil L, Robert-Gangneux F, et al. *Org Biomol Chem.* 2015;13:8393.
- Dureau R, Robert-Gangneux F, Gangneux J-P, et al. *Carbohydr Res.* 2010;345:1299.
- Poulin MB, Lowary TL. *J Org Chem.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.6b01501>.
- Peltier P, Beláňová M, Dianišková P, et al. *Chem Biol.* 2010;17:1356.
- Caravano A, Mengin-Lecreulx D, Brondello J-M, Vincent SP, Sinay P. *Chem Eur J.* 2003;9:5888.
- Caravano A, Vincent SP, Sinay P. *Chem Commun.* 2004;1216.
- Veerapen N, Yuan Y, Sanders DAR, Pinto BM. *Carbohydr Res.* 2004;339:2205.
- Chavami A, Chen JJ-w, Pinto BM. *Carbohydr Res.* 2004;339:401.
- Ansliaux C, N'Go I, Vincent SP. *Chem Eur J.* 2012;18:14860.
- Poulin MB, Zhou R, Lowary TL. *Org Biomol Chem.* 2012;10:4074.
- Borrelli S, Zandberg WF, Mohan S, et al. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36:364.
- Owen DJ, Davis CB, Hartnell RD, et al. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007;17:2274.
- Pathak AK, Pathak V, Seitz L, et al. *Bioorg Med Chem.* 2001;9:3129.
- Davis CB, Hartnell RD, Madge PD, et al. *Carbohydr Res.* 2007;342:1773.
- Wilkinson BL, Long H, Sim E, Fairbanks AJ. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18:6265.
- Singh BK, Yadav AK, Kumar B, et al. *Carbohydr Res.* 2008;343:1153.
- Suleman M, Gangneux J-P, Legentil L, et al. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:2156.
- Dureau R, Gicquel M, Artur I, et al. *Org Biomol Chem.* 2015;13:4940.
- Goodby JW, Haley JA, MacKenzie G, Watson MAJ, Plusquellec D, Ferrières V. *J Mater Chem.* 1995;5:2209.
- Chlubnova I, Legentil L, Dureau R, et al. *Carbohydr Res.* 2012;356:44.
- Vo-Hoang Y, Micouin L, Ronet C, Gachelin G, Bonin M. *ChemBioChem.* 2003;4:27.
- Tanaka H, Yoshimura Y, Dovichi NJ, Palcic MM, Hindsgaul O. *Tetrahedron Lett.* 2012;53:1812.
- Manzo E, D'Ippolito G, Pagano D, Tinto F, Fontana A. *Tetrahedron Lett.* 2014;55:3521.
- Mottram LF, Forbes S, Ackley BD, Peterson BR. *Beilstein J Org Chem.* 2012;8:2156.
- Miljanić S, Cimerman Z, Frkanec L, Žinić M. *Anal Chim Acta.* 2002;468:13.
- Lampidis TJ, Castello C, Del Giglio A, et al. *Biochem Pharmacol.* 1989;38:4267.
- Magut PKS, Das S, Fernand VE, et al. *J Am Chem Soc.* 2013;135:15873.

Partie 3 : Les sucres de synthèse comme immunomodulateurs

Les macrophages sont des cellules clés dans la leishmaniose, à la fois parce qu'ils sont les chefs d'orchestre de la réponse immunitaire, mais aussi parce qu'ils sont les cellules cibles des parasites, qui les manipulent. On voit bien qu'en les stimulant, on peut espérer réorienter leur réponse immunitaire pour la rendre plus efficace. L'action du Gal α -oct et du NH $_2$ -Gal α sur le burst oxydatif nous a conduits à investiguer l'action de ces glucides sur la production de cytokines et chimiokines par les macrophages, et, plus précisément de leur effet sur la polarisation des macrophages.

3.1. Les macrophages

Les macrophages proviennent d'une différenciation des monocytes circulants au moment du passage de ces monocytes du sang vers les tissus. Morphologiquement ils sont de plus grande taille que les monocytes et possèdent une grande variété de vacuoles (lysosomes, endosomes, phagosomes...). Leurs capacités de phagocytose et de cellules présentatrice d'antigène, et la diversité de leurs récepteurs de surface, en font des acteurs précoces de la réponse contre les pathogènes.

3.1.1 Description et fonctions des macrophages

3.1.1.1 La phagocytose

Dans les tissus, le macrophage est un acteur clé de la réponse immunitaire innée, en particulier par ses facultés de phagocytose qui furent les premières décrites dès la fin du XIX^{ème} siècle par Metchnikoff (244). La phagocytose concerne les éléments pathogènes mais aussi les cellules sénescentes ou les débris cellulaires. Pour les pathogènes, la phagocytose passe par la reconnaissance des pathogènes grâce à de nombreux récepteurs appelés pattern-recognition receptors (PRR). Ces PRR reconnaissent des motifs conservés chez les microorganismes (mais absents des cellules mammifères) nommés pathogen associated molecular patterns (PAMPs). Ces PAMPs peuvent être des motifs osidiques (glucanes, mannanes) rencontrés dans la paroi des champignons ou le LPS de la paroi des bacilles gram négatifs. Les PRR peuvent être des TLR, des récepteurs lectine de type C ou des récepteurs « scavenger ».

3.1.1.2 Les récepteurs des macrophages

3.1.1.2.1 Les TLR

Le TLR2 reconnaît des lipopeptides, des glycoprotéines et des lipomannanes, dont le LPG de certaines espèces de leishmanies (113,213). Le TLR3 reconnaît les ARN double brin ; le TLR4 en s'associant avec CD14 reconnaît le LPS ; les TLR7 et TLR8 reconnaissent les ARN

viraux simple brin. La voie de signalisation des TLRs (excepté pour TLR-3) passe par le recrutement de molécules de signalisation intracellulaire comme MyD88 (Myeloid differentiation factor 88) ou IRAK (IL-1 Receptor Associated Kinase) qui vont activer NF- κ B (Nuclear factor κ B) et les MAPK (Mitogen-Activated protein kinases). Selon les molécules adaptatrices associées à NF- κ B cette activation via les TLR peut aboutir à la production de TNF- α ou d'interféron de type 1 (180).

3.1.1.2.2 Les récepteurs lectine de type C

Les récepteurs lectine de type C possèdent un ou plusieurs domaine(s) lectine de type C (CTL).

Geijtenbeek *et al.* ont établi la revue des fonctions des récepteurs lectine de type C. DC-SIGN est impliqué dans la reconnaissance des motifs mannose et fucose, induit la production d'IL-10 par une voie d'activation via les TLR et provoque une inhibition de la différenciation en lymphocytes Th1. Dectin-1 reconnaît le motif β 1-3 glucane, très présent dans la paroi des champignons, et induit la différenciation des lymphocytes dans les voies Th1 et Th17, avec une production d'IL-1 β , d'IL-12, de TNF- α , du leucotriène LTB4 et d'IL-6. Et enfin, MRC-1 reconnaît les motifs mannose, fucose et glucosamine et favorise, suite à cette reconnaissance, la phagocytose des microorganismes, l'activation de NF- κ B et la présentation des antigènes (245).

Vázquez-Mendoza *et al* se sont intéressés à l'importance de ces récepteurs lectine dans les infections parasitaires, et ont montré une variabilité inter-espèces pour le type de récepteurs lectine reconnaissant les leishmanies. DC-SIGN reconnaît les amastigotes et les promastigotes de *L. infantum* alors que c'est MRC-1 qui reconnaît les promastigotes métacyclique de *L. major* (120). Comme pour la reconnaissance par le TLR2, MRC-1 pourrait reconnaître les chaînes latérales du LPG pour les promastigotes de *L. major*, alors que ces chaînes latérales sont absentes chez *L. infantum*. Le même motif mannose α 1-2 mannose présent au niveau de la coiffe des LPG des 2 espèces et au niveau d'un des GIPLs de *L. infantum* pourrait donc être celui reconnu par MRC-1.

3.1.1.2.3 Les récepteurs « scavenger »

Les récepteurs « scavenger » ou éboueurs sont très impliqués dans le rôle de phagocytose des macrophages par reconnaissance de composés anioniques en particulier à la surface des cellules apoptotiques. C'est le cas du CD36 qui joue un rôle dans la reconnaissance des acides gras à longues chaînes (246) ou de CD163 qui permet l'élimination du complexe hémoglobine-haptoglobine (247). Ces récepteurs peuvent être détournés de leur fonctions par certains pathogènes, comme CD36 qui peut avoir un rôle délétère dans les infections à *Plasmodium falciparum*, car les protéines parasitaires présentes à la surface des hématies parasitées entraînent une adhésion de celles-ci aux monocytes ou macrophages exprimant CD36, et empêche alors la destruction de ces hématies par la rate (248).

3.1.1.3 Le « burst oxydatif »

La phagocytose par les macrophages est un phénomène couplé au « burst oxydatif » par les intermédiaires réactifs de l'oxygène et de l'azote permettant la destruction des débris ou pathogènes phagocytés en particulier grâce à la peroxydation lipidique ou à l'oxydation des protéines et des acides nucléiques. La NADPH-oxydase s'assemble à la membrane

plasmique ou celle du phagosome lors de l'activation du macrophage. Ce complexe enzymatique va oxyder l'oxygène moléculaire pour produire des anions superoxydes, $O_2^{\bullet-}$ qui vont faire générer de l' H_2O_2 par une SOD (qui sera ensuite peroxydé en radicaux hydroxyles ($\bullet OH$) par une peroxydase, ces 3 ROS constituent le « burst oxydatif » (249). De la même façon que les ROS, l'azote possède des espèces réactives comme le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}), précurseur du peroxyde d'azote $ONOO^-$. Dans les macrophages, la NO synthase est induite par un signal cytokinique, il s'agit de iNOS ou NOS2 ; dans d'autres types cellulaires les NOS peuvent être exprimées constitutivement et activées par des signaux calciques (NOS1 ou NOS3) (250).

3.1.1.4 Réponse immunitaire adaptative et homéostasie

En plus de ce rôle « d'éboueur » par la phagocytose, le macrophage est une cellule présentatrice d'antigène aux lymphocytes par l'intermédiaire des récepteurs du CMH de type I et II, initiant ainsi la réponse immunitaire adaptative. Par la suite le macrophage a également la capacité d'intervenir dans l'arrêt de l'inflammation par une modification des cytokines et chimiokines produites : c'est le phénomène de tolérance qui survient en cas de stimulation des TLR par le même ligand : la première activation entraîne une production de $TNF-\alpha$, la suivante inhibe cette production (251).

Les macrophages participent également à l'homéostasie tissulaire par la phagocytose des débris cellulaires et des cellules sénescents qu'ils éliminent (252). Ces fonctions très variées parfois même contraires sont rendues possibles par leur grande plasticité. En effet, en fonction de l'environnement cytokinique, le macrophage va être capable de plusieurs profils de réponse appelés polarisations, qui ont été initialement décrits en suivant les voies Th1 et Th2 déjà décrite pour les lymphocytes T (253).

3.1.2 La polarisation des macrophages

L'activation « classique » dans un environnement cytokinique Th1 a été décrite en premier alors que l'activation Th2 a été décrite plus récemment et est appelée activation alternative par opposition à l'activation « classique ». Mais *in vivo* l'environnement cytokinique est souvent moins strictement Th1 ou Th2 qu'*in vitro*, et les macrophages vont plutôt se situer sur un spectre de polarisation (Figure 32) et pouvoir associer des marqueurs étiquetés M1 avec des marqueurs M2 (252,254).

3.1.2.1 Les macrophages M1

L'activation « classique » par les cytokines Th1 comme l' $IFN-\gamma$ ou le $TNF-\alpha$ ou par l'activation via les TLR (en présence d'un antigène bactérien comme le LPS par exemple) entraîne une polarisation M1 des macrophages qui vont alors produire des cytokines impliquées dans la réponse Th1 comme l'IL-6, le $TNF-\alpha$, l'IL-1 β ou l'IL-12 et qui vont exprimer des récepteurs CMH II, TLR-2 et TLR-4, CD64, et des chimiokines Th1 comme CXCL9-10-11 ou MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1). Ces macrophages vont également réprimer des cytokines Th2 comme l'IL-10, on parle de macrophages IL-12^{high}/IL-10^{low} (252–255). Ces macrophages sont pro-inflammatoires, ils entretiennent l'inflammation et agissent par activation d'iNOS et production de ROS (153). Ce type de réponse est nécessaire à la réponse contre les infections à pathogènes intracellulaires

comme la leishmaniose, mais conduit à des dommages tissulaires si elle n'est pas maîtrisée (153,256) (Figure 32 partie rouge).

3.1.2.2 Les macrophages M2

L'activation « alternative » par un environnement Th2 entraîne une polarisation M2 des macrophages qui vont alors plutôt jouer un rôle « d'extincteur » pour juguler l'inflammation. Cette polarisation est très importante pour éviter un emballement de la réponse inflammatoire. Au sein de cette polarisation plusieurs types de macrophages ont été décrits. En présence d'IL-4 ou d'IL-13, les macrophages vont se polariser en M2a, alliant un rôle de réparation tissulaire par production de TGF- β et d'orientation de la réponse immune vers la réponse Th2 via production de d'IL-10, de CCL17, expression de MRC-1, Dectine-1, CD14 et répression de l'IL-12 (IL-10^{high}/IL-12^{low}). Les PRR des macrophages M2a sont MRC-1, dectin-1 et CD163. En présence d'IL-10, de glucocorticoïdes ou de TGF- β , les macrophages M2c obtenus seront impliqués dans la réparation tissulaire en produisant de l'IL-10 et du TGF- β . Enfin les macrophages M2b, obtenus en présence d'immuns complexes ou d'IL-1 β , vont avoir un rôle plus pro-inflammatoire que les autres macrophages M2, en produisant des cytokines Th1 comme l'IL-6, en plus de cytokines Th2 comme l'IL-10, mais en gardant une répression de l'IL-12 (IL-12^{low}) commune aux macrophages M2a (252–255) (Figure 32 parties jaune, verte et bleue).

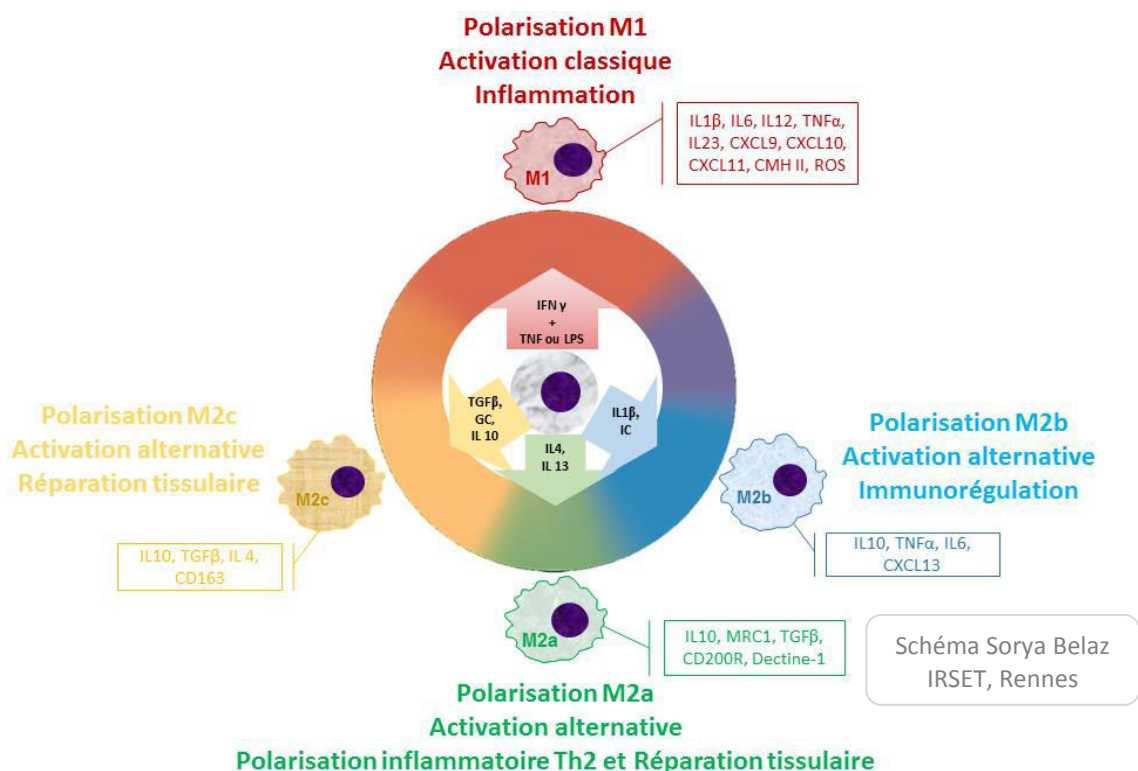


Figure 32 : Spectre d'activation macrophagique et des caractéristiques des macrophages polarisés
 ROS : espèces réactives de l'oxygène; MRC-1 : Mannose récepteur; TGF : transforming growth factor

3.1.3 Macrophages et leishmanies

Comme on l'a vu, les leishmanies détournent les fonctions microbicides des macrophages et de présentation antigénique afin de survivre dans les vacuoles parasitophores (257,258). L'infection par *L. donovani* diminue l'expression de cytokines Th1, telles que IL-12, IFN- γ .

De ce fait, le parasite biaise la réponse macrophagique en les orientant en phénotype M2. L'augmentation de la production de ROS et NO, observée après traitement des macrophages avec le Gal α -oct, nous a conduits à étudier l'effet des Gal α sur la polarisation des macrophages. En effet, une réversion de la polarisation M2 induite par les leishmanies pourrait contribuer à un meilleur contrôle de l'infection, en particulier chez l'immunodéprimé, et la découverte d'immunomodulateurs pourrait permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La dernière partie de ce travail a donc consisté en l'étude de la polarisation des macrophages à l'aide de plusieurs outils : approche transcriptomique à haut débit, étude d'expression de gènes ciblés, étude du phénotype des macrophages par cytométrie en flux.

3.2. Matériel et méthodes

3.2.1 Les modèles de macrophages utilisés

Les macrophages utilisés dans cette partie du travail sont des macrophages humains issus de PBMC, recueillis par Buffy coat à partir de poche de sang de l'EFS (Cf. 2.1.1.1 et Figure 33).

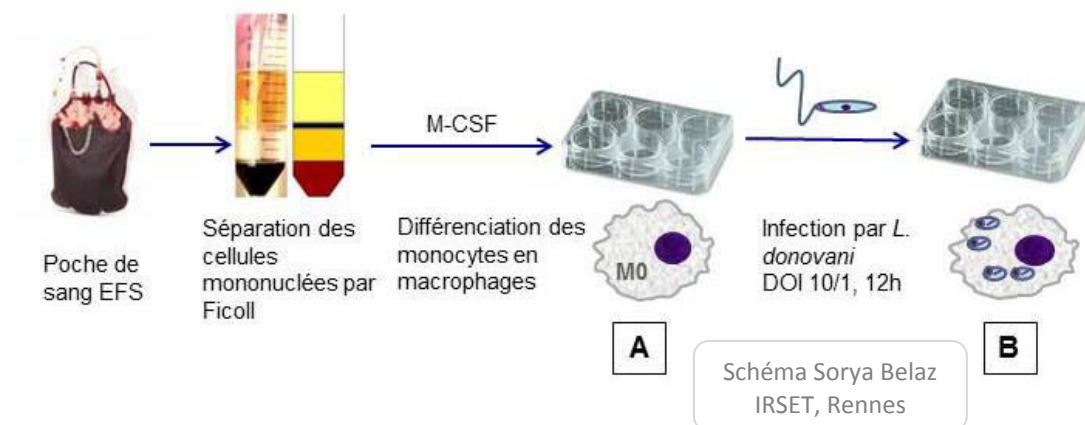


Figure 33 : Représentation schématique de la production de macrophages non polarisés M0 (A) et de macrophages non polarisés infectés (B)

Après 6 jours de différenciation, les macrophages sont lavés, on obtient ainsi des macrophages non polarisés M0 (Figure 33 A). Une polarisation M1 ou M2a a été obtenue par une journée de différenciation supplémentaire selon Jaguin *et al.* (259), c'est-à-dire 24h en milieu RPMI « complet » en présence de LPS à 100 ng/ml et d'IFN- γ (MACS® Miltenyi Biotech) à 20 ng/ml pour obtenir des macrophages M1 et 24h en milieu RPMI

« complet » en présence de M-CSF (MACS® Miltenyi Biotech) à 10 ng/ml et d'IL-4 (MACS® Miltenyi Biotech) à 20 ng/ml pour obtenir des macrophages polarisés M2a (Figure 34 A).

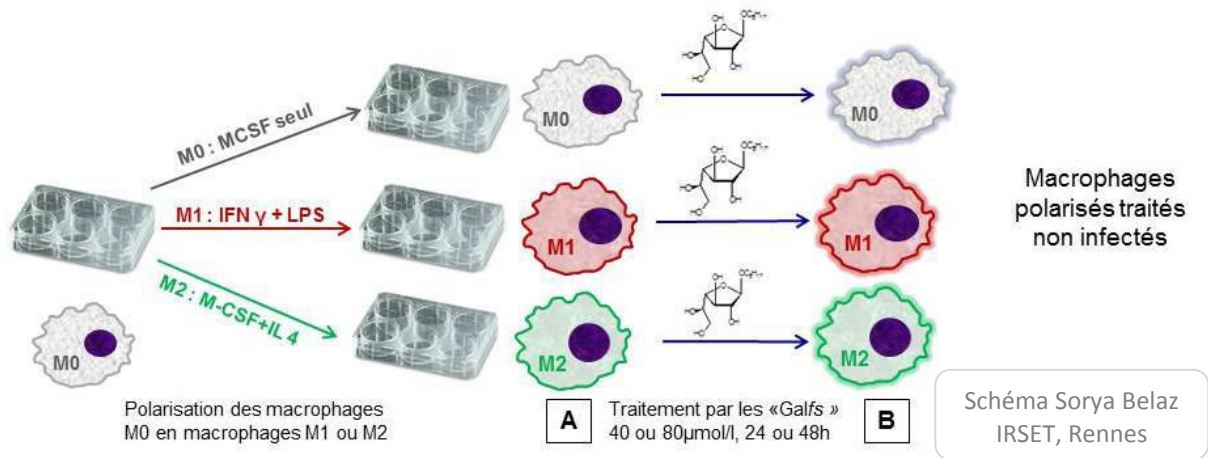


Figure 34 : Représentation schématique de la production de macrophages polarisés M1 et M2a (A) et de macrophages polarisés puis traités (B)

Ces macrophages, M0, M1 ou M2a, ont ensuite été infectés par *L. donovani* en phase stationnaire de croissance (promastigotes métacycliques) à raison de 10 parasites par macrophage, pendant une nuit en milieu RPMI « complet » à 37°C sous 5% de CO₂ (Figure 35 A).

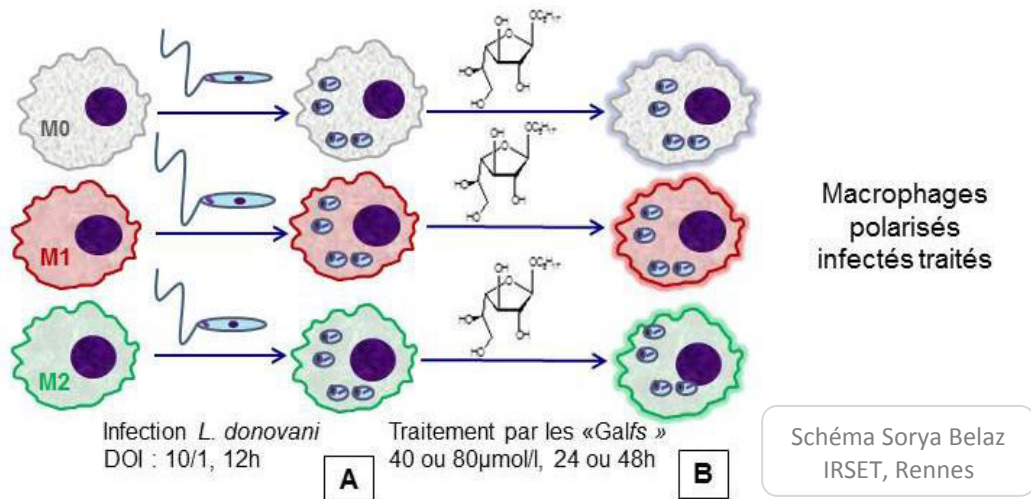


Figure 35 : Représentation schématique de la production de macrophages polarisés M1 et M2a infectés par *L. donovani* (A) et de macrophages polarisés infectés puis traités (B)

Après 3 lavages pour éliminer les promastigotes restants, ces macrophages infectés ont ensuite été traités par les dérivés du Galf, Galf-oct et NH₂-Galf pendant 24 à 48h à une concentration de 40 ou 80 μ M visant ainsi une concentration de 5 à 10 fois l'IC₅₀ déterminée sur les promastigotes (Figure 34 B Figure 35 B).

3.2.2 Analyse transcriptomique globale

Cette analyse a été réalisée sur les équipements de la plateforme Génomique Environnementale et humaine de Biogenouest.

Des macrophages M0 infectés ou non puis traités par le Gal α -1-3-Gal ou par NH $_2$ -Gal pendant 24h à une concentration de 80 μ M ont été analysés par transcriptomique globale sur puces à ARN Agilent® (SurePrint G3 MicroarrayKit 8x60K V2 Agilent® Technologies). Ces puces transcriptomiques comportent environ 26 000 ARN messagers (ARNm) sur lesquels vont s'hybrider les ARN de nos échantillons permettant de connaître le niveau d'expression des ARNm d'un grand nombre de gènes. Le principe de cette technologie est de fixer sur une lame de verre un panel d'ARNs qui vont servir de sonde pour hybrider les ARNm des échantillons à analyser (Figure 36). Après extraction des ARN totaux des échantillons à analyser, une première étape de préparation permet d'obtenir des ARN anti sens marqués avec un fluorochrome (dans notre cas la Cyanine-3, (Cy-3)). Ces ARN marqués vont s'hybrider avec les sondes fixées sur la lame de verre. Après l'hybridation les lames sont scannées, la fluorescence émise au niveau de chaque sonde est d'autant plus intense que l'ARN correspondant est fortement exprimé dans l'échantillon étudié. Ainsi on obtient une image de l'expression globale des ARN messagers dans l'échantillon étudié. L'analyse de ces données et la comparaison des échantillons entre eux permet de mettre en évidence des variations transcriptomiques entre les conditions étudiées. Une autre façon de comparer 2 échantillons est de marquer avec 2 fluorochromes différents les 2 pools d'ARN (souvent Cyanine 3 et Cyanine 5) et d'analyser le niveau d'expression des échantillons l'un par rapport à l'autre en les déposant sur la même puce et en scannant la lame pour les 2 fluorochromes. On obtient alors 2 images que l'on peut superposer pour comparer les 2 échantillons. Dans ce travail, nous avons comparé 2 conditions traitées à une condition contrôle et nous n'avons donc pas fait l'analyse de cette façon. Les puces Agilent® portent en plus des ARNm, des ARN non codants qui n'ont pas été analysés lors de ce travail, ainsi que des contrôles permettant de valider l'expérience.

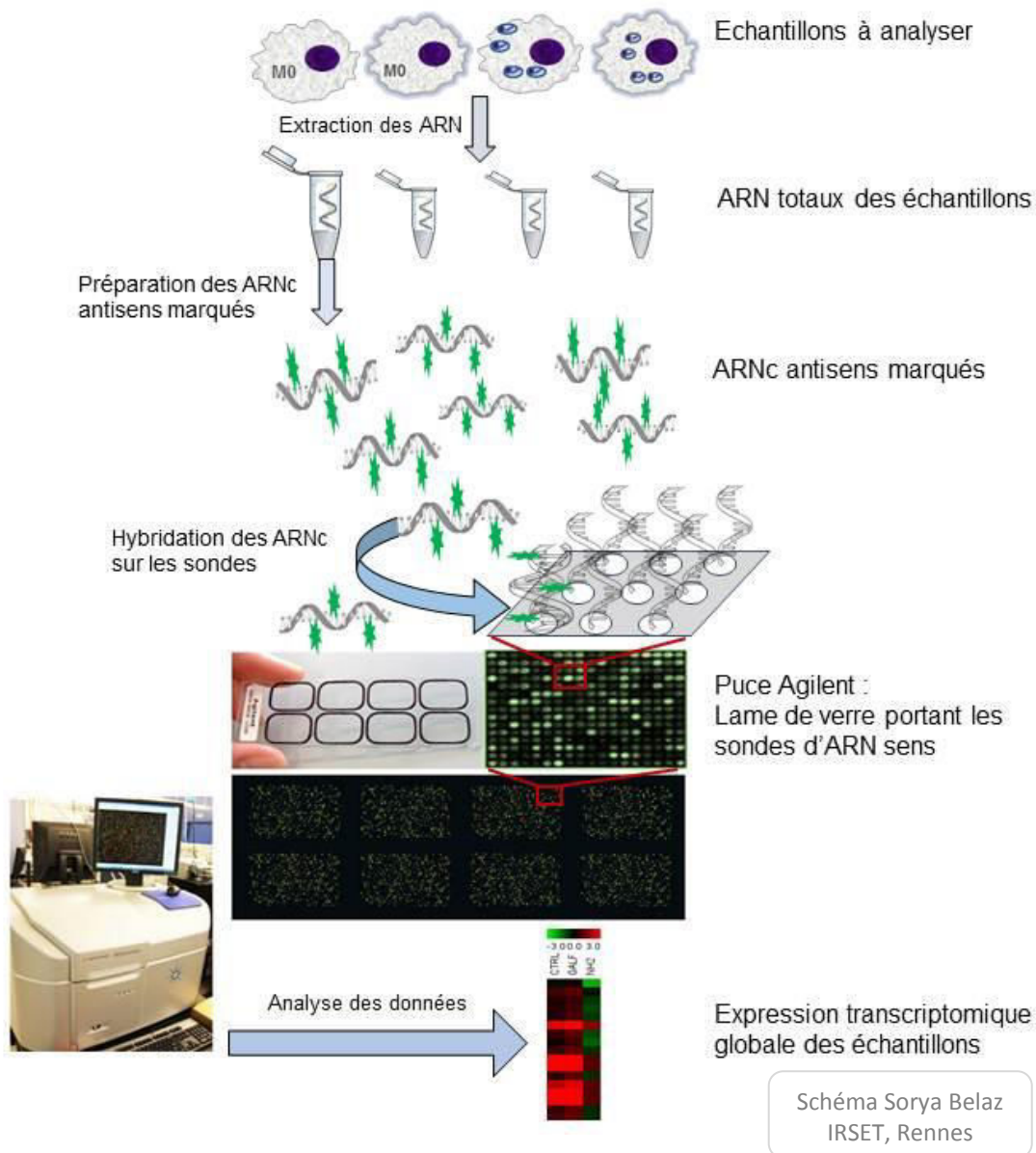


Figure 36 : Représentation schématique de l'analyse transcriptomique globale à l'aide de la technologie Agilent®

Au total, 6 conditions ont été réalisées : macrophages M0 non infectés non traités ou traités par Galf-oct ou par NH2-Galf, et macrophages M0 infectés par *L. donovani* non traités ou traités par Galf-oct ou par NH2-Galf.

Pour la condition contrôle non infectée et la condition non infectée traitée par Galf-oct, les données représentent la moyenne de 5 échantillons analysés au cours de 2 expériences indépendantes, pour les autres conditions les données sont issues de 4 échantillons analysés au cours de 2 expériences indépendantes. Pour toutes les conditions, les macrophages étaient issus de 3 donneurs différents.

Les ARN ont été extraits avec le kit RNeasy® Mini-kit (Qiagen), avec ajout d'une étape de digestion de l'ADN avec le kit RNase-Free DNase set Qiagen®. Brièvement, les cellules ont été lysées par le tampon de lyse additionné de β -mercaptoéthanol, puis les lysats ont été récupérés et homogénéisés volume à volume dans l'éthanol à 70%, avant d'être déposés

sur les colonnes. Après un premier lavage permettant d'éliminer les sels ayant pu se fixer sur la colonne, l'ADN a été éliminé par le traitement à la DNase. Puis 3 lavages supplémentaires ont été réalisés avant d'éluer les ARN dans 30µl d'eau « RNase-Free » fournie dans le kit.

Après dosage de la quantité d'ARN par spectrométrie (NanoDrop™ 2000 Thermo Fisher Scientific) et vérification de la qualité des éluats (Bio Analyzer 2100 Agilent®), les ARN sont ensuite préparés en vue de l'hybridation (Figure 37). La première étape est l'ajout d'un promoteur T7 à la queue poly A des ARNm, puis une étape de rétro transcription permet d'obtenir les ADNc anti sens et les ADNc sens. Ces derniers servent de matrice à l'ARN polymérase pour synthétiser les ARN complémentaires (ARNc) en présence de désoxycytidine triphosphate (dCTP) marquée par la Cy-3, les brins d'ARNc anti sens marqués par Cy-3 sont ainsi obtenus, et les échantillons sont purifiés sur colonne (RNeasy Mini kit Qiagen®) pour éliminer les brins d'ADNc restants (Figure 37).

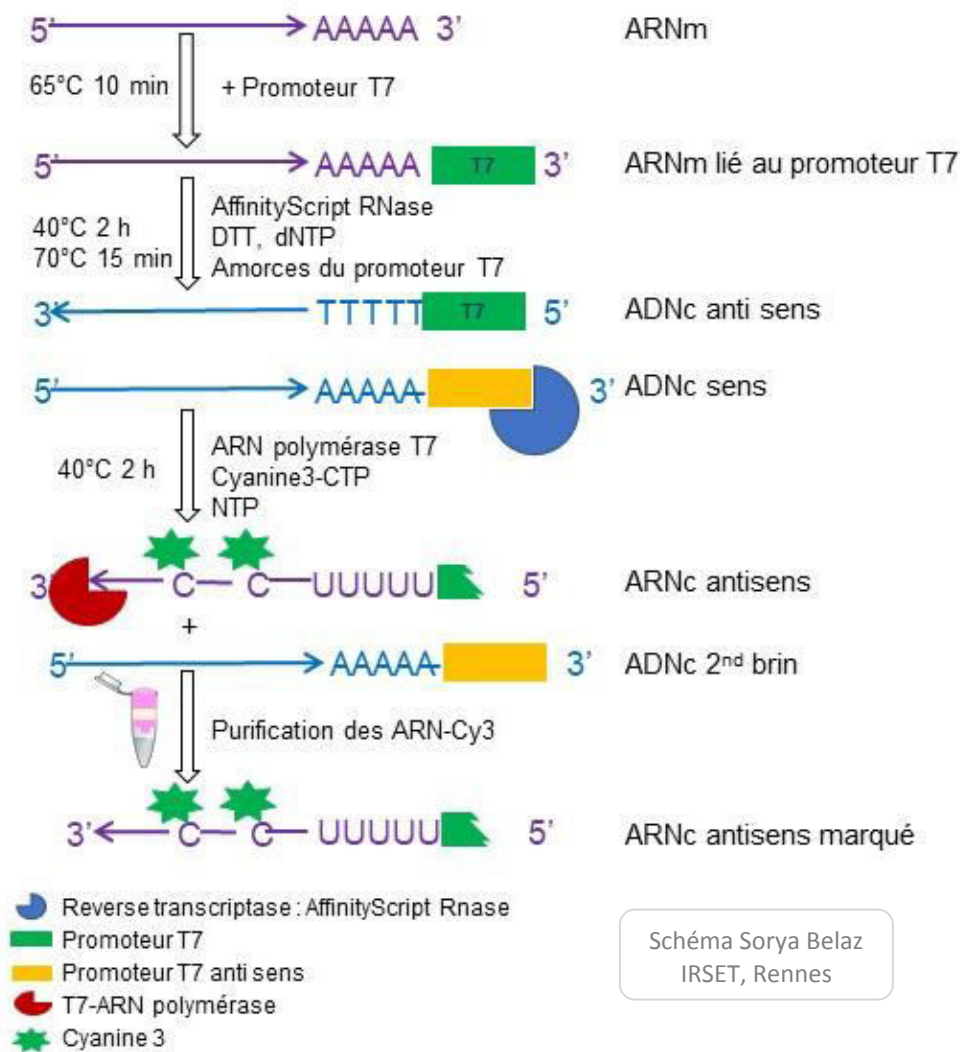


Figure 37 : Etapes de préparation des ARNc marqués en vue de l'hybridation

Les ARNc marqués sont ensuite déposés sur les lames et l'hybridation sur les ARN cibles est réalisée sous rotation constante et chauffage à 65°C pendant 17 heures. Après lavages, les lames ont été lues à l'aide du scanner Agilent® SureScan Microarray et les données brutes de niveau d'expression de chaque ARN fixé sur les puces sont récupérées par Agilent® Feature Extraction Software.

A l'aide du logiciel R, les niveaux d'expression de chaque gène ont été normalisés pour chacune des 2 expériences, puis avec le logiciel Excel les moyennes d'expression de chaque gène étudié pendant les 2 expériences ont été calculées, pour chaque condition. Puis les niveaux d'expression de chaque gène ont été comparés au groupe « contrôle non traité » correspondant (non infecté ou infecté), pour chaque traitement (Gal β -oct ou NH $_2$ -Gal β) permettant ainsi d'obtenir pour chaque gène étudié et pour chaque condition un Fold Change (FC) d'expression comparée à son contrôle.

La liste des gènes associés au FC correspondant pour chaque condition a été étudiée à l'aide du logiciel TigrMev 4 (260), permettant de rechercher des clusters de gènes surexprimés ou sous-exprimés après traitement par Gal β -oct ou NH $_2$ -Gal β . La liste des gènes de chaque cluster a ensuite été analysée sur STRING DataBase (261) pour rechercher des interactions connues ou prédites (base de données GO = gene ontology ou KEGG = Kyoto encyclopaedia for genes and genomes) entre les protéines codées par ces gènes, permettant de mettre en évidence les réseaux protéiques affectés par le traitement par les dérivés du Gal β .

3.2.3 Expression des ARNm par qPCR

L'expression unitaire de différents gènes impliqués dans la réponse immunitaire ou dans la polarisation des macrophages M0 vers la voie M1 ou M2 par le Gal β -oct et le NH $_2$ -Gal β , a été étudiée pour valider les résultats issus des puces Agilent. L'effet des furanosides sur des macrophages prépolarisés M1 ou M2 a également été évalué. Après lyse des cellules traitées (pendant 24h ou 48h), les ARN des différents types de macrophages humains en culture ont été extraits sur colonne Qiagen® (RNeasy® Mini kit) selon le même protocole que l'extraction réalisée pour l'analyse transcriptomique à raison de 500 000 macrophages par échantillon mais sans traitement par la DNase. Les ARN ont été élués dans un volume de 30 μ l.

Une transcription inverse avec le kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystems™) a été réalisée selon les recommandations du fabricant. Les échantillons d'ADNc ont été dilués au 10^{ème} avant l'amplification.

La PCR quantitative a ensuite été réalisée en plaques de 384 puits, dans un volume final de 10µL contenant 2µl d'ADNc et 8µL de mix (SybR® green PCR master mix (Applied Biosystems™) additionné de 3 µM de chaque amorce). L'amplification consistant en 2 min à 50°C, puis 10 min à 95°C et 40 cycles de 15 s à 95°C et 1 min à 60 °C a été réalisée sur le thermocycleur 7900 HT fast real time PCR system® (Applied Biosystems™). Une courbe de dissociation a été ajoutée à la fin de la réaction pour contrôler la spécificité de l'amplification. Chaque échantillon a été testé en duplicat.

Au total les données obtenues pour les macrophages polarisés M0 traités avec une concentration de dérivés du Galf de 40µM correspondent à 12 échantillons et 4 donneurs différents. Les données obtenues pour les macrophages M0 traités par les dérivés du Galf à la concentration de 80µM sont également issues de 12 échantillons chez 4 donneurs. Les données obtenues pour les macrophages polarisés M1 ou M2a puis traités par les dérivés du Galf à 80µM sont issues de 7 échantillons provenant de 2 donneurs différents.

3.2.4 Expression des marqueurs de surface

L'expression des marqueurs de surfaces des macrophages M0 infectés ou non puis traités a été étudiée par Cytométrie en Flux (CMF).

Les données recueillies permettent d'évaluer le pourcentage de cellules exprimant un marqueur donné, mais également le niveau d'expression du marqueur à la surface des cellules positives (exprimé MFI). Selon la configuration des cytomètres de flux utilisés, il est possible de détecter l'expression simultanée de plusieurs marqueurs. Deux cytomètres ont été utilisés pour ce travail, le FACS Aria II (Becton Dickinson) et le FC500 (Beckman Coulter). L'Aria possède 3 lasers avec un panel de filtres permettant de détecter en simultanément 9 fluorochromes, la configuration est présentée dans un tableau en [Annexe 2](#) et à l'aide d'une figure en [Annexe 3](#). Le FC 500 possède 2 lasers, et un panel de filtres permettant la détection simultanée de 7 fluorochromes, configuration présentée dans un tableau en [Annexe 4](#).

Pour ce travail 3 mélanges d'anticorps ont été utilisés en accord avec la configuration des automates disponibles sur la plateforme ([Tableau 7](#)) : 2 sur le FC500 et un mélange sur l'Aria auquel un marquage de viabilité a été ajouté. En effet le laser violet associé au filtre à 530 nm, permet l'excitation (à 405 nm) et la détection de la fluorescence émise (max à 550 nm) par le kit LIVE/DEAD™ fixable yellow stain (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA, L34959) (LD). Ce colorant jaune est un colorant amino-réactif qui se lie de façon covalente aux amines intracellulaires et extracellulaires. Dans les cellules aux membranes endommagées, le colorant réagit avec les amines libres autant à l'intérieur de la cellule qu'à sa surface, ce qui produit une coloration fluorescente intense (LD^{high}). Dans les cellules viables, la réactivité du colorant se limite aux amines à la surface des cellules, ce qui se solde par une fluorescence moins intense (LD^{low}).

Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés pour le marquage en cytométrie en flux

		Anticorps [¥] anti :	Fluorochrome	Dilution	Fournisseur/référence
Mix Aria		CD68	AF 647	1/40	BD / 562111
		CD14	PE-Cy7	1/40	BD / 557742
		Dectin-1	AF 488	1/20	AbD serotec (Bio-Rad) / MCA 4662A488
		CD200R	Per CP-eFluor 710	1/20	E-biosciences (Thermo Fischer) / 46-9201-42
		CD163	PE	1/20	BD / 556018
Mix	Mix 1	CD80	PE	1/20	BD / 557227
		CD206	PE-Cy5	1/10	BD / 551136
FC500	Mix 2	CD209	Per CP-Cy5.5	1/20	E-biosciences (Thermo Fischer) / 45-2099-42

¥ Anticorps de souris anti humain ; AF : Alexa Fluor ; PE : Phycoérythrine ; Cy 7 : Cyanine 7 ; Per CP : Périidine Chlorophylle Protéine ; Cy 5 et Cy 5.5: Cyanine 5 et 5.5 ; BD : Becton Dickinson

Ce travail a été réalisé sur des macrophages non polarisés M0, infectés ou non infectés, puis traités par les dérivés du Galf et récoltés pour effectuer le marquage à raison de 10^6 macrophages par échantillon. Les cellules sont décollées par grattage doux et lavées à 2 reprises dans un tampon phosphate salin (PBS) avec 0.01M d'azide et 2% de SVF (solution de lavage) puis réparties dans 3 tubes pour être marquées par chaque Mix présenté dans le [Tableau 7](#). Pour les cellules qui sont marquées avec le « Mix Aria », la première étape est le marquage par le kit LIVE/DEAD selon les recommandations du fabricant. Puis pour toutes les cellules, les récepteurs aux fragments Fc qui sont présents sur la surface des macrophages, sont bloqués par une incubation à 4°C de 15 min en PBS avec du sérum humain à 10%. Après 2 nouveaux lavages les cellules sont marquées à 4°C pendant 30 min en PBS avec les mélanges d'anticorps présentés dans le [Tableau 7](#). Puis après 2 nouveaux lavages elles sont fixées pendant 5 min à température ambiante en formol dilué à 4% dans la solution de lavage. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans 400 µl de PBS dans les tubes adaptés à l'automate et sont passées au cytomètre de flux.

Des macrophages ont également été marqués avec un seul anticorps à la même dilution que dans les différents mix afin de réaliser la matrice de compensation entre les différents fluorochromes. L'analyse a été réalisée grâce au logiciel CXP (Beckman Coulter). Après élimination des cellules mortes (LD^{high}), les autres marqueurs ont été évalués quant au nombre de cellules positives (en %) et à la MFI.

Les résultats représentent 6 échantillons et 3 donneurs.

3.3. Résultats

3.3.1 Analyse transcriptomique globale

3.3.1.1 Macrophages M0 non infectés, traités par GalF-oct et NH2-GalF

La liste des gènes surexprimés ou sous-exprimés après traitement par GalF-oct ou par NH2-GalF avec un FC ≥ 2 représente 1344 gènes.

Parmi ces gènes, 211 et 533 gènes sont surexprimés dans le groupe GalF-oct et le groupe NH2-GalF, respectivement. Les gènes réprimés représentent 370 gènes dans le groupe GalF-oct et 230 gènes dans le groupe NH2-GalF.

Avant le classement hiérarchique, aucun réseau de gènes ne ressort de l'analyse des gènes surexprimés ou réprimés dans chaque condition.

Après hiérarchisation et clustering par le logiciel TigrMev 4 (260) en appliquant un seuil de distance entre les branches (arbitraire) de 4.5, 6 clusters de gènes se démarquent. La Figure 38 représente à gauche l'arbre obtenu, l'échelle varie du vert pour les gènes réprimés, au rouge pour les gènes surexprimés. A la droite de l'arbre, des pavés de couleur marquent les gènes, de gauche à droite, rose 1 = surexprimés (FC > 2) dans le groupe GalF-oct, rose 2 = surexprimés (FC > 2) dans le groupe NH2-GalF, vert 1 = réprimés (FC < 2) dans le groupe GalF-oct, vert 2 = réprimés (FC < 2) dans le groupe NH2-GalF, violet = cluster 1, rouge = cluster 2, saumon = cluster 3, rose 3 = cluster 4, violet 2 = cluster 4', vert 3 = cluster 5, et vert 4 = cluster 6.

La recherche de groupes de gènes codant pour des protéines impliquées dans un processus biologique, formant un réseau significatif ($p > 0.05$) à l'aide de STRING Database (261), n'a identifié aucun réseau de protéines dans les clusters 2, 4 et 4'.

Le cluster 1 comprend 170 gènes, principalement des gènes surexprimés après traitement par NH2-GalF. Au sein de ce cluster, un petit réseau paraît intéressant en termes de réponse immunitaire. En effet, ce réseau est centré sur l'IL-10 et contient également IDO, TLR3 et CXCL9. Toutefois ce groupe ne forme pas de réseau significativement enrichi par un processus biologique (aucune valeur de $p < 0,05$ obtenue avec la liste des protéines codées par les gènes du cluster 1) (Figure 38).

Le cluster 3 contient 136 gènes principalement surexprimés après traitement par le GalF-oct. Un groupe de gènes est mis en évidence dans ce cluster, dans lequel 9 gènes codent pour des protéines impliquées dans la signalisation par les chimiokines ($p = 0,015$) (Figure 38).

Les clusters 5 et 6 sont composés respectivement de 413 et 147 gènes, principalement réprimés après traitement par les deux dérivés du GalF. Les réseaux de protéines codées par ces gènes sont impliqués dans la composition de la membrane plasmique (Figure 38).

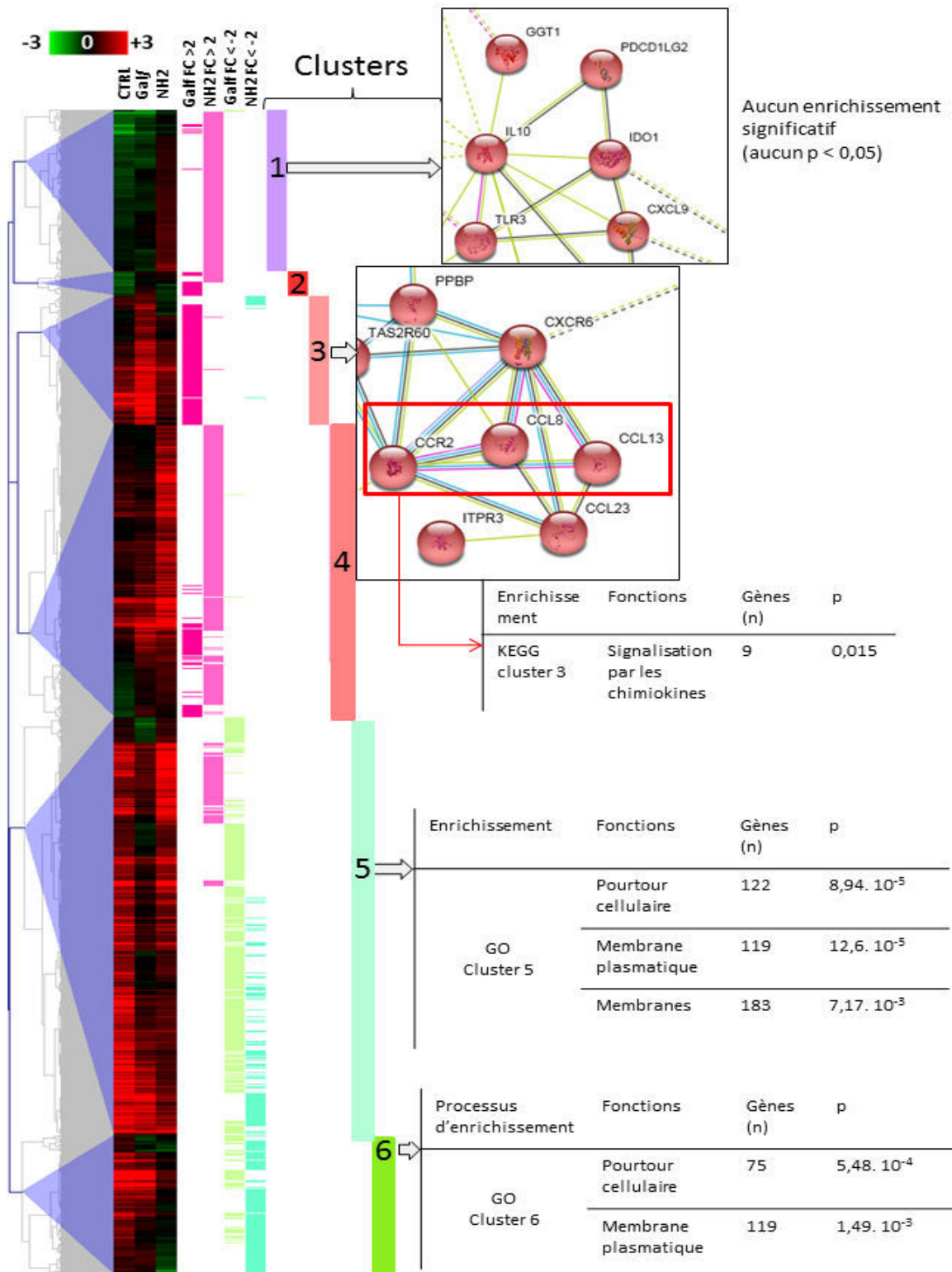


Figure 38 : Analyse transcriptomique des gènes des échantillons contrôles non infectés comparés aux échantillons non infectés traités par le GalF-oct ou le NH2-GalF
 Figure représentant à gauche, les gènes ayant au moins un $|FC| \geq 2$ dans l'une des conditions et organisés en cluster par « Hierarchical Clustering » avec TM4 (260). A droite, réseaux de gènes impliqués dans un processus biologique obtenus par analyse avec STRING DataBase (261) avec l'enrichissement des clusters présentés dans les tableaux à droite

3.3.1.2 Macrophages M0 infectés, traités par Galf-oct et NH2-Galf

La liste des gènes surexprimés ou sous-exprimés après traitement par Galf-oct ou par NH2-Galf avec un FC ≥ 2 représente 1047 gènes.

Parmi ces gènes, 219 et 333 gènes sont surexprimés dans le groupe Galf-oct et le groupe NH2-Galf, respectivement (FC ≥ 2). Les gènes réprimés représentent 155 gènes dans le groupe Galf-oct et 340 gènes dans le groupe NH2-Galf.

Avant le classement hiérarchique, aucun réseau de gènes ne ressort de l'analyse des gènes surexprimés ou réprimés dans chaque condition prise une à une. Les 34 gènes surexprimés dans les 2 conditions sont représentés dans la Figure 39. La recherche de réseaux de protéines impliquées dans un processus biologique montre 3 protéines parmi ces 34, toutes impliquées dans le chimiotactisme des leucocytes ($p = 0,0385$).

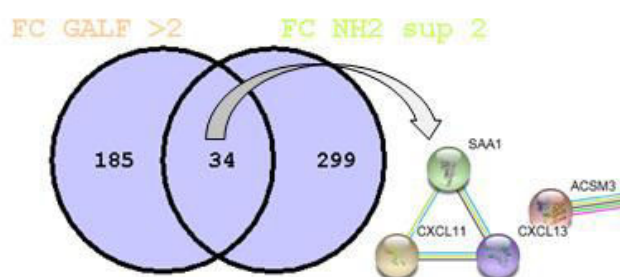


Figure 39 : Diagramme de Venn et réseau de gènes surexprimés avec les 2 traitements par les dérivés du Galf

Après hiérarchisation et clustering par le logiciel TigrMev 4 (260) en appliquant un seuil de distance entre les branches (arbitraire) de 4.5, 6 clusters de gènes se démarquent. Les clusters 2' et 5' ont également été isolés car ils contiennent des gènes surexprimés dans le groupe Galf-oct (traitement qui semble le plus intéressant en termes d'efficacité antiparasitaire). La Figure 40 représente à gauche l'arbre obtenu, l'échelle varie du vert pour les gènes réprimés au rouge pour les gènes surexprimés. A la droite de l'arbre, des pavés de couleur marquent les gènes, de gauche à droite, rouge 1 = surexprimés (FC > 2) dans le groupe Galf-oct, rose 1 = surexprimés (FC > 2) dans le groupe NH2-Galf, vert 1 = réprimés (FC < 2) dans le groupe NH2-Galf, vert 2 = réprimés (FC < 2) dans le groupe Galf-oct, gris = cluster 1, bleu = cluster 2, rose 2 = cluster 2', vert 3 = cluster 3 et 4, rouge 2 = cluster 5, rose 3 = cluster 5', et vert 4 = cluster 6.

La recherche de groupes de gènes codant pour des réseaux protéiques impliqués dans un même processus biologique à l'aide de STRING Database (261), n'a montré aucun réseau (significatif, $p > 0,05$) dans les clusters 1, 2', 3 et 4.

Le cluster 2 contient 355 gènes principalement réprimés après traitement par le NH2-Galf. Un groupe de gènes codant pour un réseau protéique est mis en évidence dans ce cluster, dans lequel 13 protéines sont impliquées dans la signalisation par les chimiokines ($p = 0,043$) (Figure 40).

Le cluster 5 est composé de 306 gènes principalement surexprimés après traitement par l'un des 2 traitements. Un groupe de gènes codant pour 2 réseaux protéiques est mis en évidence dans ce cluster, le premier réseau contient 13 protéines impliquées dans la signalisation par les chimiokines ($p = 8,4 \cdot 10^{-3}$) (Figure 40), et 9 protéines impliquées dans la voie JAK/STAT ($p = 0,022$) (représentés par des ronds bleus dans le réseau de protéines du cluster 5 de la Figure 40).

Au sein du cluster 5, un groupe de 22 gènes fortement surexprimés après traitement par Galf-oct et NH2-Galf a été isolé en cluster 5', il comprend un groupe de gènes codant pour un réseau de 7 protéines impliquées dans la signalisation par les TLRs ($p = 2 \cdot 10^{-9}$) (Figure 40).

Enfin le cluster 6 contient un groupe de 131 gènes surexprimés principalement après traitement par NH2-Galf, codant pour 2 réseaux protéiques se chevauchant, d'une part, 18 protéines (représentés par les ronds bleus au sein du réseau de protéines du cluster 6 sur la Figure 40) impliquées dans la migration leucocytaire ($p = 1,15 \cdot 10^{-9}$), et d'autre part, 15 protéines impliquées dans les interactions cytokines-chimiokines (Figure 40).

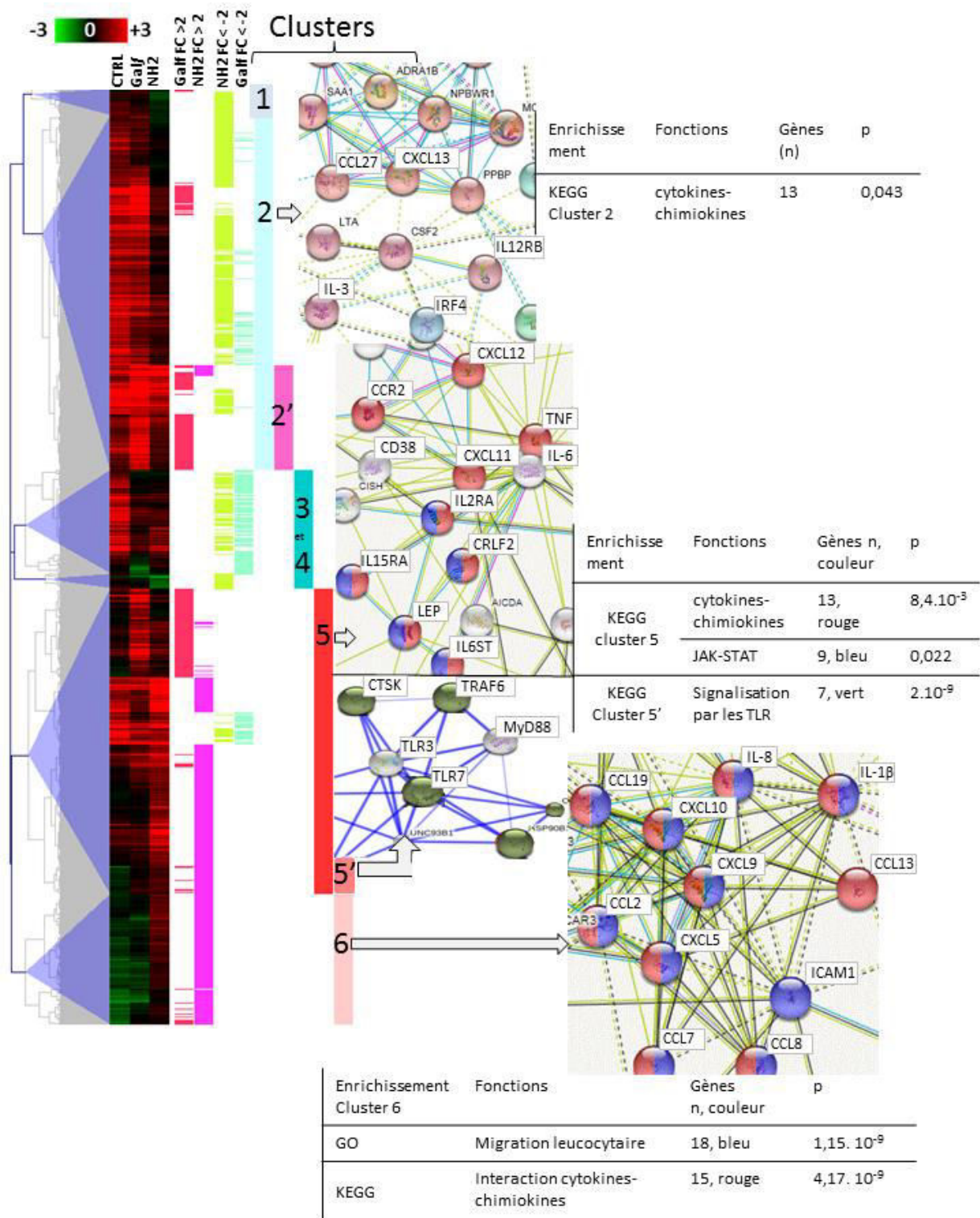


Figure 40 : Analyse transcriptomique des gènes des échantillons contrôles infectés comparés aux échantillons infectés traités par le Galf-oct ou le NH2-Galf
 Figure représentant à gauche, les gènes ayant au moins un $|FC| \geq 2$ dans l'une des conditions et organisés en cluster par « Hierarchical Clustering » avec TM4 (260). A droite, réseaux de gènes impliqués dans un processus biologique obtenus par analyse avec STRING DataBase (261)

3.3.2 Expression relative de gènes impliqués dans la réponse immune et marqueurs de surfaces exprimés par les macrophages M0

Les macrophages M0 non infectés puis traités par Gal β -oct ne montrent que 2 gènes dont l'expression est significativement modifiée par le traitement ; CXCL13 est augmenté d'un facteur 4 ($p=0,0289$) et CD200R diminue presque de moitié ($p=0,0064$).

NH₂-Gal β n'a entraîné aucune modification significative de l'expression des gènes testés.

Après infection par *L. donovani*, le traitement par Gal β -oct a provoqué une induction globale (significative) de presque tous les gènes testés (IL-1 β , $p<0,0001$; IL-12, $p=0,0006$; CD200R, $p=0,0002$; IDO, $p=0,0004$; TNF- α , $p=0,008$; NF- κ B, $p=0,004$; iNOS, $p=0,003$; MCP-1, $p=0,004$; CXCL10, $p=0,007$; CXCL13, $p=0,003$; IL-10, $p=0,002$; CCL17, $p=0,01$; CD80, $p=0,024$; MRC-1, $p=0,031$; TLR4, $p=0,065$) sauf Dectin-1 qui est discrètement diminuée (non significativement $p=0,98$) et CD14 et PPAR- γ (peroxysome proliferator activated receptor- γ) qui restent stables. Le traitement par NH₂-Gal β est également suivi d'une induction globale des gènes testés (CD80, MCP-1, MRC-1, IL-12, TNF- α , IL-1 β , CXCL13, IL-10, CCL17, TGF- β , CD200R, NF- κ B, iNOS et IDO). Toutefois, seule l'induction de NF- κ B ($p=0,001$), IDO ($p=0,006$) et MCP-1 ($p=0,012$) sont significatives. Comme après traitement par Gal β -oct, Dectin-1 est réprimée (de façon significative avec NH₂-Gal β , $p=0,004$).

Au total, l'expression des gènes codant pour des cytokines ou chimiokines M1 ou Th1 est globalement augmentée (Figure 41 A, B, C) et cela surtout après un traitement par Gal β -oct. Alors que certains marqueurs M2 comme l'IL-10 (Figure 41 D), ou le CXCL13 sont elles aussi augmentées, d'autres marqueurs M2 comme le TGF- β ou PPAR- γ , ne sont pas influencés par le traitement (Figure 41 E, F). Concernant les récepteurs lectine de type C, nos résultats montrent un effet opposé entre Dectin-1 qui est plutôt réprimée pour les macrophages infectés et MRC-1 qui est plutôt induit (Figure 41 G, H). Enfin, l'expression de 2 effecteurs de la réponse immune anti-leishmanie, NF- κ B et iNOS, est induite par les dérivés du Gal β (Figure 41 I, J).

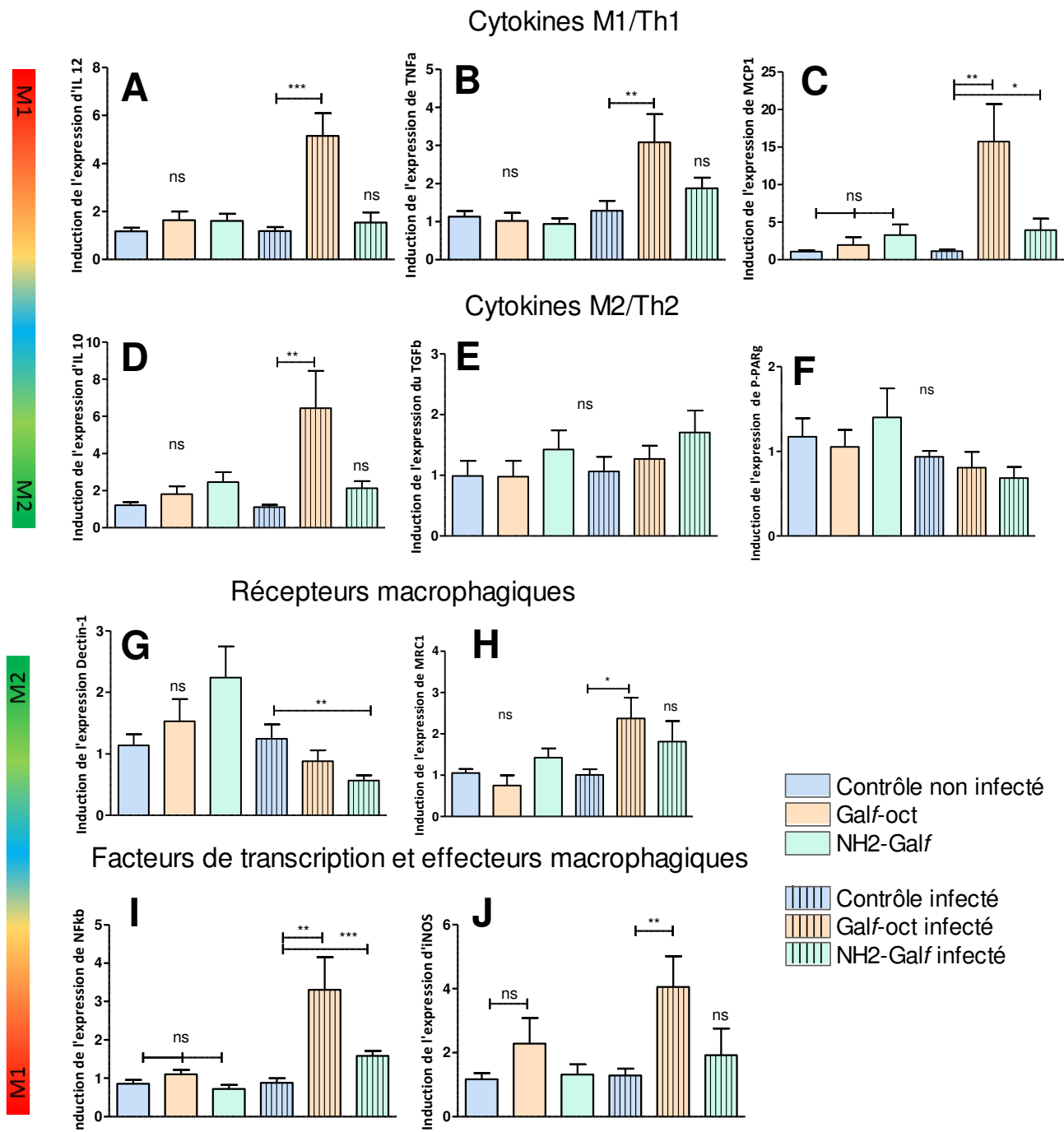


Figure 41 : Expression par des macrophages M0 infectés ou non puis traités par Galf-oct et NH2-Galf des ARNm de gènes de cytokines Th1, de cytokines Th2, de récepteurs macrophagiques, de facteurs de transcription et d'effecteurs macrophagiques

Graphique représentant pour chaque gène le résultat moyen de tous les échantillons (nombre d'échantillon et nombre de donneurs détaillés dans le Tableau 9). * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

Les marqueurs macrophagiques exprimés en surface, évalués par la CMF, sont le reflet de l'expression des ARNm, mais après un certain nombre d'étapes de régulation post-transcriptionnelle.

Globalement, les macrophages non infectés expriment, à leur surface, une quantité diminuée de marqueurs M2 (diminution de la MFI de Dectin-1, MRC-1, CD200R, CD163, Tableau 8). Concernant les marqueurs M1, le Tableau 8 montre que leur expression est tantôt stable (CD68 après traitement par NH2-Galf, CD80 après traitement par le Galf-oct et DC-SIGN), tantôt diminuée (CD14), tantôt augmentée (CD68 après traitement par Galf-oct et CD80). Les marqueurs M2 exprimés par les macrophages infectés sont également diminués suite aux 2 traitements (Tableau 8), mais également des marqueurs M1 (CD14, CD68 et DC-SIGN) excepté CD80 dont l'expression en surface augmente après traitement par NH2-Galf (Tableau 8).

Tableau 8: Tableau récapitulatif des marqueurs exprimés à la surface des macrophages M0 infectés et non infectés traités Galf-oct et NH2-Galf, quantifiés par cytométrie en flux

		CD80		CD14		CD68		DC-SIGN		Dectin-1		MRC-1		CD200r		CD163	
		MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%
Non infectés	Galf-oct	↔	↗	↘*	↔	↗*	↔	↘	↔	↘	↘	↔	↘*	↔	↗	↘	
	NH2-Galf	↗	↗	↘*	↔	↔	↔	↔	↘	↘	↘*	↔	↘*	↔	↘*	↗	
Infectés	Galf-oct	↔	↔	↘*	↔	↘	↔	↘	↔	↘*	↘*	↘*	↔	↘*	↔	↘	↘*
	NH2-Galf	↗*	↔	↘	↔	↘	↔	↔	↗	↘*	↔	↘*	↔	↘	↔	↘*	↗*

MFI : Moyenne d'intensité de fluorescence, * : p<0,05

CD80 est exprimé par une plus grande proportion de macrophages non infectés et la quantité de récepteurs exprimés sur chaque macrophage est également augmentée après traitement par NH2-Galf des macrophages infectés (p=0,029) ou non (Figure 42 A et Tableau 8).

CD14 est exprimé constitutivement par les monocytes et les macrophages, il est donc exprimé par 100% des macrophages, en concordance avec les résultats de qPCR qui retrouvent l'ARNm de CD14 stables dans toutes les populations de macrophages M0 étudiés (Tableau 8 et Figure 42B). Son expression en surface est assez intense puisque c'est le marqueur pour lequel les MFI sont les plus importantes (entre 15% et 33%), toutefois son niveau d'expression est significativement diminué pour les macrophages infectés et non infectés traité par Galf-oct (p=0,029 dans les 2 cas) et pour les macrophages non infectés traités par le NH2-Galf (p=0,029) (Tableau 8 et Figure 42 B).

L'expression, en qPCR, des ARNm de Dectin-1 était induite pour les macrophages non infectés et réprimée (significativement) pour les macrophages infectés, et ce quel que soit

le traitement. Ceci est confirmé, pour les macrophages infectés, par l'expression des marqueurs de surface en CMF ($p=0,029$) (Figure 42 C). Cependant, à la différence des résultats d'expression en qPCR, la proportion de macrophages non infectés exprimant Dectin-1 à leur surface, et la quantité exprimée en surface, a plutôt tendance à diminuer (Figure 42 C).

Comme CD14, CD200R est exprimé constitutivement par tous les macrophages (Figure 42 D), cependant la quantité moyenne exprimée à la surface des macrophages infectés ou non infectés diminue significativement, après traitement par le Gal α -oct ($p=0,029$ et $p=0,029$, respectivement) ; la même tendance est observée après traitement par NH $_2$ -Gal α ($p=0,029$ et $p=0,06$, respectivement) (Figure 42 D).

Enfin, CD163 est le marqueur exprimé par la plus faible proportion de macrophages, entre 4% pour les macrophages infectés traités par Gal α -oct et 28% pour les macrophages infectés traités par NH $_2$ -Gal α , et la quantité moyenne de CD163 en surface des macrophages infectés ou non infectés est significativement diminuée suite au traitement par NH $_2$ -Gal α ($p=0.029$ dans les 2 cas).

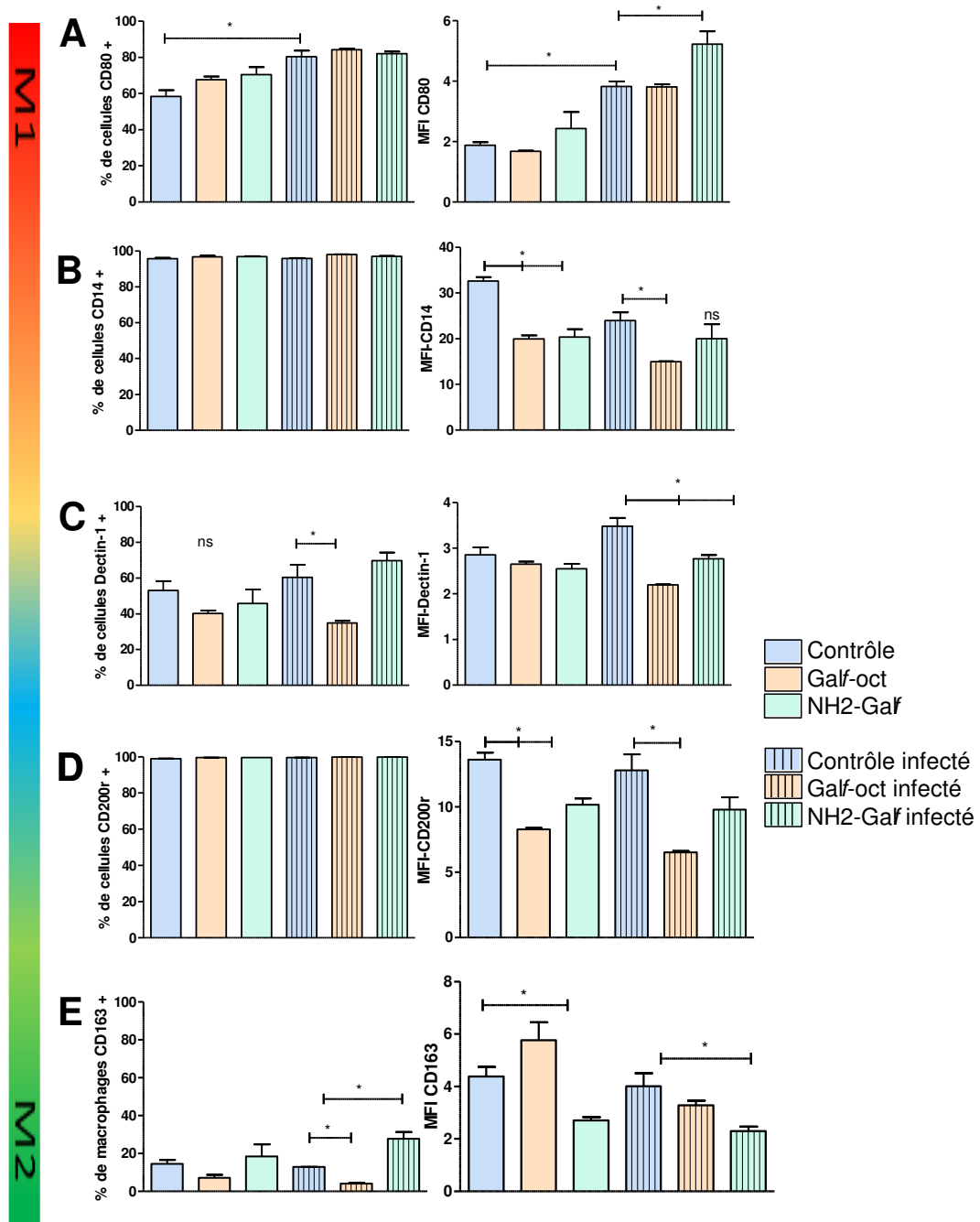


Figure 42: Marqueurs de surface des macrophages M0 infectés ou non infectés puis traités par Galf-oct et NH2-Galf

Graphique représentant pour chaque récepteur le résultat d'une expérience réalisée en quadruplat. A gauche % de cellules exprimant le récepteur et à droite MFI du récepteur. * : $p < 0,05$, MFI : Moyenne d'intensité de fluorescence

Tableau 9: Tableau récapitulatif des variations d'expressions des gènes de récepteurs, cytokine et chimiokines, facteurs de transcription et effecteurs macrophagiques dans les 6 populations de macrophages M0, M1 et M2 non infectés ou infectés.

		Récepteurs							Cytokines et chimiokines							FT		Effecteurs			
		CD80	TLR4	CD14	CD64 ¥	Dectin-1	MRC-1	CD200R	IL-12	TNF- α	IL-1 β	MCP-1	CXCL10	CXCL13	IL-10	CCL17	TGF- β	NF- κ B	PPAR	iNOS	IDO
		19; 9	19; 9	10; 4	8; 3	19; 9	10; 4	19; 9	19; 9	19; 9	19; 9	10; 4	8; 3	8; 3	19; 9	8; 3	10; 4	10; 4	8; 3	19; 9	10; 4
M0	Non infectés	Galf- oct	↔	↔	↔	↗	↗	↔	↗	↔	↗	↗	↗	↗*	↗	↗	↔	↗	↔	↗	↔
		NH2- Galf	↔	↔	↔	↗	↗	↗	↔	↔	↗	↗	↗	↗	↗	↔	↗	↔	↔	↗	↔
	Infectés	Galf- oct	↗*	↗	↔	↗	↘	↗*	↗***	↗***	↗**	↗***	↗**	↗**	↗**	↗*	↗	↗**	↔	↗**	↗***
		NH2- Galf	↗	↔	↔	↘	↘**	↗	↗	↗	↗	↗	↗*	↔	↗	↗	↗	↗***	↔	↗	↗**
M1	Non infectés	Galf- oct	↔	↗	↘	↗	↔	↗*	↗	↗	↗	↗	↔	↗	↗	↗	nd	↘	nd	↗	↔
		NH2- Galf	↘	↔	↘	↔	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↔	↗	↗	↘	nd	↘	nd	↗	↔
	Infectés	Galf- oct	↘*	↘	↔	↘*	↔	↔	↔	↘	↘	↘	↘**	↘	↗	↘	nd	↘	nd	↘**	↘
		NH2- Galf	↘*	↘	↘	↘*	↗	↗**	↔	↘	↗	↘	↘**	↘	↗	↔	↔	nd	↘	nd	↘**
M2	Non infectés	Galf- oct	↗	↔	↘	↘*	↗	↔	↘	↔	↔	↔	↔	↔	↘	↘	nd	↔	nd	↗	↔
		NH2- Galf	↘*	↔	↘*	↘*	↗	↗	↘	↗	↗	↗	↗	↗	↘	↔	nd	↔	nd	↗	↗
	Infectés	Galf- oct	↗*	↔	↘	↘*	↗	↗	↘	↗	↗	↔	↔	↗	↘	↘	nd	↔	nd	↔	↗
		NH2- Galf	↔	↔	↘*	↘*	↔	↗	↘	↗	↗***	↘	↔	↗	↗	↘*	↗	nd	↔	nd	↘

CD80 X; Y : X = nb de répliques ; Y = nb de donneurs, FT : Facteur de transcription ; nd : non déterminé, * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001 ; ¥ : 1 donneur exclu car exprimant CD64 de façon très élevée (x100) ; ¥¥ : Impossibilité d'évaluer PPAR dans le groupe contrôle

3.3.3 Expression relative de gènes impliqués dans la réponse immune par les macrophages polarisés M1 et M2a

L'expression des cytokines M1 et M2 par les macrophages **prépolarisés M1 non infectés** est globalement induite par les traitements par Galf-oct et NH2-Galf (IL-12, TNF- α , IL-1 β , CXCL13 et IL-10 avec les 2 traitements, CXCL10 et CCL17 après traitement par Galf-oct et MCP-1 après traitement par NH2-Galf) (Figure 43 et Tableau 9). Les Récepteurs M2 ont également tendance à être induits par le traitement de macrophages M1 par les dérivés du Galf, en revanche, les récepteurs M1 ont plutôt tendance à être réprimés après traitement par NH2-Galf (CD80, CD14) (Tableau 9). Comme pour les macrophages M0, iNOS a tendance à être induite suite au traitement des macrophages M1 non infectés ($p=0,07$ pour le Galf-oct) (Figure 43 D), en revanche, NF- κ B a tendance à être réprimé (Tableau 9).

Après traitement par les dérivés du Galf, les macrophages **prépolarisés M1 puis infectés** répriment la plupart des gènes testés, en particulier iNOS et MCP-1 (Figure 43) qui sont réprimés de façon significative par les 2 traitements ($p=0,007$ pour les 2 gènes après traitement par NH2-Galf et $p=0,003$ et $p=0,002$ après traitement par Galf-oct pour MCP-1 et iNOS, respectivement). (Cette répression d'iNOS va à l'encontre de l'augmentation de la production des ROS par ces macrophages, données non présentées). Seule l'expression de CXCL13 est induite après traitement par Galf-oct, alors que NH2-Galf induit l'expression de CXCL13, TNF- α , Dectin-1 et MRC-1 (cette dernière induction est la seule significative ($p=0,002$)) (Tableau 9).

De la même façon, pour les macrophages **prépolarisés M2a non infectés**, le traitement par NH2-Galf induit l'expression de la plupart des cytokines testées, excepté l'IL-10 qui a plutôt tendance à être réprimée, et CCL17 dont l'expression n'est pas modifiée par ce traitement. Le traitement par Galf-oct, quant à lui, ne modifie aucune cytokine, hormis CXCL13, IL-10 et CCL17 qui ont tendance à être réprimées.

L'expression des récepteurs macrophagiques M1 est significativement réprimée, chez les macrophages pré-polarisés M2a non infectés, par le traitement par NH2-Galf, pour 3 des 4 récepteurs testés (CD80, CD14 et CD64), alors que les marqueurs M2 ont plutôt tendance à être induits (Dectin-1 et MRC-1), hormis CD200R (Tableau 9). Le traitement par Galf-oct, ne montre pas de schéma de répression ou d'induction suivant le type M1 ou M2 des récepteurs, puisque CD80 et Dectin-1 ont tendance à être induits alors que CD14, CD64 et CD200R sont plutôt réprimés. Toutefois les effectifs sont plus faibles que ceux testés pour les macrophages M0 et seule la répression de CD64 est significative ($p=0,03$) (Figure 43) probablement par manque de puissance. Comme pour les macrophages M0 et M1, iNOS a tendance à être induite après le traitement par les dérivés du Galf (Tableau 9 et Figure 43).

Le traitement, des macrophages **prépolarisés M2a puis infectés**, par les dérivés du Galf induit globalement l'expression des cytokines Th1 (Tableau 9), en particulier l'IL-12 et le TNF- α (mais non significatif, $p=0,097$ pour le Galf-oct et significatif, $p=0,0006$ pour NH2-Galf) (Figure 43 E, F). Les cytokines Th2 sont globalement réprimées suite au traitement par Galf-oct alors que suite au traitement par NH2-Galf, seule l'IL-10 est réprimée. Concernant les récepteurs macrophagiques, le traitement des macrophages pré-polarisés

M2a puis infectés ne montre pas de schéma de répression ou d'induction en fonction du type M1 ou M2 des récepteurs. En effet, comme pour les macrophages M2a non infectés, Galf-oct induit l'expression de CD80 et de Dectin-1, mais aussi de MRC-1, tandis que NH2-Galf n'induit que ce dernier récepteur. Les 2 traitements répriment l'expression de CD14, CD64 et CD200R (Tableau 9 et Figure 43 G).

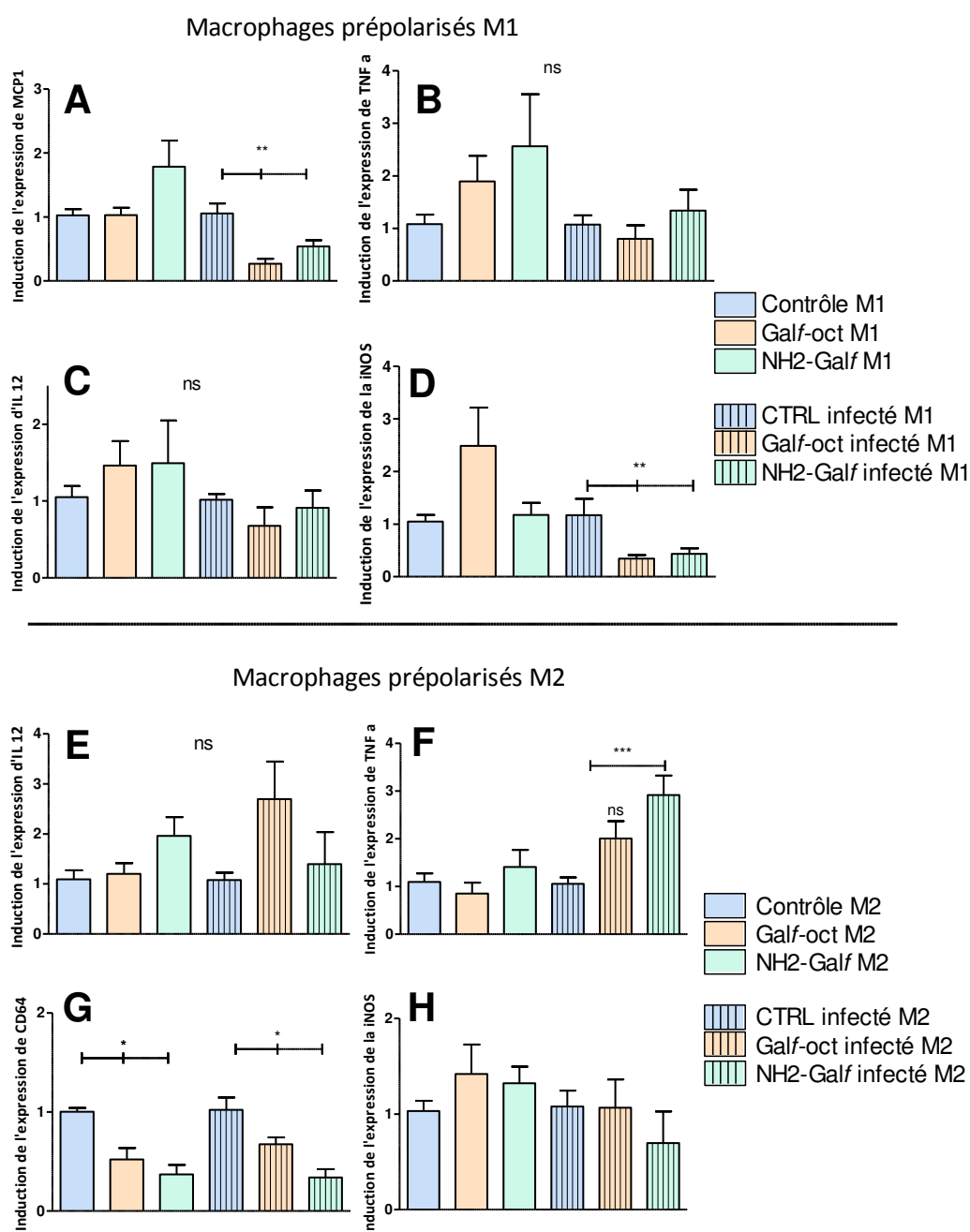


Figure 43 : Expression des ARNm de gènes de cytokines Th1, Th2, de récepteurs macrophagiques et d'effecteurs macrophagiques par des macrophages polarisés M1 ou M2a puis infectés ou non puis traités par Galf-oct et NH2-Galf

Graphique représentant pour chaque gène le résultat moyen de tous les échantillons (nombre d'échantillon et nombre de donneurs détaillés dans le Tableau 9). * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

3.4. Discussion

Même si le but initial du traitement par les Galfs est de restaurer les capacités microbicides des macrophages infectés, l'effet des furanosides sur les macrophages non infectés est intéressant à décortiquer, car il pourrait prédire d'éventuels effets secondaires, mais aussi car les macrophages non infectés sont naturellement impliqués dans la réponse antiparasitaire.

Le cluster 1 est un cluster **de gènes induits suite au traitement des macrophages non infectés** par NH₂-Galf. Ce cluster comprend des gènes plutôt orientés M2, tel que l'IL-10, et l'analyse des qPCR retrouve bien l'induction de l'IL-10, confortant ce résultat. Or, l'IL-10 stimule la production d'IL-4 et d'IL-6 par activation de la voie JAK1/STAT6, et par cette même voie, l'IL-10 peut aussi réprimer des cytokines Th1 telle que l'IFN- γ ou le TNF- α (261,262). Le rôle de l'IL-10 est néanmoins plus ambivalent, car elle présente une composante pro-inflammatoire, illustrée ici, puisque dans le même cluster, l'IL-10 est associée à CXCL9 qui est un marqueur plutôt M1 impliqué dans le chimiotactisme des monocytes et des PNN. TLR3, également retrouvé dans ce cluster, est souvent surexprimé après traitement des macrophages par l'IFN- γ (114), et l'entrée de *L. donovani* via ce TLR entraîne l'expression du TNF- α et la production de NO (par une voie de signalisation TLR3 – MyD88 – IRAK1) (114). Ainsi, ce groupe de gènes induits par le traitement par NH₂-Galf pourrait être favorable à la mise en place d'une réponse efficace par les macrophages lors de l'infection. Le cluster 3 comprend des gènes qui sont plutôt induits à la suite du traitement par le Galf-oct. Parmi ces gènes, un réseau protéique impliqué dans la signalisation par les cytokines a pu être mis en évidence grâce à STRING database (261). Dans ce réseau **CCL8, CCL13 et CCR2** (le récepteur de MCP-1) sont impliqués dans le **chimiotactisme des monocytes** (262).

Au total, en l'absence d'infection, le groupe de gènes induits par le traitement par NH₂-Galf pourrait être favorable à la mise en place d'une réponse efficace par les macrophages lors de l'infection et favoriser le chimiotactisme des monocytes.

Au cours de l'analyse transcriptomique globale, mais également lors de l'analyse de résultats de qPCR, le niveau de variation d'expression génique observé pour les macrophages non infectés était plus faible que celui observé pour les macrophages infectés, laissant penser que les répercussions générales de l'utilisation de ces dérivés *in vivo* ne seront pas trop importantes, ce qui était attendu pour ces dérivés glyqués absents des membranes de mammifère. En revanche, à côté d'un effet immunomodulateur modeste pour les macrophages non infectés, l'analyse transcriptomique a mis en évidence, de façon significative, des modifications de gènes associés au métabolisme de la membrane plasmique, qui n'étaient pas attendues, et dont l'effet reste à explorer.

Chez les macrophages infectés et traités, d'autres clusters de gènes sont modifiés:

Le cluster 2, de gènes réprimés après traitement par NH₂-Galf, contient un groupe de gènes codant pour un réseau protéique impliqué dans la signalisation cytokines-chimiokines. Mais les cytokines et chimiokines qui apparaissent dans ce réseau sont plutôt

impliquées dans la **migration des lymphocytes B (CXCL13)** ou des **lymphocytes T mémoires dans le derme (CCL27)**, et associées à des facteurs de transcription orientant vers une polarisation M2 des macrophages et une expression des récepteurs du CMH I (IRF4) (262). Cependant, ce réseau protéique, comme pour le cluster 1 (macrophages non infectés), contient également des protéines impliquées dans une réponse M1, en particulier IL-12RB, qui est le récepteur de l'IL-12 responsable de l'activation de la voie JAK2/STAT4. De même dans ce réseau protéique apparaît l'IL-3 (ou GM-CSF), or ce facteur de croissance stimule la différenciation des monocytes en macrophages M1 ayant les meilleures capacités microbicides. Ceci est en désaccord avec les résultats de cytométrie, qui montrent suite au traitement par Galfs, une orientation plutôt M1 des macrophages qui expriment plus de CD80 et moins de CD163, témoignant d'une répression de la polarisation M2.

Les clusters, 5, 5' et 6 regroupent des gènes surexprimés après traitement par Galf-oct, NH2-Galf ou les 2. Parmi ces protéines, se trouvent des chimiokines responsables de **l'attraction des lymphocytes T, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CCL8 et CCL13** (262). CXCL9 et CXCL11 sont particulièrement importantes dans une réponse efficace contre les leishmanies car elles sont chimio-attractantes pour les lymphocytes T activés. Toutefois, Murray *et al.* ont montré que la guérison, après une infection par *L. donovani*, était possible pour des souris déficientes en CXCL9 (ou en CXCL10) (263). L'attraction des PNN est également nécessaire à la mise en place d'une réponse anti-leishmanie efficace (224) et les réseaux protéiques des clusters 5 à 6 contiennent également des **chimio-attractants des PNN**, comme **CXCL5 et l'IL-8**, qui en plus d'attirer les PNN sur le site de l'infection, sont fortement impliquées dans leur activation pour aboutir à une réponse microbicide efficace (262). Enfin, **l'attraction des monocytes**, qui sont d'une part une cible, mais d'autre part, une cellule effectrice de la réponse anti-leishmanie, fait **intervenir MCP-1, CXCL10, CXCL12, CCL7, CCL8 et CCL13**, qui sont surexprimées dans nos réseaux protéiques. La forme active de CCL8, MCP-2, perd ses capacités attractives envers les monocytes et inhibe la chimio-attraction de ces derniers par CCL7 (262) : des **phénomènes régulateurs** sont donc également retrouvés dans les réseaux protéiques.

L'IL-6 et l'IL-2RA sont également présents dans le réseau protéique du cluster 5. L'IL-2RA permet la connexion entre l'IL-2 et le TGF- β aboutissant à un contexte plutôt régulateur, mais aussi à une prolifération des lymphocytes Th17 (262). De même l'IL-6 favorise la **différenciation des lymphocytes Th17**, mais également des lymphocytes B pouvant aboutir à une réponse immune tolérogène (264).

Au total, chez les macrophages infectés et traités, les principaux clusters de gènes modifiés impliquent de nouveau les voies de chimiotactisme et d'attraction de cellules effectrices, avec une réponse régulatrice qui pourrait contrebalancer une réponse inflammatoire trop importante.

A côté de ces marqueurs tolérogènes, les réseaux protéiques contiennent également des **effecteurs reconnus de la réponse anti-leishmanie, comme le TNF- α ou MyD88**. Le **TNF- α** est produit de façon autocrine par les macrophages stimulant ainsi la production de ROS et de RNS nécessaires à l'activité parasiticide des macrophages infectés (264). Chiodo *et al.* ont montré une production concomitante de TNF- α et d'IL-6 dans un modèle de DC stimulées avec des particules d'or coatées par du galactofuranose suite à la reconnaissance du Galf par DC-SIGN. Notre analyse transcriptomique retrouve ce même profil pour des

macrophages traités par dérivés du Galf. MyD88 (présente dans le réseau) est activée en réponse à la stimulation des macrophages par l'IL-1 β (présente également) ou via les TLR3, TLR4, TLR6 et TLR7 (**TLR3 et TLR7** sont surexprimés dans notre réseau) (262). L'action intracellulaire de MyD88 se fait ensuite via IRAK, IRF1, IRF7 et TRAF6 (TRAF6 est retrouvé dans nos réseaux). TRAF6 agit par activation de NF- κ B et aboutit entre autres à la l'expression de l'IL-8 (262).

L'exploration des voies de **signalisations via les TLR** est importante. Etonnamment, nos résultats n'ont pas mis en évidence de variation de l'expression de TLR4, ni de son corécepteur CD14. Pour CD14, la CMF montre même une diminution de la présence du corécepteur à la surface des macrophages après traitement par le Galf-oct, à expression stable, le corécepteur doit donc subir une répression lors de la régulation post-transcriptionnelle limitant probablement l'entrée via TLR4. Cette observation peut être liée au choix de l'espèce *L. donovani*, qui favorise une entrée dans les macrophages via TLR2 (114) avec un effet immunotolérant qui pourrait être amplifié par le traitement par les Galf qui répriment le corécepteur de TLR4.

En dehors de TLR2 et TLR4 d'autres récepteurs macrophagiques sont spécialisés dans la reconnaissance de motifs retrouvés dans les glycoconjugués de *Leishmania*. Ils font partie de la famille des **récepteurs lectine de type C, tel que Dectin-1, MRC-1 et DC-SIGN**. Nos résultats montrent une augmentation de l'expression de MRC-1 et de Dectin-1, sauf dans les macrophages M0 infectés (Tableau 9). Quant à DC-SIGN, aucune variation de son expression en surface des macrophages, n'a été observée en cytométrie (Tableau 8).

Les capacités immunomodulatrices des dérivés du Galf, pressenties par Mac Conville et al., sont donc bien retrouvées dans notre analyse transcriptomique globale, mais nous observons des résultats panachés, en faveur d'une induction des gènes M1 et M2.

Discussion générale

Ce travail s'est intéressé au Galf comme cible thérapeutique dans la leishmaniose. Nous avons tout d'abord pu établir que plusieurs enzymes impliquées dans la biosynthèse du LPG, étaient exprimées chez les promastigotes et les amastigotes de plusieurs espèces de leishmanies, incluant *L. donovani*. Les enzymes intervenant dans la biosynthèse du Galf y sont bien exprimées y compris chez l'amastigote, validant ces enzymes comme cible thérapeutique dans un modèle d'infection à *L. donovani*.

Nous avons ensuite cherché à inhiber les voies de synthèse du galactofuranose en utilisant des analogues synthétiques susceptibles d'interférer avec le substrat naturel pour son site enzymatique. Deux dérivés octyl-galactofuranosidiques, Galf-Oct et NH₂-Galf ont montré in vitro un effet antiparasitaire intéressant sur les promastigotes et les amastigotes de *L. donovani*. L'effet sur les promastigotes était associé à une rigidification de leur membrane et une désorganisation conduisant à une apoptose des parasites. La forte interaction de la chaîne octyl avec la membrane parasitaire pourrait expliquer l'action stabilisante des membranes.

Pour les amastigotes, l'utilisation des analogues fluorescents a permis de montrer que le Galf-oct franchissait la membrane des cellules, mais sans prouver qu'il était capable d'atteindre la membrane des parasites. La diffusion très large des analogues dans le cytoplasme des macrophages sans accumulation au niveau des membranes parasitaires laisse supposer un mode d'action incluant le recours à des voies de signalisation macrophagiques. L'altération des membranes des amastigotes observée en microscopie électronique, n'est probablement pas uniquement due à une action directe des dérivés du Galf, mais serait associée à une activité immunomodulatrice favorable à l'élimination des parasites par les cellules infectées, comme en témoigne l'augmentation des ROS et de la production de NO après traitement par les dérivés du Galf.

Ce mode d'action combiné a été évoqué pour un autre antiparasitaire, la miltéfosine, connue pour son activité antiparasitaire grâce à son effet rigidifiant de membrane, pourrait également favoriser l'élimination des parasites intracellulaires par augmentation de la production de ROS et de RNS (62). Ces deux modes d'action antiparasitaire ont été retrouvés pour le traitement par les dérivés du Galf.

L'augmentation des effecteurs microbicides des macrophages (ROS et RNS) est un marqueur de polarisation de type M1. Nous nous sommes donc penchés sur l'effet des dérivés du Galf sur la polarisation des macrophages infectés d'une part, mais aussi non infectés. En effet même si la cible du traitement est la cellule infectée, l'activation des macrophages non infectés contribue à la production des cytokines pro-inflammatoires et donc au contrôle de l'infection. L'effet observé sur les macrophages non infectés pourrait également prédire les éventuels effets secondaires des molécules. L'analyse transcriptomique a montré que les dérivés du Galf favorisaient le chimiotactisme des monocytes, permettant le recrutement de cellules sur le site de l'infection.

En revanche, pour les macrophages non infectés, l'analyse transcriptomique a également mis en évidence, de façon significative, des modifications de gènes associés au métabolisme de la membrane plasmique qui n'étaient pas attendues. Notre analyse en

RMN-STDD avait montré une interaction importante de la chaîne octyle du Galf-oct et de NH₂-Galf avec la membrane des parasites au stade promastigote. Cette interaction, non spécifique du motif glyqué, existe probablement avec les membranes des macrophages en culture, bien qu'aucun effet cytotoxique n'ait été constaté (CC₅₀ > 800 µM *versus* miltéfosine < 150 µM). La caractérisation du « trafficking » cellulaire du Galf-oct à l'aide des dérivés furanosidiques fluorescents n'a cependant pas montré d'accumulation au niveau de la membrane des macrophages.

Le traitement des macrophages infectés par les dérivés du Galf a montré majoritairement l'induction de cytokines et marqueurs pro-inflammatoires M1 (TNF-α, IL-12, IL-1β, IL-6, MCP-1, CXCL10), tout en induisant également certains marqueurs tolérogènes de type M2 (IL-10, MRC-1). Les voies de signalisation associées à certaines cytokines M1, dont l'IL-1β, passent par un effecteur que nous trouvons également induit, MyD88. L'activation de MyD88 via l'IL-1β permet l'activation de l'IRF1, qui active à son tour la production d'IFN-γ, d'IL-12 et l'induction d'iNOS (256). Lima-Junior *et al.* montrent à l'aide de souris déficientes en Nlrp3, qu'en aval de l'activation de MyD88, l'inflammasome Nlrp3 est responsable de la production de l'IL-1β et Lefèvre *et al.* confirment cette implication de l'inflammasome dont l'activité est augmentée lors de la reconnaissance de *L. infantum* via Dectin-1 ou MRC-1. Flandin *et al.*, quant à eux, montrent que la production de NO et d'IL-12 se fait via IRF1, mais suite à l'activation de MyD88 par TLR3 dans un modèle d'infection par *L. donovani* (114).

Les TLR3 et 7 sont retrouvés dans le cluster 5' (infectés) surexprimés dans notre analyse transcriptomique, or ces TLR sont responsables de la reconnaissance des virus à ARN. Cependant, la présence du *Leishmania* RNA virus (LRV) dans des souches de *L. donovani* n'a pas encore été démontrée. Le LRV est un virus à ARN double brin et seul le TLR3 est impliqué dans la reconnaissance de ce type d'ARN viral. Ives *et al.* ont en effet montré que des promastigotes de *L. guyanensis* porteurs de ce virus étaient principalement reconnus via TLR3(265). La signification de sa surexpression dans notre modèle reste à préciser.

En dehors des TLR, d'autres récepteurs macrophagiques sont spécialisés dans la reconnaissance de motifs retrouvés dans les glycoconjugués de *Leishmania*. Ils font partie de la famille des **récepteurs lectine de type C, tel que Dectin-1, MRC-1 et DC-SIGN**. **Dectin-1** reconnaît le motif β 1-3 glucane qui est présent dans le cœur hexasaccharidique du LPG (entre le mannose et le Galf), mais également dans les GIPLs de *L. major* ou *L. mexicana*. Ce motif est ubiquitaire dans les parois fongiques et Liu *et al.* ont montré que la signalisation via Dectin-1 permettait une réversion de la polarisation alternative des macrophages vers une polarisation M1 par la voie de signalisation Card-9-ERK (266). Dans un modèle de macrophages péritonéaux de souris dans lesquels les récepteurs lectine sont bloqués par des ARN interférents, Lefèvre *et al.* ont pu confirmer cet effet de Dectin-1 dans le cadre de la leishmaniose à *L. infantum*. Ainsi, la production d'IL-1β et l'assemblage de la NADPH oxydase sont fortement inhibés en l'absence de Dectin-1, mais également en l'absence de MRC-1. Au total, l'induction de dectin-1 et MRC-1 observée dans ce travail serait associée à un meilleur contrôle de l'infection par production de ROS. DC-SIGN quant à lui serait plutôt responsable d'une chronicisation de l'infection par inhibition du leucotriène LT4B entraînant une diminution de l'IL-1β et une polarisation M2b des macrophages, associée à la production d'IL-10 (111). Dans notre modèle, nous avons constaté une augmentation de l'expression de MRC-1 par le Galf-oct, et une légère augmentation de Dectin-1 par le NH₂-

Galf, étonnamment associée à une induction accrue d'IL-10, rapportée dans la littérature comme étant liée à une chronicisation de l'infection à *L. infantum* (111) et *L. mexicana* (178). Néanmoins in vitro, le traitement par les Galfs était associé à un contrôle efficace de la réplication des amastigotes. Ces différences illustrent bien la variabilité qu'il peut exister entre les espèces *L. infantum* et *L. donovani* sur le plan de la réponse immunitaire.

Au total, la production panachée des cytokines et chimiokines évoque **un profil macrophagique mixte entre le profil M1 et le profil M2b, immunorégulateur**. L'induction des récepteurs Dectin-1 et MRC-1 pourrait contribuer à une phagocytose plus efficace des leishmanies par ces macrophages. **Les cytokines Th1 et l'activation d'un profil M1 aboutiraient au contrôle de l'infection.**

Le rôle de l'**IL-10**, cytokine couramment associée à une **polarisation M2b** mérite d'être exploré, car son induction pourrait être en rapport avec le choix de l'espèce *L. donovani*. En effet Alexander *et al.* ont montré que cette espèce était particulièrement capable d'induire cette cytokine Th2 alors que *L. major* ou *L. mexicana* induisaient plutôt l'IL-4 pour orienter la réponse lymphocytaire vers une réponse Th2 (161). Mais, l'association à la présence du TNF- α , peut également faire évoquer le profil macrophagique M2b. En plus du TNF- α et de l'IL-10 nous retrouvons également une expression de Dectin-1 accrue dans la plupart des conditions. L'étude de l'efficacité *in vivo* de ces dérivés permettra de vérifier si ce profil correspond réellement à un profil M2b favorable à la chronicisation de l'infection, ou si **la présence associée d'IL-12, d'IL-1 β et de TNF- α** correspond bien au **profil M1** que nous attendions.

En dehors de l'infection par *Leishmania*, le rôle des macrophages M2b et de l'IL-10 est connu dans les infections chroniques, en particulier dans l'infection par le VHC ou les infections chroniques à *Candida* chez les patients présentant un diabète de type 2 (267). Le profil cytokinique des macrophages M2b correspond à une sécrétion associant le TNF- α et l'IL-10 associée à l'expression du TLR2. La paroi des *Candida* contient un motif β 1-3 glucane reconnu par Dectin-1, qui joue donc un rôle fondamental dans la régulation de la population de *Candida* dans le tube digestif. Dectin-1 assure le contrôle de la prolifération de *Candida* par la production de ROS et le déclenchement de la phagocytose des levures par les macrophages (267,268). Dans le modèle d'infection chronique à *Candida*, Galès *et al.* ont montré que la réversion du profil M2b vers un profil M2a, produisant moins d'IL-10 et de TNF- α était nécessaire au contrôle de l'infection. Cette réversion peut être obtenue grâce à un traitement par l'IL-13 ou par des ligands de PPAR- γ et **passer par l'activation de Dectin-1**, et permet d'activer la production de ROS et la phagocytose des levures. L'utilisation de traitement à visée immunomodulatrice pourrait donc être une option thérapeutique dans la prise en charge de l'infection chronique par *Candida*.

Le concept d'immunostimulation pour éradiquer des infections chroniques est actuellement largement exploré dans le traitement des mycobactérioses et en particulier dans la tuberculose. De façon intéressante, les mycobactéries partagent avec les leishmanies des caractéristiques de paroi, en particulier la présence d'un motif Galf. Dans le traitement de la tuberculose, l'association des antibiotiques à une immunothérapie adjuvante pourrait améliorer la guérison en modulant la réponse immunitaire, souvent aussi excessive qu'inefficace. Les corticostéroïdes sont recommandés dans les formes cérébrales depuis de longues années. Mais en dehors des corticoïdes, d'autres molécules

ont plus récemment montré des preuves d'efficacité dans des modèles murins et/ou humains, soit en diminuant l'activité Th2 (269,270), comme les inhibiteurs du TGF- β et de l'IL-4, soit en augmentant la réponse Th1 par apport d'IFN- γ . Enfin, la réaction granulomateuse entourant et protégeant les bacilles, ainsi que la production de cytokines en excès favorisant la persistance de ces granulomes (en particulier en cas de syndrome de restauration immune), peuvent également être les cibles d'un traitement immunomodulateur à visée anti-TNF- α (270,271). A l'heure actuelle, l'utilisation de ces thérapies adjuvantes est proposée en association au traitement antibiotique pour les cas de tuberculoses multi-résistantes, mais pourrait prochainement atteindre un niveau de preuve suffisant pour faire partie intégrante du traitement de première intention afin de réduire la durée du traitement ou le risque d'apparition de résistances. La malnutrition fait partie des facteurs de risque de tuberculose en raison de l'immunosuppression induite par cet état (diminution de l'IFN- γ , de l'IL-1 β , de l'IL-12, de l'IL-6 et du TNF- α et augmentation de l'IL-10, du TGF- β et de l'IL-13 dans le groupe ayant un IMC bas) (272). Comme dans la tuberculose, dans les leishmanioses, les parasites se développent au sein de granulomes et un **traitement immunomodulateur** de type thalidomide (à visée anti-TNF) a montré une certaine amélioration de l'efficacité du Glucantime[®] dans un modèle murin de leishmaniose viscérale (273). Concernant nos dérivés du Galf ils se situeraient plutôt dans la **catégorie « pro-Th1 »** et pourraient ainsi être utilisés en association avec d'autres traitements antiparasitaires à visée **d'immunothérapie adjuvante**. De plus les populations les plus touchées par la leishmaniose viscérale (péninsule indienne, Afrique de l'Est), sont également sujettes à la malnutrition, l'effet observé *in-vitro* sur macrophages, en faveur d'une augmentation de l'IL-1 β , de l'IL-12 et du TNF- α , pourrait donc contre balancer les effets de la malnutrition.

La survenue du syndrome PKDL même après un traitement bien conduit de leishmaniose viscérale à *L. donovani*, est encore mal comprise, mais pourrait également relever d'une immunothérapie. Les lésions cutanées survenant dans les mois (Soudan) ou les deux années (Inde) suivant le traitement sont associées à des taux élevés d'IL-10 circulante, à une polarisation M2 des macrophages et à une réponse inflammatoire granulomateuse excessive au niveau cutané (stimulation de la production de vitamine D dans les zones exposées au soleil aboutissant à un excès de TNF- α) (274). Il y a persistance du parasite dans ces lésions cutanées, alors que les signes cliniques de leishmaniose viscérale ont régressé, les patients présentant cette complication sont donc des réservoirs du parasite favorisant la transmission. Sur le plan de la physiopathologie, cette réaction granulomateuse excessive avec excès du TNF- α , pourrait relever, comme dans la tuberculose avec syndrome de restauration immune, d'une immunothérapie adjuvante mais actuellement aucune immunothérapie n'a fait la preuve de son efficacité (273). Cependant, dans cette indication, les traitements antiparasitaires à privilégier sont les dérivés antimoniés ou la miltéfosine au long cours, qui sont les traitements antiparasitaires ayant une activité immunomodulatrice (274).

Enfin, un autre problème est la persistance du parasite dans des cellules sanctuaires qui pourraient être les hépatocytes (32) ou les cellules étoilées (275), selon des mécanismes restant à élucider. Ces parasites persistants sont à l'origine de rechutes chez les patients immunodéprimés et nécessitent une prophylaxie secondaire tant que persiste l'immunosuppression (77). Là encore, des perspectives d'immunothérapie adjuvante pourraient peut-être contribuer à une éradication définitive des parasites.

En conclusion ce travail a montré un effet certain des Gal β sur la paroi des promastigotes. Nous n'avons pas pu prouver que la dégradation des parois des amastigotes était directement imputable à un effet inhibiteur du Gal β sur la membrane, mais nous avons mis en évidence un effet immunomodulateur pouvant expliquer une dégradation des amastigotes via une production accrue de ROS et de RNS associée à une polarisation des macrophages intermédiaire entre M1 et M2b.

Conclusion

La leishmaniose est une maladie tropicale négligée pour laquelle l'arsenal thérapeutique est actuellement limité, pour certaines molécules par l'apparition de résistance, et pour d'autres par un coût ne permettant par leur utilisation en zone d'endémie.

L'étude de la réponse immune dans cette pathologie fait l'objet d'une littérature abondante depuis de nombreuses années. Après de nombreuses études de par le monde sur la polarisation des lymphocytes Th1/Th2, les macrophages, cellules cibles des leishmanies, ont fait plus récemment l'objet d'analyses détaillées. Les macrophages sont désormais classés selon un spectre encore plus large avec une polarisation M1/M2 et au moins 3 catégories de macrophages M2. L'infection des macrophages par *L. donovani* est suivie d'une répression de gènes associés à une réponse Th1. Cette interférence avec les capacités de défense des macrophages est en partie liée au LPG recouvrant les promastigotes.

Le motif galactofuranose, présent dans le LPG et les GIPLs de certaines espèces de leishmanies (*L. major* ou *L. mexicana*), mais absent des membranes des mammifères est apparu comme une cible thérapeutique d'intérêt. Le LPG recouvre essentiellement les promastigotes, tandis que les amastigotes sont quant à eux recouverts essentiellement de GIPLs. Même si la présence du LPG a été débattue chez les amastigotes, aujourd'hui il est démontré qu'il est présent, bien qu'en faible quantité, dans toutes les espèces, hormis les espèces du complexe *mexicana*. Nous avons montré que les différents gènes des galactofuranosyltransférases intervenant dans les voies de synthèse, étaient exprimés chez l'amastigote et le promastigote de *L. major*, *L. donovani* et *L. braziliensis*, laissant envisager des perspectives de développement d'inhibiteurs à visée thérapeutique couvrant les différents spectres des leishmanioses : cutanée, cutanéomuqueuse et viscérale.

Certains analogues octyl-galactofuranosidiques, que nous avons étudiés ont montré une efficacité antiparasitaire par désorganisation de la membrane des parasites aboutissant à leur apoptose. Sur les amastigotes, les Galfs ont également un effet antiparasitaire, proche de celui obtenu avec le traitement de référence (HePC) et nous avons pu montrer que cet effet était associé à une stimulation de la production d'effecteurs anti-leishmaniens, ROS et RNS.

Une capacité immunomodulatrice des dérivés du Galf était pressentie par Mac Conville *et al.* Et en effet, nous montrons, chez les macrophages infectés puis traités, une production accrue des cytokines Th1, IL-12, IL-1 β et TNF- α mais également une production accrue de l'IL-10 qui est une cytokine Th2. Cette production panachée évoque un profil macrophagique mixte entre le profil M1 et le profil M2b, immunorégulateur.

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette thèse ouvre plusieurs perspectives de recherche :

- La caractérisation plus fine du trafficking des dérivés furanosidiques et de leur interaction avec la membrane macrophagique (Travaux en cours dans l'équipe).

- L'évaluation de l'effet antiparasitaire du Galf-oct dans un modèle *in vivo*. Les dérivés fluorescents contenant de la rhodamine étant détectables par l'imagerie du petit animal, ils laissent envisager l'évaluation de la diffusion dans les différents organes du Galf-oct marqué. Nos collaborateurs de l'ENSCR ont également mis au point une formulation liposomale de Galf-oct. Celle-ci est particulièrement intéressante dans la leishmaniose, car les formulations lipidiques sont prises en charge par les macrophages qui sont également la cellule cible de l'infection et donc du traitement. Nous avons donc repris le concept de l'amphotéricine B liposomale qui est actuellement le traitement de référence de la leishmaniose viscérale. Ainsi, le Galf-oct nu et sa forme liposomale sont actuellement testés sur modèle murin dans notre équipe. La caractérisation de la réponse immune des souris pourra également permettre de valider les effets immunomodulateurs observés *in vitro*.

Annexes

Annexe 1 : Liste des amorces utilisées pour amplifier les 5 enzymes impliquées dans l'intégration du Galf au LPG et l'actine comme gène de référence

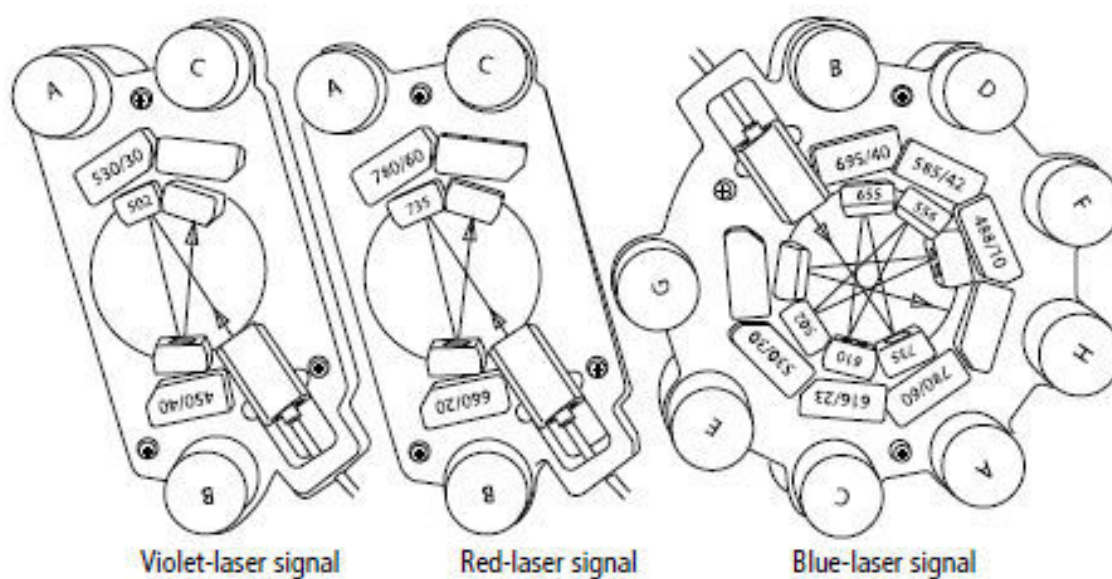
Enzyme	Espèce	Sens	5' séquence 3'
LPG1	<i>L. major, L. donovani</i>	Forward	TATCGTATTTCGGACCATGCC
	<i>L. braziliensis</i>	Forward	ATCATACACCACCCGGAGAA
	<i>L. major</i>	Reverse	GACAGCGCAAATGT <u>A</u> GCCAT
	<i>L. donovani</i>	Reverse	GACAGCGCAAATGT <u>G</u> GCCAT
	<i>L. braziliensis</i>	Reverse	CAAATTCTGTGATCAGGCC
LPG1-L	<i>L. major, L. donovani</i>	Forward	TGGAGTCCATGACGGAAGCT
	<i>L. braziliensis</i>	Forward	GCGTGACATCTGTGTGTCT
	<i>L. major</i>	Reverse	GTTGGTCA <u>G</u> CCGGTTCCTAT
	<i>L. donovani</i>	Reverse	GTTGGTCA <u>A</u> CCGGTTCCTAT
	<i>L. braziliensis</i>	Reverse	GAAGAGTCCCAGCAGAAGGC
LPG1-R	<i>L. major, L. donovani, L. braziliensis</i>	Forward	TACGGGTGGAACGTATGCTT
	<i>L. major, L. donovani, L. braziliensis</i>	Reverse	CACATCCAACGGAACAATGA
LPG1-G	<i>L. major, L. donovani</i>	Forward	ACAAGCTCAAGTACGGTCCG
	<i>L. braziliensis</i>	Forward	CTCGTCATTGCTGCATACCA
	<i>L. major, L. donovani</i>	Reverse	CATCCTCATCAAGCACCCAT
	<i>L. braziliensis</i>	Reverse	GCGAATCGTTGTGAATTGCT
	BfrA	<i>L. major, L. donovani</i>	Forward
<i>L. braziliensis</i>		Forward	TTCTCTTCACCACGCAGGAC
<i>L. major, L. donovani</i>		Reverse	AAGGATCTGAGCATCGCTGT
<i>L. braziliensis</i>		Reverse	CCTGGTGATTTCCGATCGTA
Actine	<i>L. major, L. donovani</i>	Forward	CGATAAAGCCGAAGGTGGTT
	<i>L. braziliensis</i>	Forward	ATCAAACCAAAGGTGGTTGC
	<i>L. major, L. donovani, L. braziliensis</i>	Reverse	CCAGACTCGTCTACTCGCT

Bases soulignées : Unique base différente entre les séquences d'amorces des espèces *L. major* et *L. donovani* pour une même enzyme

Annexe 2: Configuration du FACS Aria II et exemples de fluorochromes détectables dans cette configuration

Laser/excitation (nm)	Exemple de Fluorochromes	Filtres de détection
Violet / 405 nm	Alexa 405, Pacific Blue	450/30
	LIVE/DEAD™ fixable yellow stain, Pacific orange	530/30
	SSC, FSC	488/10
Bleu / 488 nm	AF 488, FITC	530/30
	PE	585/42
	IP	616/23
	PerCP-Cy5.5, PE-Cy5, Per CP-eFluor 710	695/40
	PE-Cy7	780/60
Rouge / 633 nm	AF 647, APC	660/20
	APC-Cy7	780/60

SSC : Side scager ; FSC : Forward scager ; AF : Alexa fluor ; FITC : Isothianate de fluorescéine, PE : Phycoérythrine, IP : Iodure de propidium, Per CP : Périidine Chlorophylle Protéine ; Cy 5, Cy 5.5 et Cy 7 : Cyanine 5, 5.5 et 7 ; APC : Allophycocyanine



Annexe 3 : Représentation schématique des 3 systèmes de détection du FACS Aria II Becton Dickinson (Schéma disponible dans le guide de l'utilisateur du FACS Aria)

Annexe 4 : Configuration du FC 500 et exemples de fluorochromes détectables dans cette configuration

Laser/excitation (nm)	Exemple de Fluorochromes	Filtres de détection
Bleu / 488 nm	AF 488, FITC	525/40
	PE	575/40
	IP	620/20
	PerCP-Cy5.5, PE-Cy5	675/40
	PE-Cy7	755/40
Rouge / 633 nm	AF 647, APC	675/40
	APC-Cy7	755/40

AF : Alexa fluor ; FITC : Isothianate de fluorescéine ; PE : Phycoérythrine ; IP : Iodure de propidium ; Per CP : Périidine Chlorophylle Protéine ; Cy 5, Cy 5.5 et Cy 7 : Cyanine 5, 5.5 et 7 ; APC : Allophycocyanine

Bibliographie

1. Ross R. Further notes on leishman's bodies. *Br Med J.* 1903 Nov 28;2(2239):1401.
2. Ul Bari U. Chronology of cutaneous leishmaniasis: An overview of the history of the disease. *J Pakist Assoc Dermatol.* 2006;16:24–27.
3. Cunningham DD. On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue of a specimen of Delhi boil. *Sci Mem Med Ic Army India.* 1885;1:21–31.
4. Leishman WB. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Br Med J.* 1903;i:1252–4.
5. Donovan C. The etiology of the heterogeneous fevers in India. *Br Med J.* ii(1401).
6. WHO_TRS_949_eng.pdf [Internet]. [cited 2016 Oct 18]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf
7. OMS | Leishmaniose [Internet]. WHO. [cited 2016 Oct 4]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/fr/>
8. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Mar 3;10(3):e0004349.
9. Espinosa OA, Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MMG, Shaw JJ. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology.* 2016 Dec;1–13.
10. Dedet J-P, Pratlong F, Lanotte G, Ravel C. The parasite. *Clin Dermatol.* 1999 May 1;17(3):261–8.
11. Prevention C-C for DC and. CDC - Leishmaniasis - Biology [Internet]. [cited 2016 Oct 5]. Available from: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>
12. WHO Weekly epidemiological record No 22, 2016, 91, 285-296 [Internet]. [cited 2016 Oct 4]. Available from: <http://www.who.int/wer/2016/wer9122.pdf?ua=1>
13. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE.* 2012;7(5).
14. Leishmaniasis_2013_VL.png (Image PNG, 3508 × 2477 pixels) - Redimensionnée (34%) [Internet]. [cited 2016 Oct 18]. Available from: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_VL.png
15. Gangneux J-P, Belaz S, Robert-Gangneux F. Mise au point et actualités sur la leishmaniose viscérale méditerranéenne. *J Anti-Infect.* 2015 Mar;17(1):25–8.
16. Pratlong F, Dedet JP, Marty P, Portús M, Deniau M, Dereure J, *et al.* *Leishmania*-Human Immunodeficiency Virus Coinfection in the Mediterranean Basin: Isoenzymatic

- Characterization of 100 Isolates of the *Leishmania infantum* Complex. J Infect Dis. 1995 Jul 1;172(1):323–6.
17. Marty P, Pratlong F, Marcelet B, Adda A, Le Fichoux Y. *Leishmania infantum* variant MON-24 isolé d'une lésion cutanée contractée dans la banlieue de Nice (France). Parasite. 1994 Jun;1(2):175–6.
 18. Leishmaniasis_2013_CL.png (Image PNG, 3508 × 2477 pixels) - Redimensionnée (34%) [Internet]. [cited 2016 Oct 18]. Available from: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_CL.png
 19. Sacks DL. *Leishmania*–sand fly interactions controlling species-specific vector competence. Cell Microbiol. 2001 Apr 1;3(4):189–96.
 20. Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, *et al.* A role for insect galectins in parasite survival. Cell. 2004 Oct 29;119(3):329–41.
 21. Sacks D, Kamhawi S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. Annu Rev Microbiol. 2001;55(1):453–83.
 22. Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. Int J Parasitol. 2003 Sep 1;33(10):1027–34.
 23. Peters NC, Sacks DL. The impact of vector mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. Cell Microbiol. 2009 Sep;11(9):1290–6.
 24. Tacchini-Cottier F, Zweifel C, Belkaid Y, Mukankundiye C, Vasei M, Launois P, *et al.* An Immunomodulatory Function for Neutrophils During the Induction of a CD4+ Th2 Response in BALB/c Mice Infected with *Leishmania major*. J Immunol. 2000 Sep 1;165(5):2628–36.
 25. Real F, Pouchelet M, Rabinovitch M. *Leishmania (L.) amazonensis*: Fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone-marrow derived mouse macrophages. Exp Parasitol. 2008 May;119(1):15–23.
 26. Courret N, Fréhel C, Gouhier N, Pouchelet M, Prina E, Roux P, *et al.* Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. J Cell Sci. 2002 Jun 1;115(Pt 11):2303–16.
 27. Hartley M-A, Drexler S, Ronet C, Beverley SM, Fasel N. The immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic leishmaniasis. Trends Parasitol. 2014 Aug 1;30(8):412–22.
 28. Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RP, Magalhães A, *et al.* Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. Parasite Immunol. 2007 May 1;29(5):251–8.

29. Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J, Schriefer A, Machado PRL, Lessa H, *et al.* Decreased In Situ Expression of Interleukin-10 Receptor Is Correlated with the Exacerbated Inflammatory and Cytotoxic Responses Observed in Mucosal Leishmaniasis. *Infect Immun.* 2005 Dec;73(12):7853–9.
30. Bogdan C, Gessner A, Werner S, Martin R. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol.* 1996 Aug;8(4):517–25.
31. Bogdan C, Donhauser N, Döring R, Röllinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med.* 2000 Jun 19;191(12):2121–30.
32. Gangneux J-P, Lemenand O, Reinhard Y, Guiguen C, Guguen-Guillouzo C, Gripon P. *In Vitro* and *Ex Vivo* Permissivity of Hepatocytes for *Leishmania donovani*. *J Eukaryot Microbiol.* 2005 Nov 1;52(6):489–91.
33. Yebra M. Disseminated-to-Skin Kala-azar and the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Ann Intern Med.* 1988 Mar 1;108(3):490.
34. Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003 Oct 2;97(sup1):3–15.
35. Carré N, Collot M, Guillard P, Horellou M, Gangneux J-P. La leishmaniose viscérale. *J Pharm Clin.* 2010 Jul 1;29(3):121–48.
36. Kausalya S, Malla N, Ganguly NK, Mahajan RC. *Leishmania donovani*: In Vitro Evidence of Hepatocyte Damage by Kupffer Cells and Immigrant Macrophages in a Murine Model. *Exp Parasitol.* 1993 Nov 1;77(3):326–33.
37. HAS. argumentaire_leishmaniose.pdf [Internet]. [cited 2017 Aug 25]. Available from: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-07/dir152/argumentaire_leishmaniose.pdf
38. Riera C, Fisa R, Lopez P, Ribera E, Carrió J, Falcó V, *et al.* Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2004 Dec;23(12):899–904.
39. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol.* 1990 Oct 1;71(3):267–75.
40. Disch J, Pedras MJ, Orsini M, Pirmez C, de Oliveira MC, Castro M, *et al.* *Leishmania (Viannia)* subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005 Mar 1;51(3):185–90.
41. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. *J Clin Microbiol.* 2004 Nov 1;42(11):5249–55.
42. Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Reynes J, Lamothe J, Bastien P. Comparison of Various Sample Preparation Methods for PCR Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Using Peripheral Blood. *J Clin Microbiol.* 2001 Feb 1;39(2):613–7.

43. Van der Auwera G, Maes I, De Doncker S, Ravel C, Cnops L, Van Esbroeck M, *et al.* Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in European tropical infectious disease clinics. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2013 Jul 25;18(30):20543.
44. Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, Doncker SD, Dujardin JC, *et al.* Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology.* 2010 Jul;137(8):1159–68.
45. Murray HW. Mononuclear Cell Recruitment, Granuloma Assembly, and Response to Treatment in Experimental Visceral Leishmaniasis: Intracellular Adhesion Molecule 1-Dependent and -Independent Regulation. *Infect Immun.* 2000 Nov;68(11):6294–9.
46. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jan;19(1):111–26.
47. Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H, Legare D, Sundar S, Ouellette M, *et al.* Drug Uptake and Modulation of Drug Resistance in *Leishmania* by an Aquaglyceroporin. *J Biol Chem.* 2004 Jul 23;279(30):31010–7.
48. Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat.* 2004 Aug;7(4–5):257–66.
49. Ferreira C dos S, Martins PS, Demicheli C, Brochu C, Ouellette M, Frézard F. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med.* 2003 Sep;16(3):441–6.
50. Zhou Y, Messier N, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R. *Leishmania major* LmACR2 Is a Pentavalent Antimony Reductase That Confers Sensitivity to the Drug Pentostam. *J Biol Chem.* 2004 Sep 3;279(36):37445–51.
51. Roberts WL, Rainey PM. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Sep;37(9):1842–6.
52. Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M, Zilberstein D. Novel Intracellular SbV Reducing Activity Correlates with Antimony Susceptibility in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 2001 Feb 9;276(6):3971–6.
53. Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouaisi A, Lemesre JL. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Dec;42(12):3097–102.
54. Gutiérrez V, Seabra AB, Reguera RM, Khandare J, Calderón M. New approaches from nanomedicine for treating leishmaniasis. *Chem Soc Rev.* 2015 Dec 22;45(1):152–68.
55. Lindoso JAL, Cunha MA, Queiroz IT, Moreira CHV. Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. *HIVAIDS Auckl NZ.* 2016 Oct 7;8:147–56.

56. Burza S, Mahajan R, Sinha PK, van Griensven J, Pandey K, Lima MA, *et al.* Visceral Leishmaniasis and HIV Co-infection in Bihar, India: Long-term Effectiveness and Treatment Outcomes with Liposomal Amphotericin B (AmBisome). *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Aug 7;8(8).
57. Mahajan R, Das P, Isaakidis P, Sunyoto T, Sagili KD, Lima MA, *et al.* Combination Treatment for Visceral Leishmaniasis Patients Coinfected with Human Immunodeficiency Virus in India. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2015 Oct 15;61(8):1255–62.
58. IDSA : Leishmaniasis [Internet]. [cited 2017 Mar 27]. Available from: http://www.idsociety.org/Guidelines/Patient_Care/IDSA_Practice_Guidelines/Infections_by_Organism/Parasites/Leishmaniasis/
59. Sindermann H, Croft SL, Engel KR, Bommer W, Eibl HJ, Unger C, *et al.* Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2004 Nov 1;193(4):173–80.
60. Urbina JA. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in *kinetoplastid* parasites. *Parasitology.* 1997;114 Suppl:S91-99.
61. Ruiters GA, Zerp SF, Bartelink H, van Blitterswijk WJ, Verheij M. Anti-cancer alkyllysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer Drugs.* 2003 Feb;14(2):167–73.
62. Murray HW, Delph-Etienne S. Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbicidal mechanisms. *J Infect Dis.* 2000 Feb;181(2):795–9.
63. Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Bachmann P, Karbwang J, Fischer C, *et al.* Miltefosine, an Oral Agent, for the Treatment of Indian Visceral Leishmaniasis. *N Engl J Med.* 1999 Dec 9;341(24):1795–800.
64. Desjeux P. Options thérapeutiques pour la leishmaniose viscérale. *Médecine Mal Infect.* 2005 Jun 1;35:S74–6.
65. Pérez-Victoria FJ, Sánchez-Cañete MP, Seifert K, Croft SL, Sundar S, Castanys S, *et al.* Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist Updat.* 2006 Feb;9(1–2):26–39.
66. Briccaman RA. The Aromatic Diamidines. *Int J Dermatol.* 1977 Apr 1;16(3):155–62.
67. Wang M, Yu Y, Liang C, Lu A, Zhang G. Recent Advances in Developing Small Molecules Targeting Nucleic Acid. *Int J Mol Sci.* 2016 May 30;17(6).
68. Roussel M, Nacher M, Frémont G, Rotureau B, Clyti E, Sainte-Marie D, *et al.* Comparison between one and two injections of pentamidine isethionate, at 7 mg/kg in each injection, in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Ann Trop Med Parasitol.* 2006 Jun;100(4):307–14.

69. Sundar S, Singh A. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. *Ther Adv Infect Dis*. 2016 Jun;3(3–4):98–109.
70. Nassif PW, Mello TFPD, Navasconi TR, Mota CA, Demarchi IG, Aristides SMA, *et al*. Safety and efficacy of current alternatives in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. *Parasitology*. 2017 Jul;144(8):995–1004.
71. Torrús D, Boix V, Massa B, Portilla J, Pérez-Mateo M. Fluconazole plus allopurinol in treatment of visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother*. 1996 May;37(5):1042–3.
72. Jha BB. Fluconazole in visceral leishmaniasis. *Indian Pediatr*. 1998 Mar;35(3):268–9.
73. Gangneux J-P, Dullin M, Sulahian A, Garin YJ-F, Derouin F. Experimental Evaluation of Second-Line Oral Treatments of Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jan;43(1):172–4.
74. Sundar S, Singh VP, Agrawal NK, Gibbs DL, Murray HW. Treatment of kala-azar with oral fluconazole. *The Lancet*. 1996 Aug 31;348(9027):614.
75. Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, Pearson R, Lopez-Velez R, Weina P, *et al*. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clin Infect Dis*. 2016 Dec 15;63(12):e202–64.
76. Blum J, Buffet P, Visser L, Harms G, Bailey MS, Caumes E, *et al*. LeishMan Recommendations for Treatment of Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis in Travelers, 2014. *J Travel Med*. 2014 Mar 1;21(2):116–29.
77. Buffet PA, Rosenthal É, Gangneux J-P, Lightburne E, Couppié P, Morizot G, *et al*. Traitement des leishmanioses en France : proposition d'un référentiel consensuel. *Presse Médicale*. 2011 Feb 1;40(2):173–84.
78. Sukumaran B, Madhubala R. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Curr Mol Med*. 2004 Sep;4(6):667–79.
79. Greenblatt CL. Cutaneous leishmaniasis: The prospects for a killed vaccine. *Parasitol Today Pers Ed*. 1988 Feb;4(2):53–4.
80. Duarte MC, Lage DP, Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Roatt BM, Menezes-Souza D, *et al*. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016 Aug;49(4):398–407.
81. Bourdoiseau G, Hugnet C, Gonçalves RB, Vézilier F, Petit-Didier E, Papierok G, *et al*. Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAP-MDP vaccinated protected dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009 Mar 15;128(1):71–8.
82. Moreno J, Vouldoukis I, Martin V, McGahie D, Cuisinier A-M, Gueguen S. Use of a LiESP/QA-21 vaccine (Canileish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6):e1683.

83. Gradoni L. Canine *Leishmania* vaccines: still a long way to go. *Vet Parasitol.* 2015 Feb 28;208(1–2):94–100.
84. Teixeira CR, Teixeira MJ, Gomes RBB, Santos CS, Andrade BB, Raffaele-Netto I, *et al.* Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2005 Dec 15;175(12):8346–53.
85. Rogers M, Kropf P, Choi B-S, Dillon R, Podinovskaia M, Bates P, *et al.* Proteophosphoglycans Regurgitated by *Leishmania*-Infected Sand Flies Target the L-Arginine Metabolism of Host Macrophages to Promote Parasite Survival. *PLOS Pathog.* 2009 Oct 5;5(8):e1000555.
86. van Zandbergen G, Hermann N, Laufs H, Solbach W, Laskay T. *Leishmania* Promastigotes Release a Granulocyte Chemotactic Factor and Induce Interleukin-8 Release but Inhibit Gamma Interferon-Inducible Protein 10 Production by Neutrophil Granulocytes. *Infect Immun.* 2002 Aug;70(8):4177–84.
87. Hurrell BP, Regli IB, Tacchini-Cottier F. Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. *Trends Parasitol.* 2016 May 1;32(5):392–401.
88. Gabriel C, McMaster WR, Girard D, Descoteaux A. *Leishmania donovani* Promastigotes Evade the Antimicrobial Activity of Neutrophil Extracellular Traps. *J Immunol.* 2010 Oct 1;185(7):4319–27.
89. Ritter U, Frischknecht F, van Zandbergen G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitol.* 2009 Nov 1;25(11):505–10.
90. Ribeiro-Gomes FL, Sacks D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:59.
91. Moll H, Fuchs H, Blank C, Röllinghoff M. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol.* 1993 Jul;23(7):1595–601.
92. Caparrós E, Serrano D, Puig-Kröger A, Riol L, Lasala F, Martinez I, *et al.* Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in *Leishmania* interaction with host phagocytes. *Immunobiology.* 2005;210(2–4):185–93.
93. Colmenares M, Corbí AL, Turco SJ, Rivas L. The Dendritic Cell Receptor DC-SIGN Discriminates among Species and Life Cycle Forms of *Leishmania*. *J Immunol.* 2004 Jan 15;172(2):1186–90.
94. Puentes SM, Dwyer DM, Bates PA, Joiner KA. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1989 Dec 1;143(11):3743–9.
95. Russell DG. The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant C3-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes. *Eur J Biochem.* 1987 Apr 1;164(1):213–21.

96. Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol*. 1995 Sep 15;155(6):3102–11.
97. Ueno N, Bratt CL, Rodriguez NE, Wilson ME. Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum chagasi* promastigotes. *Cell Microbiol*. 2009 Dec;11(12):1827–41.
98. Wozencraft AO, Sayers G, Blackwell JM. Macrophage type 3 complement receptors mediate serum-independent binding of *Leishmania donovani*. Detection of macrophage-derived complement on the parasite surface by immunoelectron microscopy. *J Exp Med*. 1986 Oct 1;164(4):1332–7.
99. Culley FJ, Harris RA, Kaye PM, McAdam KP, Raynes JG. C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1996 Jun 15;156(12):4691–6.
100. Bodman-Smith KB, Mbuchi M, Culley FJ, Bates PA, Raynes JG. C-reactive protein-mediated phagocytosis of *Leishmania donovani* promastigotes does not alter parasite survival or macrophage responses. *Parasite Immunol*. 2002 Sep 1;24(9–10):447–54.
101. Desjardins M. Biogenesis of phagolysosomes: the “kiss and run” hypothesis. *Trends Cell Biol*. 1995 May 1;5(5):183–6.
102. Rosenthal LA, Sutterwala FS, Kehrl ME, Mosser DM. *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infect Immun*. 1996 Jun;64(6):2206–15.
103. Kane MM, Mosser DM. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol*. 2000 Jan;7(1):26–31.
104. Blackwell JM. Role of macrophage complement and lectin-like receptors in binding *Leishmania* parasites to host macrophages. *Immunol Lett*. 1985 Jan 1;11(3):227–32.
105. Wilson ME, Pearson RD. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun*. 1988 Feb;56(2):363–9.
106. Kedzierski L, Montgomery J, Bullen D, Curtis J, Gardiner E, Jimenez-Ruiz A, *et al*. A Leucine-Rich Repeat Motif of *Leishmania* Parasite Surface Antigen 2 Binds to Macrophages through the Complement Receptor 3. *J Immunol*. 2004 Apr 15;172(8):4902–6.
107. Mosser DM, Edelson PJ. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J Immunol*. 1985 Oct 1;135(4):2785–9.

108. Cooper A, Rosen H, Blackwell JM. Monoclonal antibodies that recognize distinct epitopes of the macrophage type three complement receptor differ in their ability to inhibit binding of *Leishmania* promastigotes harvested at different phases of their growth cycle. *Immunology*. 1988 Dec;65(4):511–4.
109. Forestier C-L, Machu C, Loussert C, Pescher P, Späth GF. Imaging Host Cell-*Leishmania* Interaction Dynamics Implicates Parasite Motility, Lysosome Recruitment, and Host Cell Wounding in the Infection Process. *Cell Host Microbe*. 2011 Apr 21;9(4):319–30.
110. Ueno N, Wilson ME. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol*. 2012 Aug;28(8):335–44.
111. Lefèvre L, Lugo-Villarino G, Meunier E, Valentin A, Olgarnier D, Authier H, *et al*. The C-type Lectin Receptors Dectin-1, MR, and SIGNR3 Contribute Both Positively and Negatively to the Macrophage Response to *Leishmania infantum*. *Immunity*. 2013 May 23;38(5):1038–49.
112. Descoteaux A, Turco SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 1999 Oct 8;1455(2):341–52.
113. Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, *et al*. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;130(2):65–74.
114. Flandin J-F, Chano F, Descoteaux A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *Eur J Immunol*. 2006 Feb;36(2):411–20.
115. Nogueira PM, Assis RR, Torrecilhas AC, Saraiva EM, Pessoa NL, Campos MA, *et al*. Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* Strains Display Immunomodulatory Properties via TLR4 and Do Not Affect Sand Fly Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Aug 10;10(8).
116. Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazzi S, *et al*. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun*. 2004 Apr;72(4):1920–8.
117. Srivastava S, Pandey SP, Jha MK, Chandel HS, Saha B. *Leishmania* expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. *Clin Exp Immunol*. 2013;172(3):403–409.
118. Peters C, Aebischer T, Stierhof YD, Fuchs M, Overath P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *J Cell Sci*. 1995 Dec 1;108(12):3715–24.
119. Hsiao C-HC, Ueno N, Shao JQ, Schroeder KR, Moore KC, Donelson JE, *et al*. The effects of macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survival of *Leishmania*. *Microbes Infect*. 2011 Nov;13(12–13):1033–44.

120. Vázquez-Mendoza A, Carrero JC, Rodríguez-Sosa M. Parasitic infections: a role for C-type lectins receptors. *BioMed Res Int.* 2013;2013:456352.
121. Wyler DJ, Sypek JP, McDonald JA. In vitro parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: possible role of fibronectin in parasite attachment. *Infect Immun.* 1985 Aug;49(2):305–11.
122. Rizvi FS, Ouaisi MA, Marty B, Santoro F, Capron A. The major surface protein of *leishmania* promastigotes is a fibronectin-like molecule. *Eur J Immunol.* 1988 Mar 1;18(3):473–6.
123. Pucadyil TJ, Chattopadhyay A. Cholesterol: a potential therapeutic target in *Leishmania* infection? *Trends Parasitol.* 2007 Feb;23(2):49–53.
124. Megha null, London E. Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function. *J Biol Chem.* 2004 Mar 12;279(11):9997–10004.
125. Chakraborty D, Banerjee S, Sen A, Banerjee KK, Das P, Roy S. *Leishmania donovani* affects antigen presentation of macrophage by disrupting lipid rafts. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2005 Sep 1;175(5):3214–24.
126. Majumder S, Dey R, Bhattacharjee S, Rub A, Gupta G, Bhattacharyya Majumdar S, et al. *Leishmania*-Induced Biphasic Ceramide Generation in Macrophages Is Crucial for Uptake and Survival of the Parasite. *J Infect Dis.* 2012 May 15;205(10):1607–16.
127. Guy RA, Belosevic M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infect Immun.* 1993 Apr;61(4):1553–8.
128. Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci.* 1999 Sep 15;112(18):2993–3002.
129. Bosetto MC, Giorgio S. *Leishmania amazonensis*: Multiple receptor–ligand interactions are involved in amastigote infection of human dendritic cells. *Exp Parasitol.* 2007 Jul 1;116(3):306–10.
130. Kulkarni MM, Jones EA, McMaster WR, McGwire BS. Fibronectin Binding and Proteolytic Degradation by *Leishmania* and Effects on Macrophage Activation. *Infect Immun.* 2008 Apr;76(4):1738–47.
131. Suzuki E, Tanaka AK, Toledo MS, Takahashi HK, Straus AH. Role of β -d-Galactofuranose in *Leishmania major* Macrophage Invasion. *Infect Immun.* 2002 Dec;70(12):6592–6.
132. Rodríguez NE, Gaur U, Wilson ME. Role of caveolae in *Leishmania chagasi* phagocytosis and intracellular survival in macrophages. *Cell Microbiol.* 2006 Jul;8(7):1106–20.

133. Verma JK, Rastogi R, Mukhopadhyay A. *Leishmania donovani* resides in modified early endosomes by upregulating Rab5a expression via the downregulation of miR-494. PLoS Pathog. 2017 Jun;13(6):e1006459.
134. Scianimanico S, Desrosiers M, Dermine JF, Méresse S, Descoteaux A, Desjardins M. Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. Cell Microbiol. 1999 Jul;1(1):19–32.
135. Tolson DL, Turco SJ, Pearson TW. Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *Leishmania donovani*. Infect Immun. 1990 Nov;58(11):3500–7.
136. Streit JA, Donelson JE, Agey MW, Wilson ME. Developmental changes in the expression of *Leishmania chagasi* gp63 and heat shock protein in a human macrophage cell line. Infect Immun. 1996 May;64(5):1810–8.
137. Cunningham AC. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. Exp Mol Pathol. 2002 Apr 1;72(2):132–41.
138. Basu MK, Ray M. Macrophage and *Leishmania*: An Unacceptable Coexistence. Crit Rev Microbiol. 2005 Jan 1;31(3):145–54.
139. Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. Immunol Rev. 2000 Feb 1;173(1):17–26.
140. Murray HW. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. J Immunol Baltim Md 1950. 1982 Jul;129(1):351–7.
141. Liew FY, Li Y, Millott S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. J Immunol Baltim Md 1950. 1990 Dec 15;145(12):4306–10.
142. Malherbe L, Filippi C, Julia V, Foucras G, Moro M, Appel H, et al. Selective activation and expansion of high-affinity CD4+ T cells in resistant mice upon infection with *Leishmania major*. Immunity. 2000 Dec;13(6):771–82.
143. Huber M, Timms E, Mak TW, Röllinghoff M, Lohoff M. Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice. Infect Immun. 1998 Aug;66(8):3968–70.
144. S L Reiner, Locksley and RM. The Regulation of Immunity to *Leishmania Major*. Annu Rev Immunol. 1995;13(1):151–77.
145. Markey KA, Gartlan KH, Kuns RD, MacDonald KPA, Hill GR. Imaging the immunological synapse between dendritic cells and T cells. J Immunol Methods. 2015 Aug;423:40–4.
146. Lanzavecchia A, Sallusto F. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. Nat Immunol. 2001 Jun;2(6):487–92.

147. Corry DB, Reiner SL, Linsley PS, Locksley RM. Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1994 Nov 1;153(9):4142–8.
148. Campbell KA, Ovendale PJ, Kennedy MK, Fanslow WC, Reed SG, Maliszewski CR. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. *Immunity*. 1996 Mar;4(3):283–9.
149. Argueta-Donohué J, Carrillo N, Valdés-Reyes L, Zentella A, Aguirre-García M, Becker I, *et al.* *Leishmania mexicana*: Participation of NF- κ B in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG). *Exp Parasitol*. 2008 Sep;120(1):1–9.
150. Passero LFD, Assis RR, da Silva TNF, Nogueira PM, Macedo DH, Pessoa NL, *et al.* Differential modulation of macrophage response elicited by glycoinositolphospholipids and lipophosphoglycan from *Leishmania (Viannia) shawi*. *Parasitol Int*. 2015;64(4):32–5.
151. Scharon-Kersten T, Afonso LC, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1995 May 15;154(10):5320–30.
152. Stamm LM, Satoskar AA, Ghosh SK, David JR, Satoskar AR. STAT-4 mediated IL-12 signaling pathway is critical for the development of protective immunity in cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol*. 1999 Aug;29(8):2524–9.
153. Liese J, Schleicher U, Bogdan C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology*. 2008 May 14;213(3–4):377–87.
154. Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T, Suemoto Y, Okamoto I, Usui M, *et al.* IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1997 Feb 15;158(4):1541–50.
155. Robinson D, Shibuya K, Mui A, Zonin F, Murphy E, Sana T, *et al.* IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity*. 1997 Oct;7(4):571–81.
156. Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, *et al.* IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1998 Oct 1;161(7):3400–7.
157. Conceição-Silva F, Hahne M, Schröter M, Louis J, Tschopp J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. *Eur J Immunol*. 1998 Jan;28(1):237–45.

158. Horta MF, Mendes BP, Roma EH, Noronha FSM, Macêdo JP, Oliveira LS, *et al.* Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Parasitology Research*. 2012.
159. Murray HW, Nathan CF. Macrophage Microbicidal Mechanisms *In Vivo*: Reactive Nitrogen versus Oxygen Intermediates in the Killing of Intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med*. 1999 Feb 15;189(4):741–6.
160. Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, *et al.* Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*. 1995 Jun 1;375(6530):408–11.
161. Alexander J, Bryson K. T helper(h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett*. 2005 Jun 15;99(1):17–23.
162. Chan J, Fujiwara T, Brennan P, McNeil M, Turco SJ, Sibille JC, *et al.* Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Apr;86(7):2453–7.
163. McNeely TB, Turco SJ. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1990 Apr 1;144(7):2745–50.
164. Isnard A, Shio MT, Olivier M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012 May 16;2.
165. Ghosh S, Goswami S, Adhya S. Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. *Biochem J*. 2003 Feb 1;369(Pt 3):447–52.
166. Vannier-Santos MA, Saraiva EM, Martiny A, Neves A, de Souza W. Fibronectin shedding by *Leishmania* may influence the parasite-macrophage interaction. *Eur J Cell Biol*. 1992 Dec;59(2):389–97.
167. Lima-Junior DS, Mineo TWP, Calich VLG, Zamboni DS. Dectin-1 Activation during *Leishmania amazonensis* Phagocytosis Prompts Syk-Dependent Reactive Oxygen Species Production To Trigger Inflammasome Assembly and Restriction of Parasite Replication. *J Immunol*. 2017 Sep 15;199(6):2055–68.
168. Mosser DM, Edelson PJ. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature*. 1987 May 28;327(6120):329–31.
169. Turco SJ. Adversarial relationship between the *leishmania* lipophosphoglycan and protein kinase C of host macrophages. *Parasite Immunol*. 1999 Dec;21(12):597–600.
170. Shio MT, Christian JG, Jung JY, Chang K-P, Olivier M. PKC/ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation Is Attenuated by *Leishmania* Zinc-Metalloprotease during Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(6):e0003868.
171. Lodge R, Diallo TO, Descoteaux A. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol*. 2006 Dec 1;8(12):1922–31.

172. Roy K, Naskar K, Ghosh M, Roy S. Class II MHC/Peptide Interaction in *Leishmania donovani* Infection: Implications in Vaccine Design. *J Immunol*. 2014 Jun 15;192(12):5873–80.
173. Reiner NE, Ng W, Ma T, McMaster WR. Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jun;85(12):4330–4.
174. Fruth U, Solioz N, Louis JA. *Leishmania major* interferes with antigen presentation by infected macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1993 Mar 1;150(5):1857–64.
175. Kima PE, Soong L, Chicharro C, Ruddle NH, McMahon-Pratt D. *Leishmania*-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 1996 Dec;26(12):3163–9.
176. Wenzel UA, Bank E, Florian C, Förster S, Zimara N, Steinacker J, *et al*. *Leishmania major* parasite stage-dependent host cell invasion and immune evasion. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2012 Jan;26(1):29–39.
177. Assis RR, Ibraim IC, Noronha FS, Turco SJ, Soares RP. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: Modulation of Innate Immune System and Variations in Carbohydrate Structure. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 Feb 28;6(2).
178. Buxbaum LU. *Leishmania mexicana* infection induces IgG to parasite surface glycoinositol phospholipids that can induce IL-10 in mice and humans. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(5):e2224.
179. Gallo P, Gonçalves R, Mosser DM. The influence of IgG Density and Macrophage Fc (gamma) Receptor Cross-linking on Phagocytosis and IL-10 Production. *Immunol Lett*. 2010 Oct 30;133(2):70–7.
180. Maglione PJ, Simchoni N, Cunningham-Rundles C. Toll-like receptor signaling in primary immune deficiencies. *Ann N Y Acad Sci*. 2015 Nov;1356(1):1–21.
181. McConville MJ, Schnur LF, Jaffe C, Schneider P. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem J*. 1995;310(Pt 3):807–18.
182. de Assis RR, Ibraim IC, Nogueira PM, Soares RP, Turco SJ. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 2012;1820(9):1354–65.
183. King DL, Chang Y-D, Turco SJ. Cell surface lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*. 1987;24(1):47–53.
184. Pimenta PFP, Saraiva EMB, Sacks DL. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Exp Parasitol*. 1991;72(2):191–204.

185. Cabezas Y, Legentil L, Robert-Gangneux F, Daligault F, Belaz S, Nugier-Chauvin C, *et al.* *Leishmania* cell wall as a potent target for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates. *Org Biomol Chem.* 2015 Aug 21;13(31):8393–404.
186. Zhang K, Barron T, Turco SJ, Beverley SM. The LPG1 gene family of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol.* 2004 Jul;136(1):11–23.
187. Thomas JR, McConville MJ, Thomas-Oates JE, Homans SW, Ferguson MA, Gorin PA, *et al.* Refined structure of the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 1992 Apr 5;267(10):6829–33.
188. McConville MJ, Thomas-Oates JE, Ferguson MA, Homans SW. Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. *J Biol Chem.* 1990;265(32):19611–23.
189. Ilg T, Etges R, Overath P, McConville MJ, Thomas-Oates J, Thomas J, *et al.* Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. *J Biol Chem.* 1992 Apr 5;267(10):6834–40.
190. Soares RPP, Macedo ME, Ropert C, Gontijo NF, Almeida IC, Gazzinelli RT, *et al.* *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Mol Biochem Parasitol.* 2002 May;121(2):213–24.
191. Soares RPP, Cardoso TL, Barron T, Araújo MSS, Pimenta PFP, Turco SJ. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *Int J Parasitol.* 2005 Mar;35(3):245–53.
192. Sacks DL, Pimenta PFP, McConville MJ, Schneider P, Turco SJ. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med.* 1995;181(2):685–97.
193. McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MA, Sacks DL. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J.* 1992 Oct;11(10):3593–600.
194. Soares RPP, Turco SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An Acad Bras Cienc.* 2003 Sep;75(3):301–30.
195. Dillon RJ, Ivens AC, Churcher C, Holroyd N, Quail MA, Rogers ME, *et al.* Analysis of ESTs from *Lutzomyia longipalpis* sand flies and their contribution toward understanding the insect-parasite relationship. *Genomics.* 2006 Dec;88(6):831–40.
196. Ilg T. Lipophosphoglycan of the protozoan parasite *Leishmania*: stage- and species-specific importance for colonization of the sandfly vector, transmission and virulence to mammals. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2001 Nov;190(1–2):13–7.
197. Späth GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(16):9536–41.

198. Winter G, Fuchs M, McConville MJ, Stierhof YD, Overath P. Surface antigens of *Leishmania mexicana* amastigotes: characterization of glycoinositol phospholipids and a macrophage-derived glycosphingolipid. *J Cell Sci.* 1994 Sep 1;107(9):2471–82.
199. McConville MJ, Ferguson MA. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J.* 1993 Sep 1;294(Pt 2):305–24.
200. Wright EP, el Amin ER. *Leishmania* infection: surfaces and immunity. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell.* 1989 Sep;67(9):525–36.
201. Novozhilova NM, Bovin NV. Structure, functions, and biosynthesis of glycoconjugates of *Leishmania* spp. cell surface. *Biochem Biokhimiia.* 2010 Jun;75(6):686–94.
202. Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz E, Kamysz W, Engman DM, McGwire BS. The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Mol Microbiol.* 2006 Dec;62(5):1484–97.
203. Secundino N, Kimblin N, Peters NC, Lawyer P, Capul AA, Beverley SM, *et al.* Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. *Cell Microbiol.* 2010 Jul;12(7):906–18.
204. Peters C, Kawakami M, Kaul M, Ilg T, Overath P, Aebischer T. Secreted proteophosphoglycan of *Leishmania mexicana* amastigotes activates complement by triggering the mannan binding lectin pathway. *Eur J Immunol.* 1997 Oct;27(10):2666–72.
205. Ilg T. Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. *EMBO J.* 2000 May 2;19(9):1953–62.
206. Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K, Shio MT. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect.* 2012 Dec 1;14(15):1377–89.
207. Bates PA, Dwyer DM. Biosynthesis and secretion of acid phosphatase by *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 1987 Dec 1;26(3):289–96.
208. Fernandes ACS, Soares DC, Saraiva EM, Meyer-Fernandes JR, Souto-Pradrón T. Different secreted phosphatase activities in *Leishmania amazonensis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2013 Mar 1;340(2):117–28.
209. Lippert DN, Dwyer DW, Li F, Olafson RW. Phosphoglycosylation of a secreted acid phosphatase from *Leishmania donovani*. *Glycobiology.* 1999 Jun;9(6):627–36.
210. Ilg T, Stierhof YD, Wiese M, McConville MJ, Overath P. Characterization of phosphoglycan-containing secretory products of *Leishmania*. *Parasitology.* 1994;108 Suppl:S63-71.

211. Lovelace JK, Dwyer DM, Gottlieb M. Purification and characterization of the extracellular acid phosphatase of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*. 1986 Sep;20(3):243–51.
212. Lovelace JK, Gottlieb M. Comparison of extracellular acid phosphatases from various isolates of *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg*. 1986 Nov;35(6):1121–8.
213. Ibraim IC, de Assis RR, Pessoa NL, Campos MA, Melo MN, Turco SJ, *et al*. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasit Vectors*. 2013 Mar 7;6:54.
214. Turco SJ, Wilkerson MA, Clawson DR. Expression of an unusual acidic glycoconjugate in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*. 1984;259(6):3883–9.
215. Oppenheimer M, Valenciano AL, Sobrado P. Biosynthesis of Galactofuranose in Kinetoplastids: Novel Therapeutic Targets for Treating Leishmaniasis and Chagas' Disease. *Enzyme Res*. 2011 May 25;2011.
216. Damerow S, Hoppe C, Bandini G, Zarnovican P, Buettner FFR, Ferguson MAJ, *et al*. *Leishmania major* UDP-sugar pyrophosphorylase salvages galactose for glycoconjugate biosynthesis. *Int J Parasitol*. 2015;45(12):783–90.
217. Beverley SM, Owens KL, Showalter M, Griffith CL, Doering TL, Jones VC, *et al*. Eukaryotic UDP-galactopyranose mutase (GLF gene) in microbial and metazoal pathogens. *Eukaryot Cell*. 2005 Jun;4(6):1147–54.
218. McConville MJ, Homans SW, Thomas-Oates JE, Dell A, Bacic A. Structures of the glycoinositolphospholipids from *Leishmania major*. A family of novel galactofuranose-containing glycolipids. *J Biol Chem*. 1990 May 5;265(13):7385–94.
219. Eppe G, Peltier P, Daniellou R, Nugier-Chauvin C, Ferrières V, Vincent SP. Probing UDP-galactopyranose mutase binding pocket: A dramatic effect on substitution of the 6-position of UDP-galactofuranose. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 Feb 1;19(3):814–6.
220. Cavalli A, Lizzi F, Bongarzone S, Belluti F, Piazzini L, Bolognesi ML. Complementary medicinal chemistry-driven strategies toward new antitrypanosomal and antileishmanial lead drug candidates. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010 Feb 1;58(1):51–60.
221. Dureau R, Robert-Gangneux F, Gangneux J-P, Nugier-Chauvin C, Legentil L, Daniellou R, *et al*. Synthetic UDP-furanoses inhibit the growth of the parasite *Leishmania*. *Carbohydr Res*. 2010 Jul 2;345(10):1299–305.
222. Ilgoutz SC, McConville MJ. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int J Parasitol*. 2001 juillet;31(9):899–908.
223. van Grevenynghe J, Rion S, Le Ferrec E, Le Vee M, Amiot L, Fauchet R, *et al*. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Mar 1;170(5):2374–81.

224. Robert-Gangneux F, Drogoul A-S, Rostan O, Piquet-Pellorce C, Cayon J, Lisbonne M, *et al.* Invariant NKT cells drive hepatic cytokinic microenvironment favoring efficient granuloma formation and early control of *Leishmania donovani* infection. PloS One. 2012;7(3):e33413.
225. Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. J Mol Biol. 1993 Dec 5;234(3):779–815.
226. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD. J Comput Chem. 2005 Dec;26(16):1781–802.
227. Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT-BG, *et al.* Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. EMBO J. 2013 May 15;32(10):1478–88.
228. Chauhan JS, Rao A, Raghava GPS. In silico platform for prediction of N-, O- and C-glycosites in eukaryotic protein sequences. PloS One. 2013;8(6):e67008.
229. Späth GF, Epstein L, Leader B, Singer SM, Avila HA, Turco SJ, *et al.* Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. Proc Natl Acad Sci. 2000 Aug 1;97(16):9258–63.
230. Franco LH, Beverley SM, Zamboni DS. Innate Immune Activation and Subversion of Mammalian Functions by *Leishmania* Lipophosphoglycan. J Parasitol Res. 2012;2012.
231. Forestier C-L, Gao Q, Boons G-J. *Leishmania* lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? Front Cell Infect Microbiol. 2015;4.
232. Favila MA, Geraci NS, Jayakumar A, Hickerson S, Mostrom J, Turco SJ, *et al.* Differential Impact of LPG-and PG-Deficient *Leishmania major* Mutants on the Immune Response of Human Dendritic Cells. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(12).
233. Capul AA, Barron T, Dobson DE, Turco SJ, Beverley SM. Two Functionally Divergent UDP-Gal Nucleotide Sugar Transporters Participate in Phosphoglycan Synthesis in *Leishmania major*. J Biol Chem. 2007 May 11;282(19):14006–17.
234. Gaur U, Showalter M, Hickerson S, Dalvi R, Turco SJ, Wilson ME, *et al.* *Leishmania donovani* lacking the Golgi GDP-Man transporter LPG2 exhibit attenuated virulence in mammalian hosts. Exp Parasitol. 2009 Jul;122(3):182–91.
235. Liu D, Kebaier C, Pakpour N, Capul AA, Beverley SM, Scott P, *et al.* *Leishmania major* phosphoglycans influence the host early immune response by modulating dendritic cell functions. Infect Immun. 2009 Aug;77(8):3272–83.
236. Prajapati VK, Sharma S, Rai M, Ostyn B, Salotra P, Vanaerschot M, *et al.* In vitro Susceptibility of *Leishmania donovani* to Miltefosine in Indian Visceral Leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2013 Oct 9;89(4):750–4.

237. Mayer M, Meyer B. Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew Chem Int Ed*. 1999 Jun 14;38(12):1784–8.
238. Guégan J-P, Daniellou R. An Introduction to Drug Discovery by Probing Protein–Substrate Interactions Using Saturation Transfer Difference-Nuclear Magnetic Resonance (STD-NMR). *J Chem Educ*. 2012 Jul 10;89(8):1071–3.
239. Sgherri C, Porta A, Castellano S, Pinzino C, Quartacci MF, Calucci L. Effects of azole treatments on the physical properties of *Candida albicans* plasma membrane: A spin probe EPR study. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 2014 Jan;1838(1, Part B):465–73.
240. Ogura R, Sugiyama M, Sakanashi T, Ninomiya T. ESR Spin-Labeling Method of Determining Membrane Fluidity in Biological Materials. *Kurume Med J*. 1988;35(4):171–82.
241. Harrington JM, Scelsi C, Hartel A, Jones NG, Engstler M, Capewell P, *et al*. Novel African Trypanocidal Agents: Membrane Rigidifying Peptides. *PLoS ONE*. 2012 Sep 7;7(9).
242. Tiunan TS, Ueda-Nakamura T, Alonso A, Nakamura CV. Cell death in amastigote forms of *Leishmania amazonensis* induced by parthenolide. *BMC Microbiol*. 2014 Jun 10;14:152.
243. Amorim MHR, Gil da Costa RM, Lopes C, Bastos MMSM. Sesquiterpene lactones: adverse health effects and toxicity mechanisms. *Crit Rev Toxicol*. 2013 Aug;43(7):559–79.
244. Vaughan RB. The romantic rationalist a study of Elie Metchnikoff. *Med Hist*. 1965 Jul;9(3):201–15.
245. Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009 Jul;9(7):465–79.
246. Pepino MY, Kuda O, Samovski D, Abumrad NA. Structure-Function of CD36 and Importance of Fatty Acid Signal Transduction in Fat Metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2014;34:281–303.
247. Fabrick BO, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology*. 2005;210(2–4):153–60.
248. Hsieh F-L, Turner L, Bolla JR, Robinson CV, Lavstsen T, Higgins MK. The structural basis for CD36 binding by the *malaria* parasite. *Nat Commun*. 2016 Sep 26;7:ncomms12837.
249. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003 Oct 15;552(Pt 2):335–44.
250. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012 Apr;33(7):829–37.

251. Broad A, Jones DEJ, Kirby JA. Toll-like receptor (TLR) response tolerance: a key physiological “damage limitation” effect and an important potential opportunity for therapy. *Curr Med Chem*. 2006;13(21):2487–502.
252. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008 Dec;8(12):958–69.
253. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jan;3(1):23–35.
254. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, *et al*. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014 Jul 17;41(1):14–20.
255. Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol*. 2007 Jan 1;37(1):14–6.
256. Podinovskaia M, Descoteaux A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol*. 2015 Jan 1;10(1):111–29.
257. Moradin N, Descoteaux A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012 Sep 19;2.
258. Lodge R, Descoteaux A. *Leishmania* invasion and phagosome biogenesis. *Subcell Biochem*. 2008;47:174–81.
259. Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol*. 2013 Jan;281(1):51–61.
260. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, *et al*. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques*. 2003 Feb;34(2):374–8.
261. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, *et al*. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan 28;43(Database issue):D447–52.
262. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jan 4;45(D1):D158–69.
263. Murray HW, Luster AD, Zheng H, Ma X. Gamma Interferon-Regulated Chemokines in *Leishmania donovani* Infection in the Liver. *Infect Immun*. 2017 Jan;85(1).
264. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front Immunol*. 2014 Oct 7;5.
265. Ives A, Masina S, Castiglioni P, Prével F, Revaz-Breton M, Hartley M-A, *et al*. MyD88 and TLR9 dependent immune responses mediate resistance to *Leishmania guyanensis* infections, irrespective of *Leishmania* RNA virus burden. *PLoS One*. 2014;9(5):e96766.

266. Liu M, Luo F, Ding C, Albeituni S, Hu X, Ma Y, *et al.* Dectin-1 Activation by a Natural Product β -Glucan Converts Immunosuppressive Macrophages into an M1-like Phenotype. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015 Nov 15;195(10):5055–65.
267. Lefèvre L, Galès A, Olagnier D, Bernad J, Perez L, Burcelin R, *et al.* PPAR γ Ligands Switched High Fat Diet-Induced Macrophage M2b Polarization toward M2a Thereby Improving Intestinal *Candida* Elimination. *PLoS ONE*. 2010 Sep 20;5(9):e12828.
268. Galès A, Conduché A, Bernad J, Lefevre L, Olagnier D, Béraud M, *et al.* PPAR γ controls Dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2010 Jan;6(1):e1000714.
269. Churchyard GJ, Kaplan G, Fallows D, Wallis RS, Onyebujoh P, Rook GA. Advances in Immunotherapy for Tuberculosis Treatment. *Clin Chest Med*. 2009 Dec 1;30(4):769–82.
270. WHO. Report of the expert consultation on immunotherapeutic interventions for tuberculosis Geneva, 29-31 January 2007. 2007;
271. Holland SM. Cytokine therapy of mycobacterial infections. *Adv Intern Med*. 2000;45:431–52.
272. Chandrasekaran P, Saravanan N, Bethunaickan R, Tripathy S. Malnutrition: Modulator of Immune Responses in Tuberculosis. *Front Immunol*. 2017 Oct 18;8.
273. Solgi G, Kariminia A, Abdi K, Darabi M, Ghareghozloo B. Effects of combined therapy with thalidomide and glucantime on leishmaniasis induced by *Leishmania major* in BALB/c mice. *Korean J Parasitol*. 2006 Mar;44(1):55–61.
274. Zijlstra EE. The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). *Parasit Vectors*. 2016 Aug 23;9(1).
275. Rostan O, Robert-Gangneux F, Lambert M, Samson M, Gangneux JP. Human hepatic stellate cells in primary culture are safe targets for *Leishmania donovani*. *Parasitology*. 2013 Apr;140(4):471–81.

THÈSE de l'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Sorya Belaz

Dérivés furanosidiques à visée thérapeutique dans la leishmaniose, caractérisation des effets et du mode d'action**Furanosidic derivatives for therapeutic purposes in leishmaniasis, characterization of effects and mode of action****Résumé**

La leishmaniose est une maladie tropicale négligée pour laquelle l'arsenal thérapeutique actuel est limité. Ce travail de thèse s'est intéressé à rechercher des nouvelles cibles thérapeutiques en ciblant la paroi des leishmanies. Le lipophosphoglycane (LPG), constituant majoritaire de la paroi, présente un motif glucidique particulier, le galactofuranose, qui semble une cible thérapeutique intéressante car il est absent des membranes de mammifères. Les galactofuranosyl-transférases sont impliquées dans le métabolisme de ce furanose, et ce travail a débuté par l'étude de ces enzymes et par la caractérisation d'une mutase, également nécessaire au métabolisme du galactofuranose. Une fois les cibles caractérisées dans les 2 stades du parasite, des analogues du galactofuranose ont été testés quant à leur capacité antiparasitaire sur les formes promastigotes et amastigotes de *Leishmania donovani*. Un composé s'est révélé intéressant et a été plus étudié, le n-octyl-galactofuranose (Galf). Différentes approches ont été utilisées pour caractériser son mode d'action sur les promastigotes et les amastigotes : résonance paramagnétique électronique, microscopie électronique à transmission, cytométrie en flux ou résonance magnétique nucléaire. L'observation d'une activité inductrice du métabolisme oxydatif des macrophages nous a conduits à nous intéresser aux capacités immunomodulatrices de ces analogues galacto-furanosidiques. Ainsi la dernière partie de ce travail est consacrée à l'étude de la polarisation des macrophages par les galactofuranosides, sur un modèle in vitro de macrophages humains. Nous avons pu montrer que le Galf exerçait une activation des macrophages en faveur d'une polarisation de type M1, ce qui pourrait expliquer l'effet limitateur de croissance des amastigotes.

Mots clés : Galactofuranoside, *Leishmania*, invertase, immunomodulation

Abstract

Leishmaniasis is a neglected tropical disease for which the current therapeutic arsenal is limited. This work aimed at finding new therapeutic drugs by targeting the *Leishmania* cell wall. Lipophosphoglycan (LPG) is the major glycoconjugate in promastigotes cell wall, consisting of a hexasaccharide core including a galactofuranose motif. Galactofuranose is absent in mammalian membranes, thus could be a therapeutic target. First, this work studied the galactofuranosyl-transferases involved in the metabolism of this furanose, as well as a mutase, also necessary for the metabolism of galactofuranose. Once targets were identified in the two parasitic stages, galactofuranose derivatives were tested for antileishmanial activity on promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania donovani*. A compound showed interesting results and has been studied further, the n-octyl-galactofuranose (Galf). Different techniques have been used to characterize its mode of action on promastigotes and amastigotes: electron paramagnetic resonance, transmission electron microscopy, nuclear magnetic resonance or flow cytometry. Infected macrophages treated with Galf were able to produce oxygen derivatives species, leading us to look at the immunomodulatory capacity of Galf derivatives. Thus, the last part of this work focused on the study of macrophage polarization by galactofuranosides on an in vitro model of human macrophages. We were able to show that Galf stimulates macrophages towards M1 polarization, which could explain the decreased growth of amastigotes inside macrophage cells.

Key words: Galactofuranoside, *Leishmania*, invertase, immunomodulation