



HAL
open science

Peptides multi-épitopiques d'intérêt vaccinal appliqués aux leishmanioses humaines

Sarra Hamrouni

► **To cite this version:**

Sarra Hamrouni. Peptides multi-épitopiques d'intérêt vaccinal appliqués aux leishmanioses humaines. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier; Université de Carthage (Tunisie), 2019. Français. NNT : 2019MONTT045 . tel-02479499

HAL Id: tel-02479499

<https://theses.hal.science/tel-02479499v1>

Submitted on 14 Feb 2020

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 POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé
Unité de recherche UMR177 INTERTRYP

En partenariat international avec
L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS ET LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BIZERTE

Peptides multi-épitopiques d'intérêt vaccinal, appliqués aux leishmanioses humaines

Présentée par Sarra HAMROUNI
Le 28 Novembre 2019

Sous la direction du Pr. Amel MEDDEB-GARNAOUI
Et du Dr. Jean-Loup LEMESRE

Devant le jury composé de

Pierre MARTY, Pr, CHU de Nice

Sylviane PIED, Dr, Institut Pasteur de Lille

Pierre MARTY, Pr, CHU de Nice

Jean-Loup LEMESRE, Dr, IRD de Montpellier

Amel MEDDEB-GARNAOUI, Pr, Institut Pasteur de Tunis

Président

Rapporteur

Rapporteur

Co-directeur de thèse

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Dédicaces

Je dédie cette thèse

À mes chers parents Salwa et Azaiz, pour l'amour que vous m'avez toujours donné, vos encouragements et toute l'aide que vous m'avez apportée durant mes études.

À mes sœurs Ichraf et Yasmine, vous égayez ma vie, je vous dédie ce travail pour tous les moments de confidences, de complicité et d'entente qui nous unissent.

À ma chère Emna, pour ton beau sourire contagieux, ta bonne humeur, ta présence réconfortante et tout le soutien moral.

À ma chère Soumaya, je me rappellerai toujours de nos journées interminables à l'Agora, tes encouragements, nos moments d'espoir et de désespoir et les soirées Pizza frites.

À ma chère Rym, pour toute ta spontanéité, ton élan chaleureux, ton aide et ton humour. Tu nous manques au labo.

À mes chères Narjess et Amira, pour notre longue et précieuse amitié.

À Peter, pour tout le bonheur que tu m'apportes et l'avenir devant nous.

Remerciements

Ce travail n'aurait probablement jamais été mené à terme sans le soutien d'un grand nombre de personnes que je tiens vivement et très sincèrement à remercier.

Je voudrais tout d'abord exprimer mes plus vifs remerciements et ma reconnaissance à ma directrice de thèse **Pr. Amel Garnaoui**, professeur à l'Institut Pasteur de Tunis. Je vous remercie d'avoir cru en mes capacités, pour le temps et la patience que vous m'avez accordés tout au long de ces années. Je vous suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier durant ce travail de votre grande compétence, de votre rigueur intellectuelle, de votre efficacité et de vos conseils que je n'oublierai jamais.

Je tiens à remercier grandement mon co-directeur de thèse **Dr. Jean-Loup Lemesre**, directeur de recherche à l'IRD de Montpellier. Je vous remercie pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser une partie de mon travail de thèse dans votre laboratoire, merci pour votre gentillesse et vos qualités humaines.

Je tiens à remercier infiniment **Dr. Sylviane Pied**, directrice de recherche à l'Institut Pasteur de Lille qui m'a fait l'honneur de lire et d'évaluer mon manuscrit et de participer à mon jury de thèse. Soyez assurée de mon entière reconnaissance.

Mes sincères remerciements vont aussi au **Pr. Pierre Marty**, Professeur, au centre hospitalier universitaire de Nice, pour l'honneur qu'il m'a fait pour sa participation à mon jury de thèse en qualité de rapporteur de mon travail et pour le temps consacré à la lecture de cette thèse. Soyez assuré de mon entière reconnaissance.

Je tiens à remercier **Dr. Rachel Bras Gonçalves** pour sa collaboration et pour m'avoir donné l'opportunité de travailler avec les peptides candidat vaccin.

Je souhaite notamment remercier **Pr. Karim Aoun** et **Dr. Abedlahmid Kidar** pour avoir assuré le bon déroulement des prélèvements sanguins ainsi que tous les patients de Gafsa et de Kairouan qui ont accepté de collaborer à cette étude.

Je voudrais exprimer mes sincères remerciements et toute ma gratitude à **Rym Chamakh**, **Emna Hannachi** et **Khadija Bahrini** pour leur soutien, leur disponibilité, leur bonne humeur et surtout pour leur amitié.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Nebiha Ben Hssouna**, pour son irremplaçable et inconditionnel soutien.

Mes remerciements s'adressent également au **Pr. Mohamed Mousli** et au **Dr. Thouraya Boussofara**, pour m'avoir permis d'accéder à l'équipement de leur laboratoire.

Je remercie **Mme Monia Ajmi**, pour sa gentillesse et sa bienveillance

Je remercie tous les membres du laboratoire de *Parasitologie Médicale*, Biotechnologies et Biomolécules à l'Institut Pasteur de Tunis en particulier **Wafa Kammoun**, **Cyrine Bou Abid**, **Haifa Bichiou**, **Naserddine Saidi**, **Khouloud Ben Rhouma**, **Amal Chihi**, **Refka Jelassi**, **Marwa Weslati**, **Imen Tayachi** et **Hamza Ben Salah**. Je les remercie tous de former une équipe dynamique et très accueillante. Je remercie également l'ensemble des membres du service LTCII, en particulier **Rym Ouni** et **Dhouha Mezni**.

Je remercie aussi tous les membres de l'unité mixte de recherche INTERTRYP particulièrement **Joana Pissarra**, **Elodie Petitdidier** et **Julie Pagniez**, ainsi que **Christian Barnabé** et **Pierre Pecquart**, pour la sympathie et l'aide qu'ils m'ont témoignées durant mes stages à l'Institut de Recherche pour le développement.

Enfin, j'exprime mes remerciements à tous ceux qui ont contribué à faire de cette aventure une expérience humaine enrichissante.

Table des matières

Introduction	1
Prérequis et état de l'art	3
I. Biologie et épidémiologie des leishmanioses	4
I.1. Agent pathogène: Le parasite <i>Leishmania</i>	4
I.2. Vecteur: Le phlébotome.....	5
I.3. Hôtes et réservoirs.....	6
I.4. Cycle parasitaire.....	6
I.5. Symptomatologie	8
I.5.1. Leishmaniose viscérale	8
I.5.2. Leishmanioses tégumentaires	9
I.5.3. Leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM).....	9
I.6. Répartition géographique des leishmanioses	10
I.6.1. Répartition géographique des leishmanioses dans le monde.....	10
I.6.2. Répartition géographique des leishmanioses en Tunisie	12
I.7. Diagnostic des leishmanioses.....	13
I.8. Traitement des leishmanioses	14
II. Réponses immunitaires dirigées contre le parasite <i>Leishmania</i>	15
II.1. Interactions initiales entre le parasite et les cellules phagocytaires: La réponse immunitaire innée	16
II.2. La réponse immunitaire adaptative au cours des leishmanioses	19
II.2.1. Réponse T CD4+	19
II.2.2. Réponse T CD8+	26
II.2.3. Lymphocytes B et réponse humorale.....	29
II.3. Mécanisme de développement de la résistance et de la mémoire immunitaire contre les leishmanioses	30
II.3.1. Réponse mémoire développée dans le modèle murin.....	30
II.3.2. Réponse mémoire développée chez l'homme.....	32
III. Vaccination contre les leishmanioses.....	33
III.1. Leishmanisation	34
III.2. Vaccins de première génération.....	34
III.2.1. Vaccins à base de parasites vivants atténués	34
III.2.2. Vaccins à base de parasites inactivés ou d'extraits parasitaires totaux	35
III.3. Vaccins de seconde génération	35
III.4. Vaccins à base d'ADN	37
III.5. Vaccins peptidiques	37
III.5.1. Principe de la vaccinologie inverse et la vaccination peptidique	37
III.5.2. Validation de l'immunogénicité des peptides multi-épitopiques conçus par bioinformatique	40
III.5.3. Avantages et inconvénients des vaccins peptidiques.....	40
III.5.4. Adjuvants utilisés dans les vaccins peptidiques.....	41
III.5.5. Sélection des Ags candidats comme source des épitopes.....	42
III.5.6. Vaccins peptidiques épitopiques contre les leishmanioses.....	44
III.5.7. Concepts immunologiques fondamentaux pour la compréhension de la vaccination peptidique.....	49

Matériel et méthodes	57
I. Matériel	58
I.1. Groupes de donneurs.....	58
I.1.1. Donneurs immuns (guéris de LCZ) utilisés pour évaluer l'immunogénicité des peptides.....	58
I.1.2. Donneurs naïfs utilisés pour évaluer l'immunogénicité des peptides.....	59
I.2. Antigènes et peptides multi-épitopiques	59
II. Méthodes	61
II.1. Processus de conception, <i>in silico</i> , des peptides multi-épitopiques.....	61
II.2. Evaluation de l'immunogénicité des peptides multi-épitopique chez des individus guéris d'une leishmaniose cutanée due à <i>L. major</i>	69
II.2.1. Stimulation des PBMC par les pools de peptides et induction de la sécrétion des cytokines.....	69
II.2.2. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	70
II.2.3. CBA (Cytometric Beads Array).....	72
II.2.4. ELISPOT (Enzyme-Linked Immunosorbent SPOT assay)	75
II.2.5. Typage HLA des individus CLm.....	77
II.2.6. Cytométrie en flux	77
II.2.7. Analyse statistique	81
II.3. Evaluation de l'immunogénicité des peptides multi-épitopiques chez des individus sains	82
II.3.1. Coculture des LT CD8 ⁺ naïfs avec les CD pulsées avec les peptides multi-épitopiques.....	82
II.3.2. ELISPOT.....	86
II.3.3. Typage HLA	86
II.3.4. Marquage immunofluorescent des molécules membranaires des cellules et analyse par cytométrie en flux.....	88
Résultats	90
I. Constitution des pools de peptides multi-épitopiques utilisés dans les tests de stimulation cellulaire.....	91
II. Evaluation de l'immunogénicité des peptides multi-épitopiques chez des individus guéris d'une LCZ due à <i>L. major</i>	92
II.1. Analyse de la réponse cytokinique (IFN- γ et IL-10) induite par les peptides multi-épitopiques, chez les individus guéris d'une LCZ, par ELISA.....	93
II.1.1. Analyse de la réponse IFN- γ	93
II.1.2. Analyse de la réponse IL-10	109
II.2. Enumération par ELISPOT des LT spécifiques des pools de peptides	111
II.3. Dosage des taux de TNF- α et de GrB induits par les pools de peptides.....	116
II.4. Caractérisation phénotypique des populations lymphocytaires T spécifiques des peptides multi-épitopiques	118
II.4.1. Caractérisation des populations lymphocytaires T CD4 ⁺ et T CD8 ⁺ productrices de cytokines	118
II.4.2. Caractérisation de la réponse T mémoire centrale (TCM) et T mémoire effectrice (TEM).....	125
III. Evaluation de la fréquence des cellules T spécifiques des peptides multi-épitopiques, préexistantes dans le répertoire T des individus sains non infectés par <i>Leishmania</i> (N-Fr).	128
III.1. Evaluation des marqueurs de surface sur des CD générées à partir des monocytes.	129
III.2. Evaluation des marqueurs de surface des cellules T CD8 ⁺ naïves purifiées.....	132

III.3. Analyse des marqueurs membranaires des cellules T CD8+, après coculture avec les CD matures pulsées avec le P21 ^R (Cytométrie en flux)	133
III.4. Analyse de la fréquence des cellules T CD8+ productrices d'IFN- γ , après coculture avec les CD matures pulsées avec le P21 ^R (ELISPOT).	134
Discussion	136
Conclusion et perspectives	154
Références.....	157
Annexe	193

Liste des figures

Figure 1. Les stades morphologiques de <i>Leishmania</i>	4
Figure 2. Taxonomie de <i>Leishmania</i> (Chauhan et al., 2015)	5
Figure 3. Cycle de transmission du parasite <i>Leishmania</i>	7
Figure 4. Répartition des principales espèces responsables de la leishmaniose cutanée dans le monde (Gentilini, 2012).....	11
Figure 5. Répartition des principales espèces responsables de la leishmaniose viscérale dans le monde (Gentilini, 2012).....	11
Figure 6. Interactions initiales entre le parasite et le système immunitaire inné (Scorza <i>et al.</i> , 2017) (avec modification).....	18
Figure 7. Interaction entre les sous populations T CD4+ et les macrophages infectés par <i>Leishmania</i> (Gollob <i>et al.</i> , 2014) (avec modification).....	21
Figure 8. Le double rôle de LT CD8+ au cours des leishmanioses.....	29
Figure 9. Développement et maintien des sous populations T CD4+ mémoires suite à une infection par <i>Leishmania</i> (Gollob <i>et al.</i> , 2005).....	33
Figure 10. Principe des vaccins peptidiques (Skwarczynski et Toth, 2016).....	38
Figure 11. Structure tridimensionnelle des molécules HLA-I et HLA-II.....	50
Figure 12. Interaction HLA-I-peptide: présentation classique et cross-présentation (Purcell <i>et al.</i> , 2007)	55
Figure 13. Présentation antigénique par les molécules HLA-II	56
Figure 14. Processus de conception des peptides multi-épitopiques.....	69
Figure 15. Détection des cytokines dans les surnageants de cultures cellulaires par ELISA...	71
Figure 16. Schéma illustrant le principe de la CBA	72
Figure 17. Acquisition des données du test CBA par un cytomètre a flux.....	75
Figure 18. Schéma illustrant le principe de l'ELISPOT.....	76
Figure 19. Les différents systèmes et composés d'un cytomètre à flux	79
Figure 20. Paramètres mesurés par la cytométrie en flux.....	79
Figure 21. Organigramme des techniques utilisées pour évaluer l'immunogénicité des pools chez les individus guéris de LCZ.....	81
Figure 22. Isolement des LT CD8+ naïfs (Miltenyi).....	82
Figure 23. Principe du typage HLA.....	87
Figure 24. Organigramme des techniques utilisées pour évaluer l'immunogénicité des peptides chez les individus naïfs N-Fr	89
Figure 25. Taux d'IFN- γ induits, en réponse à une stimulation par les pools de peptides chez les individus guéris et naïfs, au cours des expériences préliminaires	96
Figure 26. Taux d'IFN- γ induits, chez des individus guéris et naïfs, après stimulation par P16, P17 ^R et P21 ^R , en présence de différentes concentrations d'IL-2	98

Figure 27. Taux d'IFN- γ détectés chez des individus guéris de LCZ, après stimulation par les peptides individuels (ELISA).....	100
Figure 28. Taux d'IFN- γ détectés chez des individus guéris et naïfs, après stimulation par les pools de peptides de cl I (B, F), de clII (C, G) ou de clII/clIII (D, H) (ELISA).....	104
Figure 29. Comparaison entre les taux d'IFN- γ détectés chez des individus guéris et naïfs, après stimulation par les pools de peptides de classe I (B), de classe II (C) ou de classe I et -II (D) (ELISA)	106
Figure 30. Taux d'IL-10 détectés après stimulation par les pools de peptides et par les peptides H2BI et H2BII chez des individus guéris et naïfs (ELISA)	110
Figure 31. Evaluation de la production d'IFN- γ par ELISPOT chez un individu guéris de LCZ (Expérience représentative).....	112
Figure 32. Evaluation de la production de l'IFN- γ par ELISPOT, après stimulation par les pools P8, P9, P13, P14, P16 et P21, chez des individus guéris de LCZ	113
Figure 33. Analyse des taux de TNF- α (A et C) et de GrB (B et D) induits chez des individus guéris et naïfs, après stimulations par P21 et P13 (CBA)......	117
Figure 34. Analyse par cytométrie en flux, des cellules T CD4+ sécrétrices d'IFN- γ ou de GrB, après stimulation par la PMA/Iono et le P21, chez un individu guéris de LCZ (Expérience représentative).....	119
Figure 35. Pourcentages des populations LT CD4+ producteurs d'IFN- γ et de LT CD4+ producteurs GrB, après stimulation par les pools P8, P9, P13, P14, P16 et P21, chez des individus guéris de LCZ (Cytométrie en flux).....	120
Figure 36. Pourcentages des populations LT CD8+ productrices d'IFN- γ , après stimulation par les pools P8, P9, P13, P14, P16 et P21, chez des individus guéris de LCZ (Cytométrie en flux).....	122
Figure 37. Caractérisation de la polyfonctionnalité des populations LT CD4+ par cytométrie en flux.....	123
Figure 38. Pourcentages des LT CD4+ polyfonctionnels, après stimulation par les pools P8, P9, P13, P14, P16 et P21, chez des individus guéris de LCZ (cytométrie en flux).....	125
Figure 39. Schéma montrant l'analyse effectuée par cytométrie de flux, des cellules TCM et TEM, après stimulation par le SLA et le P21 chez un individu guéri de LCZ	126
Figure 40. Pourcentages des populations TCM (A et C) et TEM (B et D), parmi les cellules T CD4+ (A et B) et T CD8+ (C et D), après stimulation par les pools, P8, P9, P13, P14, P16 et P21, chez des individus guéris de LCZ (cytométrie en flux).....	128
Figure 41. Expression des marqueurs CD14, CD86 et HLA-DR sur les CD générées à partir des cellules adhérentes au plastique.....	130
Figure 42. Pourcentages des cellules CD14+ et des cellules HLADR+CD86- après isolement des monocytes par le kit Miltenyi	131
Figure 43. Analyse des marqueurs CD14, HLA-DR et CD86 sur les CD immatures, matures et pulsées par les pools de peptides CEF et P21 ^R	132
Figure 44. Pourcentage de LT CD8+ naïves avant et après purification.....	133
Figure 45. Fréquence de cellules T CD8+ productrices d'IFN- γ , après stimulation par les CD pulsées avec CEF ou P21 ^R , chez 3 individus sains	134

Liste des tableaux

Tableau 1. Transmission des leishmanies par les différentes espèces de phlébotomes (Bates, 2007) (avec modifications)	6
Tableau 2. Formes cliniques des leishmanioses dans le monde	10
Tableau 3. Formes cliniques de leishmanioses en Tunisie	13
Tableau 4. Différents outils de prédiction <i>in silico</i> disponibles en ligne	39
Tableau 5. Résumé des travaux décrivant des candidats vaccins peptidiques contre les leishmanioses murines et humaines	48
Tableau 6. Classification des allèles HLA-A en supertypes	52
Tableau 7. Classification des allèles HLA-B en supertypes.....	53
Tableau 8. Estimation de la couverture de la population mondiale par combinaison de différents supertypes HLA-I (Sette et Sidney, 1999).....	54
Tableau 9. Classification des allèles HLA-II en supertypes (Greenbaum <i>et al.</i> , 2011)	54
Tableau 10. Données clinico-épidémiologiques et immunologiques des individus guéris de LCZ	58
Tableau 11. Protéines candidates utilisées pour le criblage des épitopes.....	60
Tableau 12. Caractéristiques des épitopes affins aux molécules HLA-I, conçus <i>in silico</i> , à partir des protéines H2B, PSA et LmIRAB	64
Tableau 13. Caractéristiques des épitopes affins aux molécules HLA-I, conçus <i>in silico</i> , à partir des protéines H2B, PSA et LmIRAB	65
Tableau 14. Estimation de la couverture de la population	65
Tableau 15. Caractéristiques des séquences riches en épitopes affins aux molécules HLA-II, conçus <i>in silico</i> , à partir des protéines H2B, PSA et LmIRAB.....	67
Tableau 16. Différentes concentrations de la gamme standard de chaque cytokine	73
Tableau 17. Panel d'anticorps spécifiques des marqueurs membranaires et intracellulaires utilisés pour la cytométrie en flux.....	80
Tableau 18. Composition des pools de peptides multi-épitopiques	91
Tableau 19. Taux d'IFN- γ induits, chez des individus guéris et naïfs, après stimulation par les pools de peptides, et par les peptides H2BI et H2BII, au cours des expériences préliminaires.....	95
Tableau 20. Taux d'IFN- γ détectés chez des individus guéris et naïfs, après stimulation par les pools P16, P17 ^R et P21 ^R , en présence de différentes concentrations d'IL-2.....	97
Tableau 21. Composition des pools de peptides multi-épitopiques après élimination du peptide RABI.1	99
Tableau 22. Taux d'IFN- γ détectés chez les individus guéris et naïfs, après stimulation par les peptides individuels.....	101
Tableau 23. Taux d'IFN- γ détectés chez des individus guéris et naïfs, après stimulation par les pools de peptides	103

Tableau 24. Analyse statistique entre les différents pools de peptides, chez les individus guéris de LCZ	107
Tableau 25. Taux d'IFN- γ induit par les pools de peptides classé par ordre décroissant.....	108
Tableau 26. Production de l'IFN- γ par les PBMCs d'individus guéris de LCZ, en réponse aux pools P8, P9, P13, P14, P16 et P21, évaluée par ELISPOT.	112
Tableau 27. Typage HLA et réponse IFN- γ , détectée par ELISPOT, chez les individus guéris de LC	115
Tableau 28. Taux de TNF- α détectés chez des individus guéris et naïfs, après stimulation par P13 et P21 (CBA)	116
Tableau 29. Taux de GrB détectés chez des individus guéris et naïfs, après stimulation par P21 et P13 (CBA)	117
Tableau 30. Pourcentages des LT CD4+ producteurs d'IFN- γ et de LT CD4+ producteurs de GrB, en réponse à une stimulation par les pools de peptides P8, P9, P13, P14, P16 et P21, chez des individus guéris de LCZ.....	120
Tableau 31. Pourcentages des LT CD8+ producteurs d'IFN- γ en réponse à une stimulation par les pools de peptides, P8, P9, P13, P14, P16 et P21, chez des individus guéris de LCZ	121
Tableau 32. Pourcentages des LT CD4+ polyfonctionnels, en réponse à une stimulation par les pools de peptides P9, P13, P14 et P21, chez des individus guéris de LCZ	124
Tableau 33. Pourcentages des populations TCM et TEM CD4+, en réponse à une stimulation par les pools P8, P9, P13, P14, P16 et P21, chez des individus guéris de LCZ.....	127
Tableau 34. Pourcentages des populations TCM et TEM CD8+, en réponse à une stimulation par les pools P8, P9, P13, P14, P16 et P21, chez des individus guéris de LCZ.....	127
Tableau 35. Variation de l'expression des différents marqueurs sur les cellules T CD8+ naïves après leur coculture avec des CD pulsées avec les pools de peptides CEF ou P21 ^R	134
Tableau 36. Typage HLA	135

Liste des abréviations

°C	Degré Celsius
aa	Acide amine
Ac	Anticorps
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Ag	Antigène
APC	Allophycocyanine
APC-H7	Allophycocyanine-H
Avidin-HRP	Avidin-horseradish peroxidase conjugate
BCG	Bacille de Calmette-Guérin
BSA	Bovine Serum Albumin
CAM	Complexe d'attaque membranaire
CBA	Cytometric Beads Array
CCR7	C-C chemokine receptor type 7
CD	Cellule dendritique
CLIP	Class II-associated invariant chain peptide
CLm	Cured <i>Leishmania major</i>
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CR1 et CR3	Récepteurs du complément de type 1 et 3
Cy	Cyanine
DAMP	Damage-associated molecular pattern « Les motifs moléculaires associés aux dégâts »
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DS	Deviation Standard
DTH	Delayed hypersensitivity reactions « Réaction hypersensibilité retardée »
EDTA	Acide ethylene diamine tetraacetique
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-Linked Immunosorbent SPOT assay

FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FasL	Fas ligand
Fc	Fragment cristallisable
FCR	Récepteur du Fc
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
FSC	Forward Side Scatter
GLU	L-Glutamine
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GP63	Glycoprotéine de 63kDa
H2B	Histone B
H2SO4	Acide sulfurique
HLA	Human Leucocyte Antigen
HSP	Protéine du choc thermique (<i>heat-shock protein</i>)
IDR	Intradermoréaction
IFN-γ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
Iono	Ionomycine
IPT	Institut Pasteur de Tunis
IQR	Interquartile range
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
KMP-11	Kinetoplastid membrane protein-11
L	<i>Leishmania</i>
LACK	<i>Leishmania</i> homologue for receptors of Activated C Kinase
LaPSA-38S	<i>Leishmania amazonensis</i> Promastigote Surface Antigen 38S
LC	Leishmaniose cutanée
LCA	LC Américaine
LCD	Leishmaniose cutanée diffuse
LCL	Leishmaniose cutanée localisée
LCM	Leishmaniose cutanéomuqueuse
LCS	Leishmaniose cutanée sporadique
LCZ	Leishmaniose cutanée zoonotique

LmlRab	<i>Leishmania major</i> large rab
LPG	Lipophosphoglycane
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucin Rich Repeats
LST	Leishmanin Skin Test
LT	Lymphocytes T
LTh	Lymphocyte T helper
LV	Leishmaniose viscérale
M	Molaire
Mg	Milligramme
MIP-1β	Macrophage inflammatory protein-1 β
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
NBT/BCIP	Nitro blue tetrazolium chloride/5-brom-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NK	Natural killer
NO	Monoxide d'Azote
ns	non significatif
NS	Non stimulé
p	Probabilité
P	<i>Phlebotomus</i>
PBMC	Peripheral Blood mononuclear cells
PBS	Solution phosphate saline tamponnée
PBS-T	Phosphate Buffered Saline-Tween
PE	Phycoérythrine
PerCP-cy5.5	Péridinine chlorophylle protéine avec cyanine-5.5
pg	picogramme
PHA	Phytohémagglutinine
PKDL	Post-kala-azar dermal leishmaniasis
PMA	Phorbo 12-Myristate 13-Acetate
PN	Polynucléaires neutrophiles
PS/Glu	Pénicilline-Streptomycine/Glutamine
PSA	Promastigote surface Antigen

PVDF	Polyvinylidene fluoride
RE	Reticulum Endoplasmique
RMPI	Rosewald Park Memorial Memorial Institute'' Milieu de culture
rpm	revolutions per minutes
DS	Deviation standard
SFU	Spots Forming units
SLA	Soluble <i>Leishmania</i> Antigens
SSC	Size Side Scatter
SVF	Sérum de veau foetal
TAP	Transporter associated with antigen processing
TCM	T mémoire central
TCR	Récepteur des cellules T (T Cell Receptor)
TEM	T mémoire effecteur
TGF	Transforming Growth Factor (Facteur de croissance transformant)
TI	Tampon d'isolement
TLR	Toll-like receptor
TMB	3.3',5.5' tetramethylbenzidine
TNF-α	Tumor Necrosis Factor (facteur de nécrose tumorale)
TRM	T mémoire résident
VIH	Virus de l'immunodeficiency humaine
μg	Microgramme
μM	Micromolaire

Avant-propos

Ce projet de thèse a pour objectif d'identifier des candidats vaccins peptidiques contre la leishmaniose humaine, infection parasitaire posant un important problème de santé publique, dans plusieurs régions du monde.

La vaccination à base de peptides est une stratégie moderne qui consiste à utiliser un fragment d'antigène bien défini, capable d'induire une réponse immunitaire spécifique et efficace. Elle est basée sur l'identification de plusieurs épitopes, permettant d'induire un large répertoire de réponses immunes spécifiques et par conséquent, d'assurer une bonne couverture vaccinale.

Les vaccins à base de peptides présentent plusieurs avantages. Ils sont synthétisés chimiquement, permettant d'éviter la culture des pathogènes. Leur production est simple, reproductible et rentable. Les conditions de transport et de stockage sont simples et les effets secondaires associés à ce type de vaccins, sont réduits. Des inconvénients sont, cependant, à souligner, comme la possibilité de dégradation, *in vivo*, et la faible immunogénicité, pouvant être contournés, entre autres, par l'utilisation de peptides multi-épitopiques et d'adjuvants.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé des peptides multi-épitopiques qui ont été conçus à partir de trois protéines de *Leishmania*, auparavant décrites comme de potentiels candidats vaccins. L'efficacité de ces peptides à induire une protection a été évaluée, *in vitro*, par des tests de stimulation des cellules issues d'individus ayant développé une protection contre les leishmanioses.

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre l'Institut Pasteur de Tunis (IPT) et l'Institut de Recherche pour le développement (IRD) de Montpellier et s'est inscrit dans le cadre du projet JEA (Jeune Equipe Associée à l'IRD)-VACLEISH.

La thèse a été effectuée, dans le cadre d'une cotutelle, par périodes alternées de six mois dans chacun des deux laboratoires: LR11-IPT06 (Laboratoire de Parasitologie médicale, Biotechnologies et Biomolécules) à l'IPT et UMR-177 INTERTRYP à l'IRD.

Introduction

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires négligées et endémiques dans des pays d'Afrique de l'est, d'Amérique du sud, du Moyen orient et d'Asie. Elles sont dues à la transmission de protozoaires du genre *Leishmania* par des phlébotomes. La maladie est caractérisée par des manifestations cliniques variées allant d'une infection asymptomatique ou cutanée bénigne aux formes viscérales mortelles en absence de traitement. Cette diversité clinique est due à des facteurs propres au parasite (virulence et tropisme des espèces et isolats parasitaires), à la réponse immunitaire de l'hôte (innée et acquise) et aux facteurs environnementaux. Le contrôle des leishmanioses repose essentiellement sur des médicaments coûteux, peu efficaces et souvent associés à des effets secondaires et à une toxicité. La résistance à certains traitements a aussi été rapportée. La plupart des individus guéris d'une leishmaniose développent un état de résistance à une infection ultérieure ce qui est un argument pour la faisabilité d'un vaccin. La vaccination constituerait le meilleur outil de prévention et de contrôle, mais à ce jour, aucun vaccin à application humaine n'est disponible.

Dans ce contexte et dans le but d'identifier de nouveaux candidats vaccins contre la leishmaniose humaine, nous avons analysé l'immunogénicité de peptides multi-épitopiques conçus à partir de trois protéines de *Leishmania*, à savoir la protéine H2B (Histone B), LmlRAB (*Leishmania (L.) major* large RAB GTPase) et PSA (Promastigote Surface Antigen). Le choix de ces protéines s'est basé sur (i) leur capacité à conférer une protection chez la souris et le chien, (ii) à induire, *in vitro*, une réponse cellulaire associée à la protection chez des individus guéris de leishmaniose et (iii) un degré de conservation élevé entre différentes espèces de *Leishmania*.

La plupart des individus guéris des leishmanioses développent une protection à vie contre une infection ultérieure ce qui plaide pour la faisabilité d'un vaccin qui serait le meilleur outil de prévention et de contrôle. Cependant, à ce jour, aucun vaccin à application humaine n'est disponible.

Dans ce contexte et dans le but d'identifier de nouveaux candidats vaccins contre la leishmaniose, des peptides multi-épitopiques issus de trois protéines leishmaniennes ont été étudiées au cours de ce travail à savoir la protéine H2B (Histone B), LmlRAB (*Leishmania (L.) major* large RAB GTPase) et PSA (Promastigote Surface Antigen). Le choix de ces protéines s'est basé sur leur capacité à conférer une protection chez la souris ou chez le chien

à induire, *ex vivo*, une réponse cellulaire associée à la protection chez des individus guéris de leishmaniose. Ces protéines sont également bien conservées entre les différentes espèces de *Leishmania*.

Les peptides multi-épitopiques, ont été conçus, par Yasmine Messaoudi et Rachel Bras-Gonçalves à l'IRD (Master Immunologie Fondamentale et Appliquée intitulé « Conception de peptides multi-épitopiques à partir de protéines de *Leishmania* et analyse préliminaire de leur immunogénicité chez l'homme », en utilisant des algorithmes de prédiction, *in silico*, de l'affinité de fixation des peptides aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) humain ou HLA (Human Leukocyte Antigens). Ils sont constitués d'épitopes T ayant une affinité forte à modérée à plusieurs molécules HLA de classe I (HLA-I) ou II (HLA-II), les plus représentées dans la population mondiale, dans le but d'assurer une vaste couverture vaccinale. L'utilisation des peptides multi-épitopiques comme stratégie vaccinale est considérée comme une approche moderne, prometteuse et ayant plusieurs avantages (cités ci-dessus) par rapport aux méthodes de vaccination conventionnelle.

Au cours de ce travail, notre objectif a été d'évaluer l'immunogénicité des peptides multi-épitopiques chez des sujets guéris d'une leishmaniose cutanée (LC) due à *L. major*. Les cellules mononucléées isolées du sang périphérique (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells), ont été stimulées, *in vitro*, par les peptides multi-épitopiques, utilisés soit individuellement soit sous forme de pools de peptides. La capacité des PBMCs à produire des cytokines jouant un rôle crucial au cours de l'infection telles que l'Interféron-gamma (IFN- γ), l'interleukine 10 (IL-10), le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) et le granzyme B (GrB), en réponse à la stimulation par les peptides, a été analysée par ELISA et CBA (Cytometric beads array). Nous avons également sélectionné les pools de peptides les plus immunogènes pour quantifier les lymphocytes T (LT) produisant de l'IFN- γ par ELISPOT (Enzyme-Linked Immunosorbent SPOT Assay). Les phénotypes des LT producteurs des différentes cytokines ainsi que les LT mémoires spécifiques des pools de peptides les plus immunogènes, ont été analysés par cytométrie en flux.

L'immunogénicité des peptides multi-épitopiques a aussi été évaluée chez des individus naïfs, n'ayant aucun antécédent de leishmaniose. Leur capacité à stimuler les LT naïfs a été déterminée par la quantification des LT producteurs d'IFN- γ par ELISPOT.

Prérequis et état de l'art

I. Biologie et épidémiologie des leishmanioses

I.1. Agent pathogène: Le parasite *Leishmania*

Les leishmanies sont des parasites protozoaires appartenant à la famille des Trypanosomatidae, à l'ordre des kinetoplastidae et au genre *Leishmania* (Thomaz-Soccol *et al.*, 1993; Steverding, 2017). Un large éventail d'espèces sont en cause, similaires d'un point de vue morphologique, mais capables de causer différentes formes cliniques de leishmanioses, de sévérité variable.

Le parasite présente au cours de son cycle évolutif deux grands stades successifs: la forme amastigote et la forme promastigote (Figure 1). La forme amastigote est intracellulaire obligatoire chez les hôtes vertébrés, dont l'homme, de forme ovoïde, dépourvue de flagelle, immobile et pourvue d'un noyau volumineux et d'un kinétoplaste bacilliforme. La forme promastigote est extracellulaire libre dans l'intestin du phlébotome vecteur, fusiforme et très mobile grâce à un flagelle antérieur. Les promastigotes se différencient dans le tractus digestif de l'insecte vecteur ou en culture. Cette différenciation est caractérisée par le passage des parasites du stade procyclique non infestant au stade métacyclique infestant, suite à un processus appelé métacyclogenèse. Durant ce processus, le parasite subit des modifications morphologiques et biologiques.

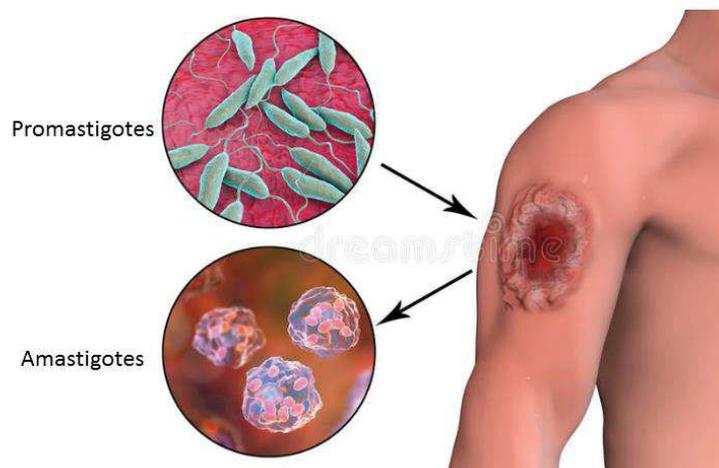


Figure 1. Les stades morphologiques de *Leishmania*

<https://ru.dreamstime.com>

La classification de *Leishmania* a été initialement basée sur des critères éco-biologiques, tels que les vecteurs, la distribution géographique, le tropisme, les propriétés antigéniques et les manifestations cliniques (Garnham, 1971; Pratt et David, 1981; Banuls *et al.*, 2007).

Ces parasites ont, par la suite, été divisés, en complexes d'espèces basés sur des critères biochimiques, immunologiques et génétiques (**Figure 2**). Les deux sous-genres, *Leishmania* et *Viannia*, sont séparés sur la base de leur localisation dans l'intestin du vecteur (centrale ou postérieure). Les différentes espèces sont classées en deux groupes selon leur répartition géographique, en espèces de l'Ancien Monde (Europe, Afrique, Asie) et du Nouveau Monde (Amérique).

Les espèces du sous genre *Sauroleishmania* infectent les reptiles (lézards) plutôt que des mammifères (**Croan et al., 1997**). Aujourd'hui, 30 espèces de *Leishmania* ont été identifiées parmi lesquelles 20 sont pathogènes pour l'Homme (**Banuls et al., 2007**).

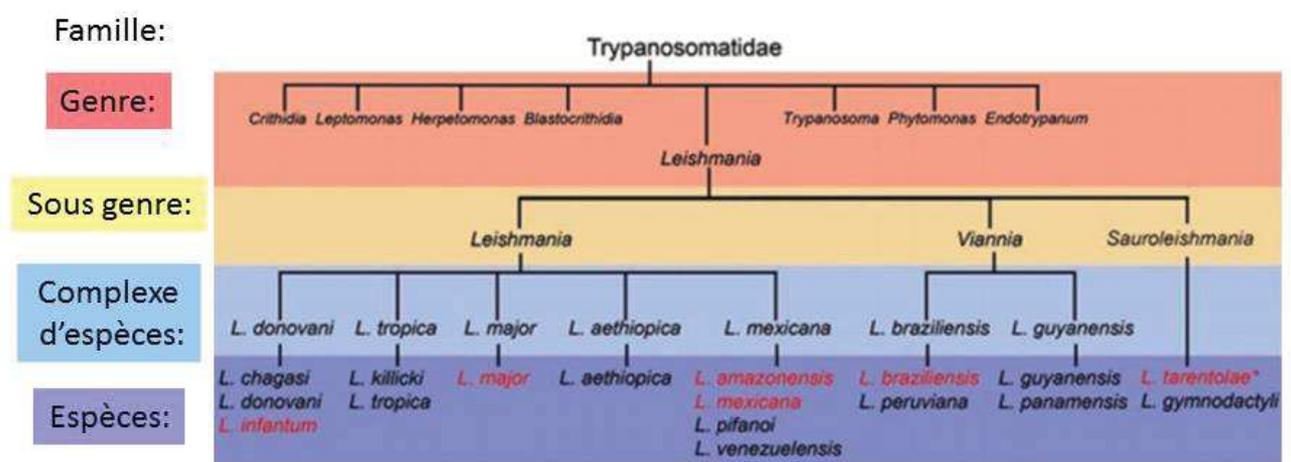


Figure 2. Taxonomie de *Leishmania* (**Chauhan et al., 2015**)

I.2. Vecteur: Le phlébotome

Les parasites *Leishmania* sont transmis d'un hôte vertébré à un autre hôte vertébré par un insecte vecteur, un moucheron de 2-3 mm de longueur, le phlébotome qui pique surtout le soir. Seule la femelle, qui est hématophage, assure la transmission des leishmanies. Les phlébotomes appartiennent à la famille des Psychodidae et à la sous-famille des Phlebotominae. Les phlébotomes du genre *Phlebotomus* transmettent les espèces *Leishmania* de l'Ancien Monde, alors que les phlébotomes du genre *Lutzomyia* transmettent les espèces du Nouveau Monde (**Bates, 2007**). Les phlébotomes se trouvent principalement dans les régions tropicales et subtropicales, ils apparaissent seulement l'été en région tempérée où ils confèrent à la maladie un caractère saisonnier. De nombreuses espèces de phlébotomes sont capables de transmettre le parasite *Leishmania*, alors que certaines espèces ne sont capables de transmettre qu'un nombre unique ou limité d'espèces de *Leishmania* (**Dostalova et Volf, 2012**) (**Tableau 1**).

Tableau 1. Transmission des leishmanies par les différentes espèces de phlébotomes (Bates, 2007) (avec modifications)

Espèce parasitaire	Vecteur	Forme clinique de la maladie	Répartition géographique
<i>L. major</i>	<i>Phlebotomus duboscqi</i> <i>Phlebotomus papatasi</i> <i>Phlebotomus salehi</i>	Cutanée	Ancien Monde
<i>L. mexicana</i>	<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i>	Cutanée	Nouveau Monde
<i>L. braziliensis</i>	<i>Lutzomyia wellcomei</i> <i>Lutzomyia complexus</i> <i>Lutzomyia carrera</i>	Muco-cutanée	Nouveau Monde
<i>L. donovani</i>	<i>Phlebotomus argentipes</i> <i>Phlebotomus orientalis</i> <i>Phlebotomus martini</i>	Viscérale	Ancien Monde
<i>L. infantum</i>	<i>Phlebotomus ariasi</i> <i>Phlebotomus perniciosus</i> <i>Lutzomyia longipalpis</i>	Viscérale	Nouveau et Ancien Monde

I.3. Hôtes et réservoirs

Les réservoirs naturels de *Leishmania* sont des mammifères domestiques ou sauvages chez lesquels le parasite colonise les cellules du système des phagocytes mononucléés.

Les mammifères réservoirs des *Leishmania* appartiennent à divers ordres: Carnivores, rongeurs, marsupiaux, édentés, primates, etc. Dans ce cas, la leishmaniose est dite zoonotique. Dans la région méditerranéenne, le principal réservoir de *L. infantum* est le chien et celui de *L. major* est le rongeur (Molina *et al.*, 1994; Laurenti *et al.*, 2013). En Asie du Sud et en Afrique de l'Est, l'unique réservoir pour *L. donovani* est l'homme, dans ce cas, elle est dite anthroponotique (Ready, 2014).

I.4. Cycle parasitaire

Au cours de leur cycle de vie complexe, les parasites *Leishmania* sont exposés à différents environnements extra et intracellulaires. Le parasite nécessite deux hôtes, un hôte invertébré (le phlébotome) et un mammifère (homme, rongeur, chien,...). Initialement le mode de reproduction des leishmanies a été décrit comme étant un mode asexué. Plus tard, il a été rapporté que ces parasites avaient aussi un cycle sexué caractérisé par un processus méiotique.

Ce phénomène ne se produit que dans le phlébotome et les hybrides portant le génome complet des deux parents peuvent être transmis à l'hôte mammifère par la piqure du phlébotome (Akopyants *et al.*, 2009; Rougeron *et al.*, 2010). Les leishmanies sont donc caractérisées par des modes de reproduction « mixtes », avec alternance entre clonalité et reproduction sexuée.

Le cycle parasitaire débute par la piqure de l'hôte par un phlébotome infecté (Figure 3). Le phlébotome va alors prendre son repas sanguin et injecter, dans le derme, le parasite sous sa forme promastigote métacyclique infectieuse en même temps que sa salive laquelle semble jouer un rôle important dans le devenir de la maladie. Les promastigotes injectés vont pénétrer à l'intérieur des phagocytes mononucléés, majoritairement des cellules dendritiques (CD) et des macrophages, dans lesquels ils vont se transformer en amastigotes au sein des vacuoles parasitophores. Les amastigotes vont alors s'y multiplier jusqu'à la lyse des phagocytes. Les parasites sont alors libérés et vont à nouveau être phagocytés par les cellules avoisinantes. Le cycle est achevé lorsque, à l'issue d'un nouveau repas sanguin, le phlébotome prélève des phagocytes infectés. Dans le tube digestif de l'insecte, les amastigotes se différencient en promastigotes, 12 à 18 h après leur ingestion. Ces derniers se multiplient et migrent vers les glandes salivaires et la trompe jusqu'au prochain repas sanguin (Figure 3).

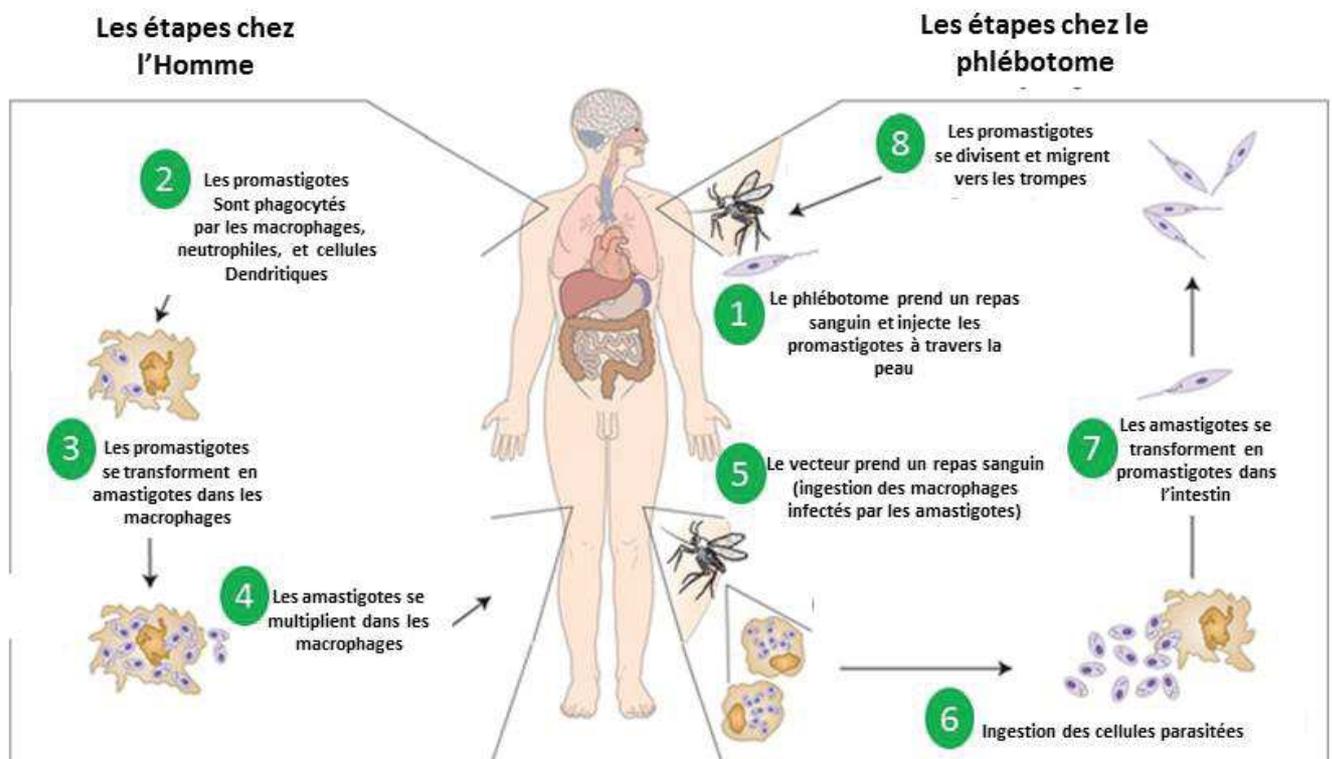


Figure 3. Cycle de transmission du parasite *Leishmania*

<https://oncohemakey.com/leishmaniasis-2/> (avec modification)

I.5. Symptomatologie

Les leishmanioses touchent les populations les plus pauvres du monde. Elles représentent un problème majeur de santé publique lié à des évolutions environnementales telles que la déforestation, la construction de barrages, les systèmes d'irrigation, l'urbanisation et les mauvaises conditions de logement. Le développement de la maladie est également lié aux facteurs de risques individuels tels que les déficits immunitaires et la malnutrition. Les manifestations cliniques chez l'homme sont très diverses mais se déclinent en deux formes cliniques principales: La forme viscérale caractérisée par une atteinte des viscères comme le foie et la rate et les formes tégumentaires comprenant la forme cutanée localisée, cutanée diffuse et muco-cutanée, dans lesquelles le parasite reste localisé au niveau de la peau et des muqueuses (**Tableau 2**).

I.5.1. Leishmaniose viscérale

La leishmaniose viscérale (LV) appelée kala-azar ou " fièvre noire ", représente la forme la plus sévère de la maladie car létale en absence de traitement ou en cas d'échec du traitement.

Lors de la piqûre par le phlébotome, les parasites migrent à travers le système sanguin et lymphatique vers les organes lymphoïdes (rate et moelle osseuse) et le foie. Les symptômes habituels sont des poussées irrégulières de fièvre, une perte de poids, une hépatosplénomégalie (augmentation des volumes du foie et de la rate) et une anémie. La plupart des cas sont enregistrés au Brésil, en Afrique de l'Est et en Asie du Sud-Est.

Dans le continent indien et l'Afrique subsaharienne, la LV est essentiellement causée par *L. donovani* et l'homme constitue le seul réservoir du parasite (**Desjeux, 2001**). Un traitement efficace peut conduire à la guérison. Cependant des mois ou des années après la guérison, des macules peuvent apparaître sur n'importe quelle partie du corps. Cette manifestation correspond à la leishmaniose cutanée (LC) post kala-azar (PKDL) (**Elhassan et al., 1992**). Elle est présente dans toutes les régions où *L. donovani* est endémique.

La LV est aussi causée par *L. infantum* dans le bassin méditerranéen et en Iran, et par *L. chagasi* en Amérique latine (**Grimaldi et al., 1989**). Le chien est le réservoir pour ces deux dernières espèces.

L'âge de survenue de la LV varie selon l'espèce parasitaire en cause. La LV touche principalement les enfants âgés de 1 à 5 ans dans le pourtour de la méditerranée et dans les foyers sud-américains, tandis que dans les foyers indiens et dans l'Afrique sub-saharienne, la maladie survient à tout âge (**Ready, 2014**). Depuis l'épidémie de l'infection par le VIH, plus

de la moitié de cas de co-infection LV/SIDA sont des adultes dans les pays du sud de l'Europe ([Medrano et al., 1992](#); [Ready, 2010](#)).

I.5.2. Leishmanioses tégumentaires

- Leishmaniose cutanée localisée (LCL)

Elle constitue la forme la plus fréquente, avec des lésions cutanées, principalement des ulcères sur les parties exposées du corps laissant des cicatrices indélébiles pouvant être associés à des handicaps sévères. Environ 95% des cas de LCL surviennent dans les Amériques, dans le bassin méditerranéen, au Moyen-Orient et en Asie centrale.

Les espèces en cause sont *L. major*, *L. infantum* et *L. tropica*, dans l'ancien monde et *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* et *L. mexicana* dans le nouveau monde. La LCL évolue le plus souvent vers la guérison même en absence de traitement et est généralement associée à la mise en place d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire adéquate ([Castes et al., 1983](#); [Kemp et al., 1994](#)).

- Leishmaniose cutanée diffuse (LCD)

La LCD est due aux espèces *L. aethiopica* en Afrique de l'est et *L. amazonensis* dans les forêts tropicales d'Amérique du sud. Elle conduit à des lésions cutanées chroniques généralement réfractaires au traitement ([Convit et al., 1972](#); [Hashiguchi et al., 2016](#)).

I.5.3. Leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM)

La LCM correspond aux leishmanioses du Nouveau Monde (Amérique du Sud et Centrale). Plus de 90% des cas de LCM surviennent au Brésil, en Bolivie et au Pérou ([Ahluwalia et al., 2004](#)). La LCM est provoquée principalement par *L. braziliensis* et *L. panamensis* ([Silveira et al., 2004](#); [Amato et al., 2008](#); [Guerra et al., 2011](#)). Ces espèces se caractérisent par leur capacité à causer des métastases au niveau des muqueuses de la cavité buccale et des voies respiratoires supérieures, par dissémination lymphatique ou sanguine, entraînant ainsi une destruction partielle ou totale des muqueuses du nez, de la bouche et de la gorge ([Diniz et al., 2011](#)).

Tableau 2. Formes cliniques des leishmanioses dans le monde

Formes cliniques	Répartition géographique	Espèces parasitaires	Manifestations cliniques
LCL	Ancien Monde	<i>L. tropica</i> <i>L. major</i>	
	Nouveau Monde	<i>L. mexicana</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. guyanensi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. chagasi</i>	
LCD	Nouveau Monde	<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i>	
LCM	Nouveau Monde	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>	
LV	Ancien Monde	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	
	Nouveau Monde	<i>L. chagasi</i>	
PKDL	Ancien Monde	<i>L. donovani</i>	

I.6. Répartition géographique des leishmanioses

I.6.1. Répartition géographique des leishmanioses dans le monde

Les leishmanioses sont largement répandues à la surface du globe et les différentes formes cliniques de leishmanioses sévissent sur quatre des cinq continents, essentiellement dans les régions tropicales et subtropicales (Alvar *et al.*, 2012). Elles sont endémiques dans 98 pays, principalement en développement, dont 72 sont parmi les plus pauvres. On distingue les leishmanioses de l'Ancien Monde (Sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient et Asie) et celles du Nouveau Monde (Amériques du Nord, du Sud et Centrale) (Figure 4 et 5). L'incidence mondiale de la leishmaniose symptomatique est estimée à 1,5 à 2 millions de cas annuels. La prévalence mondiale dépasse 10 millions de cas (Oryan et Akbari, 2016). Les leishmanioses sont considérées comme étant la deuxième cause de mortalité d'origine parasitaire après le paludisme. Pourtant elles demeurent parmi les maladies les plus négligées dans le monde.

La répartition géographique des leishmanioses est la résultante de l'action de divers facteurs intrinsèques (parasite, vecteur, réservoir et hôte) et extrinsèques (facteurs environnementaux). La présence simultanée de ces différents facteurs détermine la localisation géographique de l'infection ([Gentilini, 2012](#))

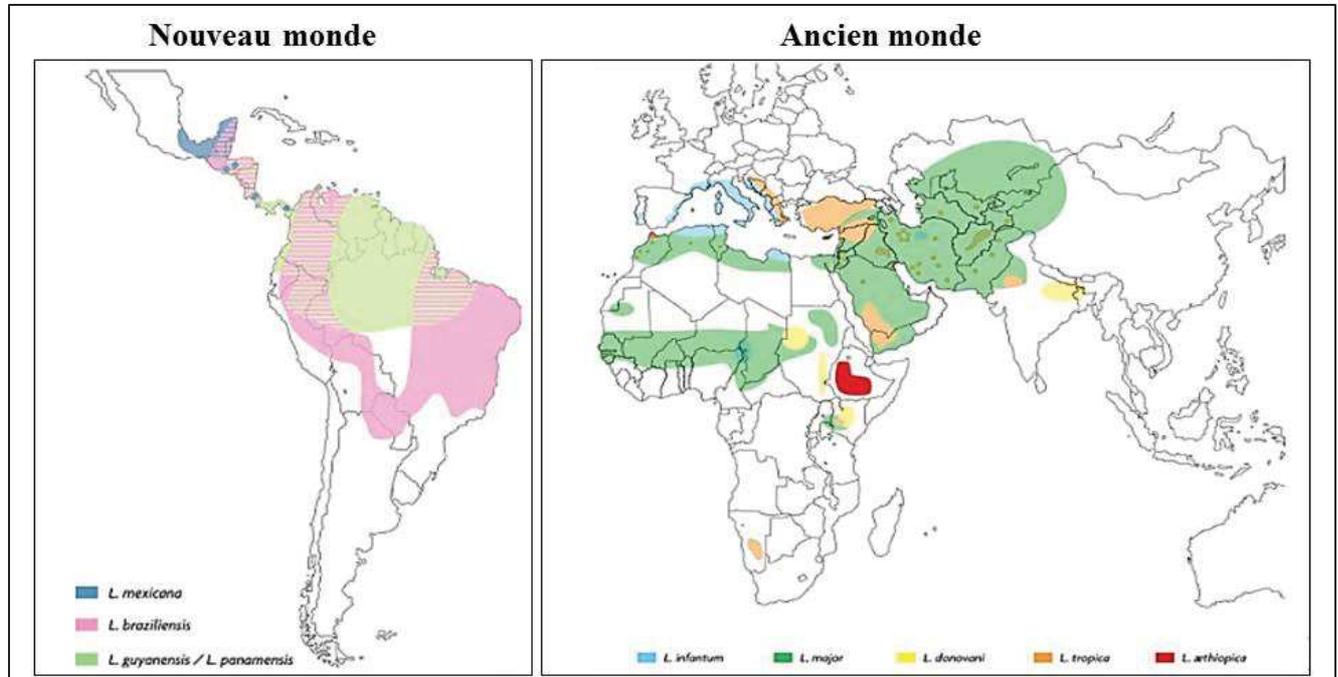


Figure 4. Répartition des principales espèces responsables de la leishmaniose cutanée dans le monde ([Gentilini, 2012](#))

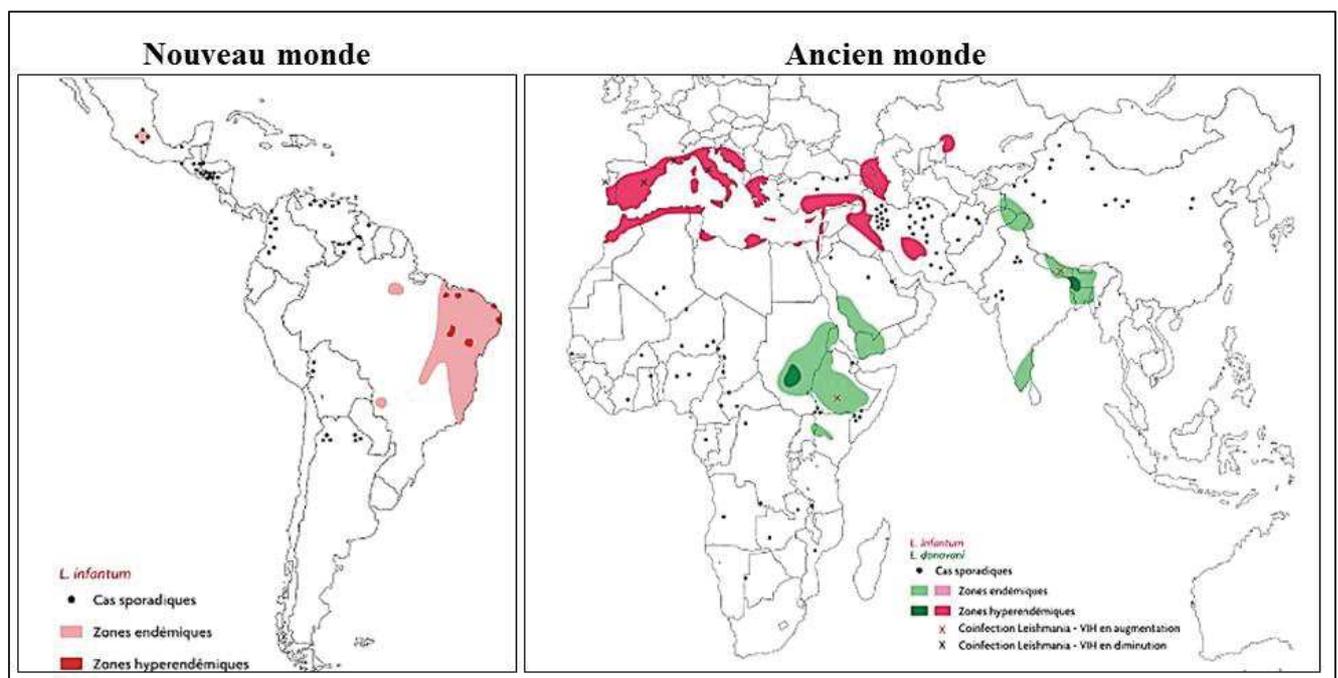


Figure 5. Répartition des principales espèces responsables de la leishmaniose viscérale dans le monde ([Gentilini, 2012](#))

I.6.2. Répartition géographique des leishmanioses en Tunisie

En Tunisie, les premiers cas de LC ont été observés à Gafsa dans le sud-ouest du pays. Actuellement, les formes cutanées et viscérales sont présentes en Tunisie.

- Les leishmanioses cutanées

Trois formes clinico-épidémiologiques différentes sont décrites en Tunisie (**Tableau 3**).

La **LC zoonotique (LCZ)** initialement décrite par Ben Ismail et collaborateurs en 1986 est causée par *L. major* (**Ben Ismail et al., 1986; Ben-Ismaïl et al., 1989**). Il s'agit de la forme la plus fréquente avec 4000 cas décrits par an. Elle est endémo-épidémique au centre et au sud-ouest du pays (zones semi-arides et arides) (**Chaffai et al., 1988; Salah et al., 2007; Aoun et Bouratbine, 2014**). Dans certains villages, jusqu'à 60% de la population est infectée. La LCZ pose un important problème de santé publique. Les espèces réservoirs comprennent les rongeurs *Psammomys obesus*, *Meriones shawi* et *Meriones libycus* (**Aoun et Bouratbine, 2014**). Le seul vecteur connu est *Phlebotomus papatasi* (**Ben Ismail et al., 1987**). La LCZ se distingue par des lésions multiples sur les membres et la face dont la cicatrisation est spontanée et peut nécessiter quelques mois (**Tableau 3**).

La **LC sporadique du Nord (LCS)** est beaucoup plus rare, avec une trentaine de cas par an. Elle est principalement causée par un variant dermatrope de *L. infantum* zymodème MON-24 (**Aoun et al., 2000; Aoun et al., 2008**). Elle sévit dans les villes et villages du nord du pays (**Chaffai et al., 1988; Aoun et Bouratbine, 2014**). Les lésions causées par *L. infantum* sont souvent uniques et se situent préférentiellement au niveau du visage (**Tableau 3**).

La **LC chronique (LCC)**, est aussi une forme rare, avec une dizaine de cas par an, répertoriés au sud-est du pays et plus spécifiquement dans les montagnes rocheuses de la région de Tataouine (**Bousslimi et al., 2010**). Cette forme clinique est causée par *L. killicki* MON-8. (**Rioux et al., 1986; Bouratbine et al., 2005**). Son réservoir est *Ctenodactylus gundi* et est transmise par *P. sergenti* (**Aoun et Bouratbine, 2014**). Elle est caractérisée par des lésions uniques touchant essentiellement la face et les membres et par une longue durée d'évolution (2 à 6 ans) (**Tableau 3**).

- La leishmaniose viscérale

La LV constitue la deuxième pathologie vectorielle la plus fréquente dans le pays après la LC. Elle constitue un problème majeur de santé publique en raison, entre autre, du coût élevé de sa

prise en charge. La forme viscérale sévit au nord et au centre du pays et principalement dans le gouvernorat de Kairouan (Aoun *et al.*, 2009; Ben-Ahmed *et al.*, 2009; Aissi *et al.*, 2015). Actuellement, environ 100 cas sont rapportés par an. La présence de la LV est probablement liée au développement de l'irrigation et à une agriculture favorable à la multiplication des phlébotomes en même temps que la présence du réservoir de *L. infantum*, le chien (Aoun *et al.*, 2009). Les patients sont pour la plupart (80%), des enfants de 1 à 5 ans. Aucun cas de co-infection VIH / *Leishmania* n'a été signalé en Tunisie.

Tableau 3. Formes cliniques de leishmanioses en Tunisie

Espèces de <i>Leishmania</i>	Formes cliniques	Vecteurs	Réservoirs	Manifestations cliniques
<i>L. infantum</i>	LC/LV	<i>P. langeroni</i> <i>P. pemicious</i> <i>P. perfiliewi</i>	<i>Canis familiaris</i>	
<i>L. major</i>	LCZ	<i>P. papatasi</i>	<i>Psammomys obesus</i> <i>Meriones spp</i>	
<i>L. killicki</i>	LCC	<i>P. sergenti</i>	<i>Ctenodactylus gundi</i>	

I.7. Diagnostic des leishmanioses

Le diagnostic des leishmanioses repose sur la mise en évidence du parasite (par culture) ou de son ADN (par la technique PCR, Polymerase Chain Reaction) dans différents prélèvements effectués à partir de lésions cutanées, du sang, des ganglions, ou de la moelle osseuse. Des techniques indirectes comme la sérologie, visant à mettre en évidence la présence d'anticorps anti-*Leishmania*, sont aussi utilisées.

L'examen microscopique peut être réalisé à partir de frottis de moelle osseuse ou cutané. La mise en évidence du parasite intracellulaire est réalisée au microscope après coloration par

Giemsa. Des cultures parasitaires peuvent être réalisées à partir de ces mêmes prélèvements, afin de détecter le parasite sous sa forme promastigote.

Le diagnostic moléculaire par PCR peut s'effectuer à partir de prélèvements cutanés, de moelle osseuse ou sanguins. Cette technique permet d'identifier non seulement la présence du parasite mais aussi l'espèce infectante. Cette méthode a l'avantage d'être très sensible, rapide et permet l'identification de l'espèce parasitaire en cause ([Wortmann et al., 2005](#)). Le coût élevé de certains traitements ainsi que leur toxicité justifie le recours au diagnostic parasitologique de certitude. La PCR est aussi utile dans le suivi thérapeutique par quantification de la charge parasitaire chez les patients atteints d'une LV ([Verma et al., 2010](#)).

La sérologie peut faire appel à plusieurs techniques différentes (ELISA, Immunofluorescence indirecte etc), elle est considérée comme un élément majeur du diagnostic de la LV, mais n'est pas utile pour les formes cutanées et cutanéomuqueuse, pour lesquelles les réponses anticorps ont un rôle marginal.

L'intradermoréaction (IDR) à la leishmanine est peu utilisée pour le diagnostic parce qu'elle ne permet pas la distinction entre une infection récente et une infection résolue. Elle est négative au cours de la phase active de la LV et ne positive qu'après traitement ([Pearson et Sousa, 1996](#)). L'IDR est surtout utilisée dans les études épidémiologiques pour déterminer la prévalence de l'infection ([Sassi et al., 1999](#); [Ben Salah et al., 2005](#); [Bettaieb et al., 2014](#)).

I.8. Traitement des leishmanioses

Le traitement de la leishmaniose dépend de plusieurs facteurs, parmi lesquels la forme clinique, les affections concomitantes et l'espèce parasitaire. Aucun traitement actuel n'est dépourvu d'effets secondaires ou de contraintes logistiques liées à son administration. Par ailleurs, toxicité et résistance aux molécules employées, ont été décrits ([Ponte-Sucre et al., 2017](#)).

Les Antimoniés pentavalents (contenant de l'antimoine), comme l'antimoniote de méglumine (Glucantime®), ont été développés en 1945 et restent le traitement de premier choix pour la LV à *L. infantum* et la LC dans la plupart des régions du monde. Le traitement est peu onéreux et convient donc aux zones d'endémie à revenu faible. Les antimoniés ont de nombreux effets secondaires et sont contre-indiqués en cas d'insuffisance rénale, cardiaque et/ou hépatique et nécessitent un suivi biologique et clinique ([Ponte-Sucre et al., 2017](#)).

Une autre molécule utilisée pour le traitement des leishmanioses est l'Amphotéricine B (Fungizone®). C'est une molécule antifongique et anti-leishmanienne. Elle est surtout utilisée

dans le traitement des leishmanioses graves (viscérales et muqueuses) (Amato *et al.*, 2008) ou résistantes aux antimoniés. Cette molécule représente donc une solution au problème de la résistance. Les formulations lipidiques d'amphotéricine B (AmBisome) sont moins toxiques que les amphotéricines B deoxycholate. Ce traitement bénéficie du meilleur index thérapeutique et est désormais proposé en première intention en Europe, aux états unis et au Brésil (Gentilini, 2012).

La Pentamidine commercialisée sous le nom de Pentacarinat® est surtout utilisée dans le traitement des LC en cure courte.

La Miltéfosine (Impavido®) est le premier médicament oral disponible pour le traitement de la LV et la LC (Sindermann et Engel, 2006). Il possède une activité immunomodulatrice et il est efficace et moins toxique que la pentamidine ou les antimoniés. Il est caractérisé par son efficacité et sa tolérance, mais il est contre-indiqué chez la femme enceinte. Les autres anti-leishmaniens comme l'aminosidine sulfate, ou paromomycine sont surtout utilisés pour traiter la LV à *L. donovani* en Inde et la LC à *L. major*.

II. Réponses immunitaires dirigées contre le parasite *Leishmania*

La piqûre d'un phlébotome infecté par le parasite, s'accompagne de l'activation rapide du système immunitaire inné non spécifique. Ce dernier fait intervenir les protéines du complément ainsi que certaines populations cellulaires comme les neutrophiles, les macrophages et les cellules NK «Natural Killer». Une infiltration des neutrophiles et un recrutement des macrophages sont généralement observés quelques heures après l'infection. Les promastigotes sont alors phagocytés par ces cellules. Les parasites sont aussi capturés par les CD qui migrent vers les ganglions lymphatiques pour assurer la présentation antigénique aux LT naïfs, permettant de les stimuler. Ces derniers se différencient en LT effecteurs producteurs de cytokines. La différenciation des LT spécifiques des antigènes (Ags) de *Leishmania* en sous populations cellulaires distinctes (Th1, Th2, Th17 et T régulateurs) est décisive dans la détermination et l'orientation de la réponse immune adaptative anti-*Leishmania*. Elle est principalement gouvernée par un ensemble de paramètres immunologiques (environnement cytokinique et interaction entre les différentes cellules) et parasitologiques (virulence du parasite) et assure la mise en place de la protection contre l'infection ou, au contraire, est associée à l'aggravation de la maladie (Alexander et Brombacher, 2012; Scott et Novais, 2016; Rossi et Fasel, 2018).

La **figure 6** représente les interactions initiales entre le parasite et le système immunitaire inné ainsi que l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Toutefois, cette chronologie reste hypothétique.

II.1. Interactions initiales entre le parasite et les cellules phagocytaires: La réponse immune innée

La réponse immunitaire innée, non spécifique constitue la première ligne de défense face à l'infection par *Leishmania*. Cette réponse fait intervenir les cellules phagocytaires (neutrophiles, macrophages, CD et monocytes), les cellules lymphocytaires NK et les molécules du complément. Le contrôle du parasite durant les premières phases de l'infection dépend de l'action coordonnée de ces divers acteurs du système immunitaire innée de l'hôte.

La piqûre par le phlébotome infecté s'accompagne assez rapidement de l'activation du système du complément. Le fragment C3b du complément facilite la formation du complexe d'attaque membranaire CAM (C5b-C9) et sa fixation à la surface du parasite afin de le lyser (**Figure 6-1**). La fixation du CAM peut être inhibée par des molécules de virulences du parasite comme le lipophosphoglycane (LPG) et la protéase GP63 (**Gurung et Kanneganti, 2015**).

Parmi les phénomènes d'échappement du parasite durant ces premières étapes, son opsonisation par les fragments C3b et C3bi (C3b inactivé), qui va faciliter sa capture par les cellules phagocytaires comme les neutrophiles et les macrophages, à travers la fixation sur le récepteur CR3 (récepteur du complément 3). L'opsonisation du parasite par des anticorps facilite aussi sa pénétration dans les cellules phagocytaires comme les CD, via le récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines (FcγR) (**Woelbing et al., 2006**).

Quelques heures après l'inoculation du parasite, les neutrophiles sont les premières cellules à atteindre le site d'infection (**Chang, 1981; Laskay et al., 2008; Peters et al., 2008**). Ces cellules ont la capacité de phagocyter les promastigotes mais les parasites sont incapables de se différencier en amastigote à l'intérieur des neutrophiles (**Mollinedo et al., 2010**) (**Figure 6-2**).

Une fois phagocytés, les parasites entraînent l'apoptose des neutrophiles qui libèrent des chimiokines comme le MIP-1β, permettant le recrutement des macrophages au niveau du site inflammatoire (**van Zandbergen et al., 2004**). Les macrophages phagocytent les fragments apoptotiques des neutrophiles contenant aussi le parasite, et ce dernier peut pénétrer de façon silencieuse à l'intérieur des macrophages et continuer sa multiplication (**Laskay et al., 2003**). Les neutrophiles sont donc utilisés par le parasite comme cheval de Troie pour pénétrer à

l'intérieur des macrophages (**Gueirard et al., 2008**). Il a aussi été démontré que le statut apoptotique ou nécrotique des neutrophiles phagocytés par les macrophages infectés pouvait influencer le devenir intracellulaire du parasite dans le macrophage (**Afonso et al., 2008**). Les neutrophiles peuvent libérer des pièges extracellulaires composés par des filaments d'ADN qui favorisent l'immobilisation et la mort des parasites extracellulaires (**Guimaraes-Costa et al., 2009**).

Les cellules 'tueuses naturelles' ou NK sont aussi recrutées au niveau des sites de l'infection, probablement, juste après les neutrophiles (**Thalhofer et al., 2011**). Les NK sont la première source d'IFN- γ précoce qui favorise la différenciation des cellules T CD4⁺ en cellules de type Th1 impliquées dans la protection contre le parasite (**Diefenbach et al., 1998**). Une infiltration abondante des cellules NK a été décrite au niveau des sites de cicatrisation alors que le nombre de ces cellules diminue au cours d'une infection progressive, suggérant un rôle protecteur des cellules NK au cours de la leishmaniose humaine (**Pereira et al., 2009**).

Les macrophages sont importants dans l'établissement de l'infection et dans la persistance du parasite à l'intérieur de l'hôte. C'est la seule cellule qui va permettre la différenciation du promastigote métacyclique en amastigote et sa multiplication intracellulaire.

Cette cellule est aussi la seule cellule capable d'éliminer le parasite lorsqu'elle est activée:

Une fois à l'intérieur des macrophages, les promastigotes se différencient en amastigotes au sein des vacuoles parasitophores. Ces vacuoles se caractérisent par un pH acide et contiennent des quantités importantes de protéines lysosomales ainsi que des protéines impliquées dans les processus de dégradation et d'apprêtement des Ags. Les leishmanies sont capables de résister à l'environnement hostile des vacuoles parasitophores (**Podinovskaia et Descoteaux, 2015**). Le parasite utilise des stratégies pour assurer sa survie à l'intérieur du macrophage parmi lesquelles sa capacité à bloquer partiellement la production de dérivés actifs d'oxygène et du monoxyde d'azote (NO) qui sont fatales pour le parasite. Ce dernier, peut également inhiber la sécrétion de l'IL-12 macrophagique, cytokine déterminante pour la protection (**Reiner et Locksley, 1995; Carrera et al., 1996; Podinovskaia et Descoteaux, 2015**) et à induire la production de molécules immunorégulatrices telles que l'IL-10 et le Transforming growth factor beta (TGF- β), connues pour leur capacité à inhiber les fonctions macrophagiques (**Kane et Mosser, 2001**).

Les CD constituent aussi une population cellulaire majeure intervenant lors des premières phases de l'infection. Ces cellules sont les principales cellules présentatrices (CPA) d'Ags leishmaniens aux cellules T naïves et donc les principales cellules initiateuses de la réponse immunitaire adaptative anti-*Leishmania* (**von Stebut et al., 1998**) (**Figure 6-3**). Les CD sont

capables de phagocyter les leishmanies via les récepteurs CR1 et CR3, la lectine de type C DC-SIGN et les récepteurs aux IgG, FcγRI et FcγRIII. Ces cellules sont aussi capables de produire différentes cytokines telles que l'IL-12, l'IL-10 et l'IFN-γ (Soong, 2008). Au début de l'infection par *Leishmania*, les CD représentent la source majeure d'IL-12, cytokine favorisant la différenciation des cellules T naïves en lymphocytes de type Th1 impliquées dans la protection (von Stebut *et al.*, 1998; Martinez-Lopez *et al.*, 2015) (Figure 6-3).

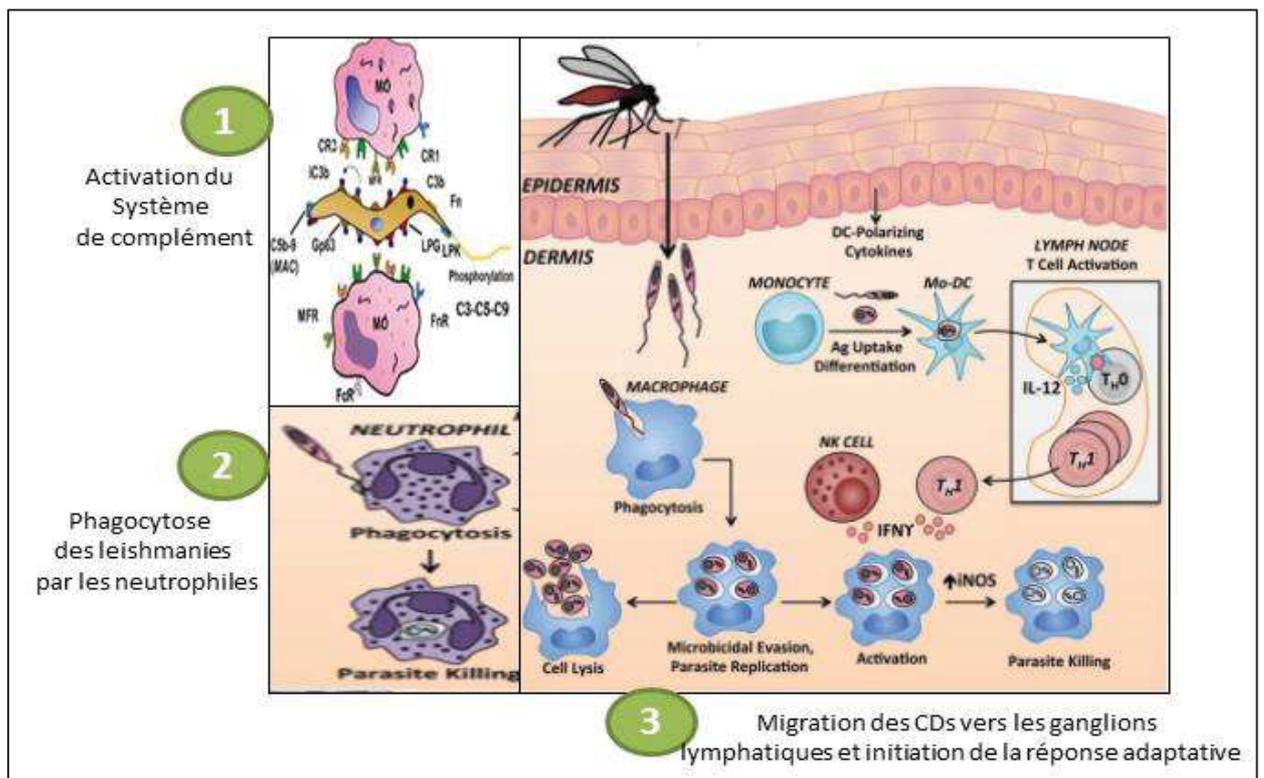


Figure 6. Interactions initiales entre le parasite et le système immunitaire inné (Scorza *et al.*, 2017) (avec modification)

L'inoculation du parasite au niveau du derme s'accompagne de l'activation du complément.

1-La molécule C3b du complément est inactivée par la molécule GP63. Le C3b inactivé (iC3b) se lie aux antigènes GP63 ou LPG facilitant le processus de phagocytose du parasite par les macrophages. **2-** Les neutrophiles sont rapidement recrutés au niveau du site de l'infection. Ces cellules sont capables de phagocyter les parasites parmi lesquels certains peuvent survivre jusqu'à ce que les neutrophiles subissent l'apoptose. Les fragments apoptotiques des neutrophiles infectés vont être phagocytés par les macrophages, ce qui induit la sécrétion de molécules anti-inflammatoires par ces cellules favorisant ainsi la réplication intracellulaire du parasite. **3-** Une fois à l'intérieur des macrophages, le parasite utilise une variété de mécanismes de virulence pour supprimer la réponse leishmanicide de la cellule hôte. Les macrophages infectés peuvent faciliter la survie et la réplication intracellulaire du parasite, ou peuvent être exposés à des signaux activateurs comme l'IFN-γ, produit principalement par les cellules Th1 ou les NK. L'IFN-γ régule positivement l'iNOS, une enzyme produisant l'oxyde nitrique (NO), molécule toxique pour le parasite. Les CD peuvent également phagocyter le parasite et migrer vers les ganglions lymphatiques pour présenter les antigènes du parasite aux cellules T CD4 + naïves et initier la réponse adaptative. IFN-γ: Interféron gamma; IL-12: interleukine-12; iNOS: oxyde nitrique synthase inductible; TH0: T CD4+Naïve; CR1: Récepteur du complément 1; CR3: Récepteur du-complément 3; FcR : Récepteur pour le Fc des Immunoglobulines ; Fn: Fibronectine; CAM: Complexe d'attaque membranaire

II.2. La réponse immune adaptative au cours des leishmanioses

II.2.1. Réponse T CD4+

II.2.1.1. Réponse T CD4+ au cours de la leishmaniose expérimentale murine

Le modèle expérimental murin a apporté les premiers arguments en faveur de l'implication et l'importance des sous populations T CD4+ Th1 et Th2 dans l'évolution de l'infection par *Leishmania* (Scott *et al.*, 1988; Heinzl *et al.*, 1989; Sacks et Noben-Trauth, 2002). C'est aussi par l'étude des souris infectées par des leishmanies qu'une partie des mécanismes gouvernant la différenciation des LT CD4+ naïfs en cellules de type Th1 productrices d'IFN- γ ou en cellules Th2 productrices d'IL-4, IL-5 et IL-13, a été élucidée.

Les souris C57BL/6 sont résistantes à l'infection expérimentale par *L. major* et développent une maladie qui régresse spontanément et qui confère une immunité durable et spécifique à la réinfection. En revanche, les souris BALB/c sont sensibles à l'infection par *Leishmania* et développent une maladie qui évolue vers la viscéralisation du parasite aboutissant à la mort de l'animal. La résistance chez la souris C57BL/6 a été corrélée au développement d'une réponse cellulaire de type Th1 associée à la production de cytokines impliquées dans la protection comme l'IL-12 et l'IFN- γ . L'IFN- γ est responsable de l'activation des fonctions leishmanicides du macrophage. Cette activation est principalement due à l'induction par l'IFN- γ de l'expression de la NO synthase (iNOS), une enzyme qui catalyse la synthèse d'un composé toxique pour les amastigotes, le monoxyde d'azote (NO) (Bogdan *et al.*, 2000; Kima et Soong, 2013). L'IL-12 est aussi une cytokine clé dans la génération d'une réponse protectrice Th1 contre l'infection et est nécessaire au maintien des cellules Th1 durant l'infection (Pakpour *et al.*, 2008). Il a aussi été démontré que le TNF- α agissait en synergie avec l'IFN- γ pour activer les macrophages à éliminer les parasites (Wilhelm *et al.*, 2001; Ritter *et al.*, 2004) (Figure 7).

L'exploration de la réponse immune chez les souris BALB/c sensibles à l'infection par *L. major* a révélé une réponse de type Th2 médiée par la production d'IL-4. Il a été démontré que les souris BALB/c déficientes en IL-4 et infectées par *L. major* demeurent susceptibles à l'infection (Noben-Trauth *et al.*, 1999) alors que d'autres travaux ont démontré que ces mêmes souris BALB/c devenaient résistantes (Kopf *et al.*, 1996; Mohrs *et al.*, 1999).

Un rôle dans la susceptibilité à l'infection expérimentale chez les souris BALB/c, a été aussi attribué à l'IL-13. Des souris BALB/c IL4R α -/-, déficientes pour la chaîne α du récepteur de l'IL-4 (IL4R α), laquelle est aussi un composant du récepteur de l'IL-13, deviennent plus résistantes à l'infection que les souris BALB/c IL4-/- déficientes en IL-4 (NobenTrauth *et*

al., 1999). Les cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 ont aussi été impliquées dans la susceptibilité des BALB/c à l'infection par *L. major*. Des BALB/c IL-10^{-/-} sont plus résistantes à l'infection par *L. major* que des souris sauvages (Kane et Mosser, 2001). L'IL-10 est capable d'inhiber les réponses Th1 mais aussi d'activer la production de l'arginase et des polyamines par les macrophages infectés, favorisant ainsi la prolifération intracellulaire des parasites (Liu et Uzonna, 2012).

Bien que ce paradigme Th1/Th2 reste toujours valable dans le modèle murin, plusieurs études ont démontré aussi l'importance d'autres populations T CD4⁺ comme les cellules T rég et les lymphocytes Th17 qui pourraient influencer le devenir de la maladie (Alexander et Brombacher, 2012; Scorza *et al.*, 2017). Il a été démontré que les T rég CD4⁺CD25⁺ jouaient un rôle crucial dans la persistance du parasite, par la production d'IL-10 au niveau des sites de l'infection chez les souris C57BL/6 (Belkaid *et al.*, 2002a; Mendez *et al.*, 2004).

La contribution des cellules Th17, dans l'évolution des leishmanioses murines, a été rapportée (Lopez Kostka *et al.*, 2009). Cette population sécrète de l'IL-17, cytokine pro-inflammatoire qui a été associée à la progression de l'infection expérimentale de souris sensibles BALB/c, en favorisant le recrutement des neutrophiles (Lopez Kostka *et al.*, 2009). Cependant, une autre étude a montré l'implication des cellules Th17 dans l'induction d'une immunité protectrice, chez des souris C57BL/6 vaccinées avec le parasite *L. major* vivant couplé au CpG DNA (Wu *et al.*, 2010).

Il est intéressant de noter que la différenciation des T CD4⁺ naïfs en sous populations Th1, Th2, T rég ou Th17 dépendrait de plusieurs facteurs tels que l'espèce parasitaire en cause (virulence), le fond génétique de l'hôte et la balance entre les cytokines secrétées au cours de la réponse innée (Gollob *et al.*, 2014) (Figure 7).

Ces cytokines impliquées dans la différenciation vont agir en modulant les activités microbicides des macrophages infectés. Un environnement cytokinique riche en IL-12 et en IFN- γ est essentiel au développement d'une réponse Th1 productrice d'IFN- γ et de TNF- α (Alexander et Brombacher, 2012). La prédominance de l'IL-4 et de l'IL-10 dans le milieu cytokinique, favoriserait la différenciation de T CD4⁺ en Th2 et en T rég, respectivement. Ces deux populations cellulaires possèdent des activités associées à la pathologie et à la régulation (Heinzel *et al.*, 1989; Scott *et al.*, 1989; Xu *et al.*, 2003).

La prédominance des cytokines IL-13, IL-6 et IL-1, orienterait la différenciation des LT CD4⁺ vers un phénotype Th17 avec sécrétion de l'IL-17 (Alexander et Brombacher, 2012).

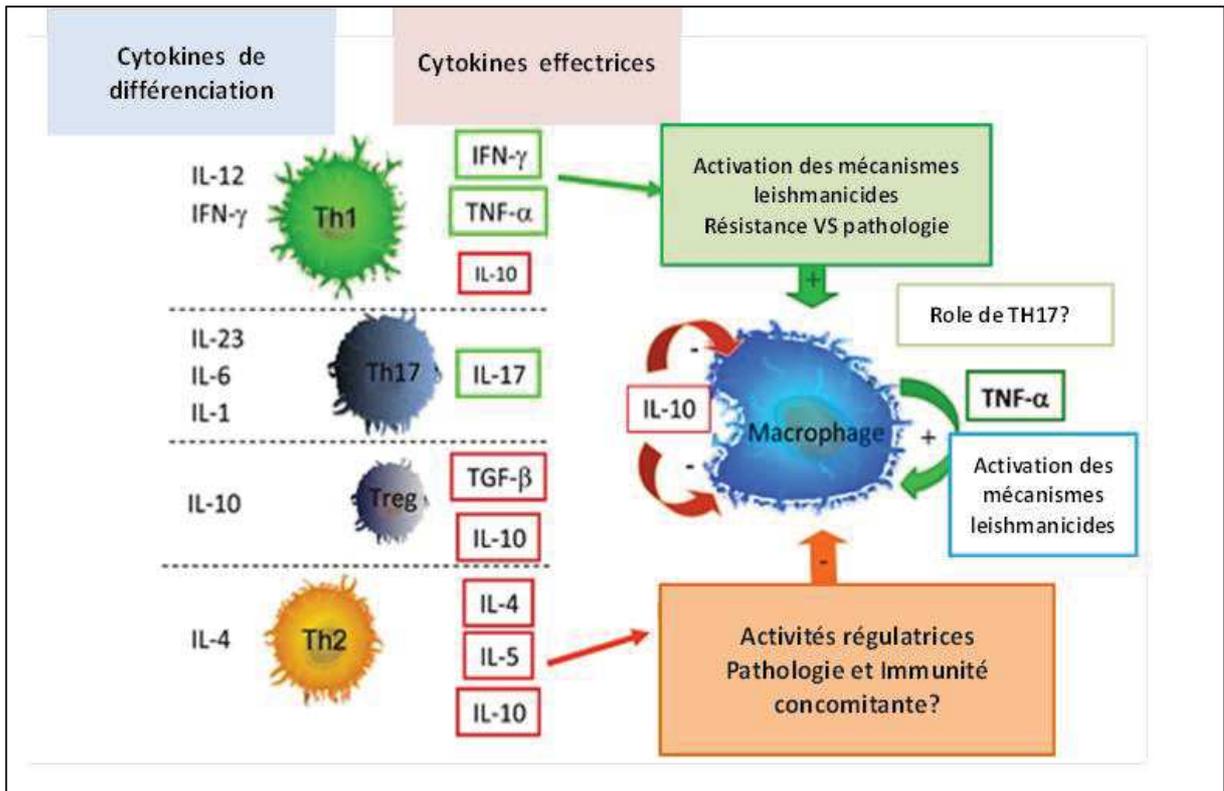


Figure 7. Interaction entre les sous populations T CD4⁺ et les macrophages infectés par *Leishmania* (Gollob *et al.*, 2014) (avec modification)

Une réponse immunitaire efficace contre le parasite *Leishmania* dépend du développement des sous populations T CD4⁺ de type Th1 capables d'activer les réponses leishmanicides des macrophages et monocytes hôtes.

La différenciation des T CD4⁺ en sous populations distinctes (Th1, Th2, T rég et Th17) dépend du microenvironnement des cytokines sécrétées lors de l'activation initiale des cellules T CD4⁺ naïves. En fonction de plusieurs facteurs (cytokines impliquées dans la différenciation, molécules de co-stimulation et génétique de l'hôte), une cellule T CD4⁺ peut se différencier en une sous-population bien déterminée qui va produire des cytokines effectrices agissant sur le devenir de l'infection (Résistance/ susceptibilité/ régulation).

II.2.1.2. Réponse T CD4⁺ au cours de la leishmaniose humaine

Chez l'homme la dichotomie Th1/Th2 n'est pas aussi clairement associée à la résistance versus susceptibilité comme c'est le cas chez la souris.

La guérison de la leishmaniose humaine est généralement associée au développement d'une immunité de longue durée contre la réinfection. Le contrôle et la résolution de l'infection sont associés au développement de LT spécifiques des Ags leishmaniens et producteurs d'IFN- γ et de TNF- α . L'IFN- γ favorise le contrôle parasitaire en activant les macrophages infectés à produire des molécules leishmanicides telles que le monoxyde d'azote (NO) capables de tuer les parasites intracellulaires (Kemp *et al.*, 1993; Kima et Soong, 2013).

La réponse immune cellulaire peut être étudiée, *in vivo*, par un test cutané à la leishmanine ou Leishmanin Skin Test (LST), ou, *in vitro*, après stimulation des PBMC de patients par des

préparations antigéniques soluble de *Leishmania*. Le LST est évalué par la mesure du diamètre de l'induration induite par l'injection intradermique de leishmanine et permet de mesurer la réaction d'hypersensibilité retardée induite par les cellules Th1 CD4+ (Sokal, 1975). Il est en général, positif chez les individus guéris, mais aussi chez des individus asymptomatiques (Ben Salah *et al.*, 2005). Le LST constitue un indicateur utile au cours des études épidémiologiques et des études évaluant des candidats vaccins, puisqu'il permet d'estimer l'exposition au parasite et la prévalence de l'infection (Ben Salah *et al.*, 2005; Bettaieb *et al.*, 2014).

Selon l'espèce parasitaire en cause (espèces dermatropes ou viscérotropes de l'ancien ou du nouveau monde), la forme clinique et le statut immunitaire du patient, le profil de la réponse T CD4+ varie et différentes sous populations cellulaires peuvent aussi être impliquées.

- **Réponse T CD4+ au cours de la LC due aux espèces de *Leishmania* de l'ancien monde (*L. major*)**

Des réponses de type Th1 (prolifération et production d'IFN- γ) sont généralement observées, chez des individus guéris et chez des individus LST+ n'ayant aucun antécédent de LC, après stimulation, *in vitro*, des PBMC par des Ags leishmaniens (Kemp *et al.*, 1994; Gaafar *et al.*, 1995; Sassi *et al.*, 1999; Ajdary *et al.*, 2000). Une concordance de 98% a été observée entre la réponse au LST et la prolifération, *in vitro*, aux Ags solubles de *Leishmania*, chez des individus LST+ (Sassi *et al.*, 1999).

Des analyses par cytométrie de flux ont montré que la source cellulaire majeure de la réponse proliférative et de la production d'IFN- γ était des cellules T CD4+ (Ajdary *et al.*, 2000). Des cellules T CD4+ mémoires effectrices productrices d'IFN- γ , ainsi que des T CD4+ mémoires centrales productrices d'IL-2, ont été décrites en réponse à une stimulation par du SLA, chez des individus immuns à la LC (Keshavarz Valian *et al.*, 2013).

Plus récemment, il a été démontré que le processus de guérison d'une LC due à *L. major* s'accompagnait d'une baisse du pourcentage des cellules T CD4+ et des cellules T CD4+ polyfonctionnelles (productrices d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-2) spécifiques des Ags leishmaniens (Lakhal-Naouar *et al.*, 2015). Une immuno-modulation, impliquant des mécanismes dépendants des cellules T CD8+, durant le processus de guérison, a été suggérée (Lakhal-Naouar *et al.*, 2015).

Au cours des formes sévères de LC, les réponses prolifératives aux Ags leishmaniens sont faibles et des taux d'IL-10 importants ont été détectés (Ajdary *et al.*, 2000). Cependant, une évolution défavorable de lésions cutanées dues à *L. major* a été associée à la présence de taux

élevés de cytokines Th2 (IL-10) mais des cytokines Th1 (IFN- γ) ont aussi été détectées (**Louzir et al., 1998**). Les auteurs ont suggéré que la sévérité de ces lésions cutanées n'était pas due à une réponse Th1 inefficace mais plutôt à l'inhibition de cette réponse par l'expression simultanée de cytokines Th2 (IL-10) (**Louzir et al., 1998**).

Récemment, une étude immuno-histochimique comparative entre 2 formes cutanées sévissant en Tunisie, LCZ due à *L. major* et LCS due à *L. infantum*, a montré une prédominance de cellules T CD4+ dans les 2 types de lésions, des taux d'ARNm de l'IFN- γ plus élevés dans les lésions LCS et des taux d'ARNm de l'IL-8 plus élevés dans les lésions LCZ (**Bousoffara et al., 2019**).

D'autres cytokines, comme l'IL-13 et l'IL-17, ont aussi été évaluées au cours de l'infection cutanée humaine par les espèces de l'ancien monde.

L'IL-13, une cytokine Th2, a été associée à un profil Th2 et a été impliquée dans la susceptibilité à l'infection cutanée par *L. guyanensis* (**Bourreau et al., 2001**). Des taux similaires d'IL-13, ont été démontrés chez des individus guéris de LC due à *L. major* et chez des individus sains, en réponse à une stimulation par du SLA (**Nateghi Rostami et al., 2010b**). Cependant, plus récemment, des taux significatifs d'IL-13, détectés en réponse à une stimulation par des parasites *L. major* vivants, ont été décrits chez des individus LST+ vivant en zone d'endémie de LCZ due à *L. major*, mais pas chez des individus naïfs (**Kammoun-Rebai et al., 2016**).

L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire, essentiellement produite par les cellules T CD4+, dont le rôle au cours de la leishmaniose humaine demeure mal élucidé. Cette cytokine a été impliquée dans la progression de l'infection murine par *L. major* (**Gonzalez-Lombana et al., 2013**) mais, de façon paradoxale, dans le contrôle de l'infection par *L. infantum* chez la souris (**Nascimento et al., 2015**). Récemment, elle a été décrite en réponse à une stimulation par le parasite *L. major* vivant, chez des individus immuns à la LCZ due à *L. major* mais aussi chez des individus naïfs (**Kammoun-Rebai et al., 2016**).

Concernant l'implication des T rég naturelles (exprimant les marqueurs CD25 et Foxp3), une augmentation de la fréquence de ces cellules a été détectée au cours de l'infection chronique par *L. major* (**Hoseini et al., 2012**).

La réponse cytotoxique a été aussi explorée durant l'infection humaine par *L. major*. Il a été démontré que les cellules T CD4+ y compris les T reg, était capables de produire du GrB, après une stimulation, *in vitro*, des PBMC d'individus guéris d'une LCZ, par une préparation d'Ags sécrétés/excrétés (**Naouar et al., 2014**).

- **Réponse T CD4+ au cours de la LC due aux espèces de *Leishmania* du nouveau monde**

La LC américaine (LCA) inclut (i) la LC localisée (LCL) due à *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. guyanensis* ou *L. amazonensis*, (ii) la leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) due à *L. braziliensis* et (iii) la leishmaniose cutanée diffuse (LCD) due à *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* ou *L. guyanensis*. La LCM et la LCD sont les formes les plus graves. Les infections par *L. braziliensis* peuvent conduire à des affections cutanées pouvant évoluer en des formes cutanéomuqueuse.

La phase active de LCL due à *L. braziliensis* a été associée à un profil mixte Th1/Th2 avec production de taux élevés d'IFN- γ , de TNF- α , d'IL-12, d'IL-4 et d'IL-10, alors que la guérison a été associée à une réponse Th1 avec une production importante d'IFN- γ (**Castellano et al., 2009**).

Une production excessive de TNF- α a été positivement corrélée à la taille des lésions cutanées due à *L. braziliensis* (**Oliveira et al., 2011**).

Dans les régions où la *L. braziliensis* est endémique, environ 1 à 10% des patients atteints d'une LCL progressent vers une LCM (**Torres-Guerrero et al., 2017**). En phase active de LCM, les lésions contiennent des cellules T activées ainsi que d'autres cellules inflammatoires, avec une charge parasitaire faible (**Ridley et al., 1989**). Une comparaison des profils de cytokines entre patients LCM et patients LCL, a montré des taux plus élevés d'INF- γ et de TNF- α avec des taux plus faibles d'IL-10 et de TGF- β ainsi qu'une fréquence plus élevée de cellules T CD4+ et T CD8+ activées, chez les patients LCM (**Bacellar et al., 2002**). Des taux d'IL-17 plus élevés chez des patients LCM par rapport à des patients LCL, ont permis de suggérer l'implication de cette cytokine dans la progression de la maladie (**Bacellar et al., 2009**, **Boaventura et al., 2010**, **Souza et al., 2012**). L'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-17 ont aussi été rapportés durant la phase active de la LCM (**Souza et al., 2012**).

L'absence de corrélation entre la fréquence de monocytes producteurs de TNF- α et de monocytes producteurs d'IL-10, décrite chez des patients atteints de LCM, alors que l'inverse est observé chez des patients atteints de LCL, souligne l'importance des cytokines régulatrices dans la modulation de la réponse Th1 (**Gaze et al., 2006**). La production des taux anormalement élevés de cytokines pro-inflammatoires avec une incapacité à réguler négativement cette réponse, pourrait être à l'origine des destructions tissulaires observées au cours de la LCM (**Gaze et al., 2006**; **Carvalho et al., 2007**).

Dans le cas de la LCD, de faibles taux de cytokines de type Th1 sont observés chez les patients (**Peacock et al., 2007**; **Oliveira et al., 2011**). Cependant, au niveau du site lésionnel,

la réponse immunitaire des patients atteints de LCD est similaire à celle observée au cours des LCL ([Machado et al., 2011](#)). La diminution de la réponse immunitaire de type Th1 dans le sang périphérique des patients atteints de LCD pourrait être due à l'attraction des cellules T activées vers les lésions cutanées multiples ([Machado et al., 2011](#)).

L'absence d'ulcération et la croissance incontrôlée des amastigotes chez les patients souffrant d'une LCD sont la conséquence d'une réponse immunitaire cellulaire anergique avec un nombre significativement réduit de cellules productrices d'IFN- γ , d'iNOS et d'IL-12 ([Diaz et al., 2006](#)).

- Réponse T CD4+ au cours de la LV

La majorité des individus infectés par des souches viscérotropes de *Leishmania* ne développe pas la maladie et demeure asymptomatique, seule une minorité d'entre eux va développer les signes cliniques d'une LV.

Une réponse T CD4+ avec sécrétion de taux élevés d'IFN- γ et d'IL-5 a été associée à l'infection asymptomatique à *L. infantum* ([Mary et al., 1999](#)). Des taux élevés d'IFN- γ et d'IL-17 ont aussi été observés au cours de l'infection asymptomatique à *L. donovani* ([Pitta et al., 2009](#)).

Au cours de la phase active de la LV, une hypergammaglobulinémie est généralement observée, avec la présence d'anticorps anti-*Leishmania*, lesquels sont inefficaces pour neutraliser le parasite, mais utiles pour le diagnostic ([Ryan et al., 2002](#)).

Cette phase active est aussi caractérisée par une IDR négative en réponse au LST, des réponses cellulaires T aux Ags leishmaniens, réduites ou absentes ([Bacellar et al., 1996](#); [Singh et Sundar, 2014](#)), et des taux élevés d'IFN- γ , de TNF- α , d'IL-10 et d'IL-6 dans le plasma ([Hailu et al., 2005](#), [Caldas et al., 2005](#), [Ansari et al., 2006](#), [Costa et al., 2012](#)). Cependant, plus récemment, des taux élevés d'IFN- γ ont été détectés dans le sang total (QuantiFERON) de patients en phase active de LV, de façon similaire à des individus guéris de LV ou ayant une infection asymptomatique ([Singh et al., 2012](#)). La détection d'IL-10 en même temps que l'IFN- γ chez les patients en phase active a permis de les distinguer des autres groupes d'individus ([Singh et al. 2012](#)).

Des taux sériques élevés d'IL-10 et de TGF- β chez des patients atteints de LV, ont été associés à la gravité de cette infection ([Holaday et al., 1993](#); [Kurkjian et al., 2006](#); [Saha et al., 2007](#)). Le TNF- α a aussi été associé à la progression de la maladie ([Gama et al., 2004](#)).

Globalement, il semblerait que, durant la phase active de la LV, la réponse immune cellulaire T soit dominée par la présence de taux élevés de cytokines jouant un rôle down-modulateur,

comme l'IL-10 et le TGF- β , toutes deux empêchant la mise en place d'une réponse Th1 efficace et protectrice.

- Réponse T CD4+ polyfonctionnelle

Plusieurs études ont démontré que la seule évaluation de la production d'IFN- γ en tant qu'indicateur de protection n'était pas suffisante, puisque cette cytokine était aussi observée durant des phases actives et évolutives de la maladie.

Des études ont montré que l'efficacité de la protection conférée par les cellules effectrices ou mémoires était directement liée à leur capacité à sécréter plusieurs cytokines en même temps, en réponse à une activation (Darrah *et al.*, 2007; Lindenstrom *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2015).

Il a été rapporté que des cellules T CD4+ ne sécrétant que l'IFN- γ avaient une faible capacité à se développer en cellules T mémoire en comparaison avec les cellules productrices à la fois d'IL-2 et d'IFN- γ (Wu *et al.*, 2002; Foulds *et al.*, 2008). Le rôle des cellules T polyfonctionnelles a été démontré au cours des leishmanioses (Darrah *et al.*, 2007, Macedo *et al.*, 2012). Il a été rapporté que des cellules T CD4+ mémoire centrales produisant de façon simultanée l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-2, constituaient un bon indicateur de protection chez des souris vaccinées par un Ag leishmanien MML et un ligand de TLR-9 (CpG) (Darrah *et al.*, 2007). Les cellules T CD4+ multifonctionnelles ont aussi été détectées chez des individus guéris de LCL (Macedo *et al.*, 2011).

II.2.2. Réponse T CD8+

Les cellules T CD8+ ont été impliquées, avec les T CD4+, dans le contrôle de l'infection expérimentale murine ainsi que dans l'établissement d'une réponse mémoire efficace, à travers leur capacité à produire de l'IFN- γ (Okwor *et al.*, 2014).

Chez la souris, le rôle protecteur des LT CD8+ a initialement été décrit lors de la réinfection (Muller, 1992; Huber *et al.*, 1998). Cependant, lorsque des modèles de souris infectées avec de faibles doses de parasites ont été utilisés, mimant l'infection naturelle, un rôle crucial a été rapporté pour les LT CD8+, dans le contrôle de l'infection primaire (Belkaid *et al.*, 2002b; Uzonna *et al.*, 2004; Okwor *et al.*, 2014).

La localisation du parasite dans les vacuoles parasitophores du macrophage a rendu difficile la compréhension des voies d'activation des T CD8+, à savoir la présentation des Ags de *Leishmania* aux cellules T CD8+ par les molécules du CMH de classe I (CMH-I). Des travaux ont permis de suggérer que les Ags de *Leishmania* reconnus par les T CD8+ spécifiques seraient principalement des Ags de surface ou sécrétés (Kima *et al.*, 1997; Bertholet *et al.*, 2005). Cependant, une autre étude évaluant le potentiel vaccinal de protéines histones de

Leishmania chez la souris, a rapporté la présence de cellules T CD8⁺ spécifiques des histones, lesquelles sont des protéines intracellulaires (**Iborra et al., 2004**).

Le mécanisme par lequel des Ags exogènes sont présentés par les molécules CMH-I aux cellules T CD8⁺, s'appelle présentation croisée de l'Ag (cross-présentation) et les CPA impliquées dans ce mécanisme sont, généralement, les CD ou les macrophages (**Lopez et al., 1993; Rodriguez et al., 1999; Guermonprez et al., 2003; Houde et al., 2003; Bertholet et al., 2006**).

La présentation des Ags exogènes de *Leishmania* aux cellules T CD8⁺ spécifiques pourrait se faire à travers les phagosomes, de façon indépendante des transporteurs TAP (Transporter associated with Antigen Processing) (**Houde et al., 2003; Bertholet et al., 2006**), ou après fragmentation dans le cytosol par le protéasome et présentation via la voie classique (**Kima et al., 1997**).

Au cours de l'infection cutanée humaine par *Leishmania*, les cellules T CD8⁺ ont été impliquées à la fois dans la protection et dans la pathogénèse.

La réponse immune protectrice observée chez des individus ayant guéris d'une LCZ due à *L. major* est médiée non seulement par des cellules T CD4⁺ Th1, mais aussi par des cellules T CD8⁺, toutes deux productrices d'IFN- γ (**Nateghi Rostami et al., 2010a**).

Une augmentation du pourcentage des cellules T CD8⁺ a été associée à la guérison des lésions d'une LCL, ML ou LCD, chez des individus infectés par *L. major*, *L. braziliensis* ou *L. mexicana* (**Salaiza-Suazo et al., 1999; Da-Cruz et al., 2002; Da-Cruz et al., 2005**).

Un nombre élevé de cellules T CD8⁺ a été détecté dans les lésions de LCL, forme la moins grave de l'infection par *L. mexicana*, en comparaison avec de faibles taux dans les lésions de LCD, forme la plus grave de la maladie, suggérant que la réponse T CD8⁺ est associée au contrôle de l'infection chez les patients LCL alors que la chronicité de l'infection observée chez les patients LCD, serait associée à un appauvrissement en T CD8⁺ (**Hernandez-Ruiz et al., 2010**).

L'implication des cellules T CD8⁺ dans la pathogénicité a surtout été rapportée dans les lésions cutanées sévères dues à *L. braziliensis*.

Le recrutement de cellules T CD8⁺ productrices de granzyme A, indicateur de cytotoxicité, a été associé à la progression des lésions chez des patients ayant une LC due à *L. braziliensis* (**Faria et al., 2009**).

Les cellules T CD8⁺ cytotoxiques ont été impliquées dans l'exacerbation des lésions cutanées et muco-cutanées au cours de l'infection humaine par *L. braziliensis* (Barral-Netto *et al.*, 1995).

L'implication des T CD8⁺ a aussi été rapportée pour la forme viscérale de la leishmaniose.

L'analyse du profil cytokinique de clones T spécifiques de *Leishmania* générés à partir d'individus asymptomatiques ou guéris d'une LV humaine, a permis de suggérer la contribution des cellules T CD8⁺ productrices d'IFN- γ , à la résistance à l'infection par *L. infantum* (Mary *et al.*, 1999).

L'analyse des marqueurs CD18 (molécule médiatrice de l'adhésion aux composants des matrices extracellulaires) et CD45RO des cellules T CD8⁺, chez des patients ayant une LV humaine due à *L. chagasi* (durant la phase active et après traitement), a permis de suggérer, que durant la phase active de la LV, il y aurait une migration/rétention des cellules T CD8⁺ mémoires dans la moelle osseuse et, par conséquent, une altération des réponses T CD8⁺ en périphérie (Clarencio *et al.*, 2009).

Des cellules T CD8⁺ productrices d'IL-10 ont été identifiées au cours de la PKDL et chez des patients infectés par *L. guyanensis* (Bourreau *et al.*, 2007; Saha *et al.*, 2007).

Le rôle protecteur des cellules T CD8⁺ a généralement été corrélé à leur capacité à sécréter l'IFN- γ (Nateghi Rostami *et al.*, 2010a), tandis que la cytotoxicité a généralement été corrélée à la pathogénicité (Santos Cda *et al.*, 2013) (Figure 8).

Des analyses de données transcriptomiques comparant des lésions cutanées de patients infectés par *L. braziliensis* avec des peaux normales ou des lésions LM versus LC, ont démontré l'importance de la cytotoxicité au cours de l'infection par cette espèce et l'implication de la cytotoxicité dans l'aggravation de l'infection (Maretti-Mira *et al.*, 2012; Novais *et al.*, 2013; Santos Cda *et al.*, 2013).

Un modèle hypothétique sur les mécanismes d'action des cellules T CD8⁺ cytotoxiques dans la pathogénicité de la LC due à *L. braziliensis*, a été récemment proposé, basé sur les données d'analyse transcriptomiques identifiant des voies clés induites par *L. braziliensis* au niveau du site lésionnel (Novais *et al.*, 2015) (Figure 8). Dans ce modèle, des chémokines vont permettre le recrutement des cellules T CD8⁺ au niveau du site lésionnel. Ces cellules vont être activées en T CD8⁺ cytotoxiques par les Ags dégradés par l'immunoprotéasome. La lyse des cellules infectées par les T CD8⁺ cytotoxiques s'accompagne de la libération de molécules comportant des motifs DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns) lesquelles vont amplifier la réponse inflammatoire. L'IL-1b est parmi les cytokines inflammatoires

présente à des taux élevés dans les lésions des patients infectés par *L. braziliensis* (Novais et Scott, 2015) (Figure 8).

Certains travaux ont rapporté l'implication du GrB produit par les T CD8+ au cours des LC. Des études ont démontré son rôle dans la pathogenèse (Boussofara *et al.*, 2004; Santos Cda *et al.*, 2013) alors que d'autres ont rapporté des arguments en faveur de l'implication de la cytotoxicité médiée par le GrB dans la protection (Kaushal *et al.*, 2014; Boussofara *et al.*, 2018). Un rôle bénéfique de la cytotoxicité T CD8+ chez des individus infectés par *L. major*, a aussi été attribué à la voie dépendante de FasL (Eidsmo *et al.*, 2005).

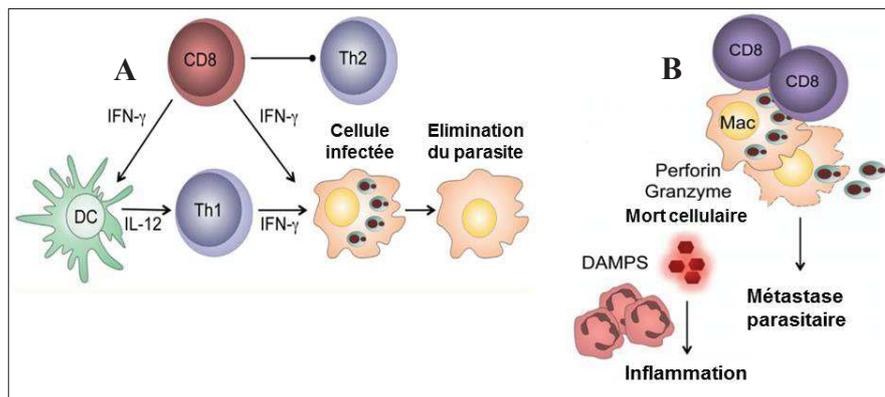


Figure 8. Le double rôle de LT CD8+ au cours des leishmanioses (Novais et Scott, 2015) (avec modification)

- A- Rôle protecteur des T CD8+: Les cellules T CD8+ produisant de l'IFN- γ activent les macrophages, ce qui conduit à l'élimination du parasite. L'IFN- γ produit par les LT CD8+ induit la production accrue d'IL-12, ce qui favorise le développement des cellules Th1 protectrices. Avec de faibles doses de parasites, Les cellules T CD8+ sont essentielles pour bloquer le développement des cellules Th2
- B- Rôle pathologique de T CD8+ (modèle hypothétique basé sur les données d'analyse transcriptomiques identifiant des voies clés induites par *L. braziliensis* au niveau du site lésionnel): Les cellules T CD8+ spécifiques de *Leishmania* migrent vers les lésions et lysent les cellules infectées, conduisant à la libération des molécules pro-inflammatoires, incluant des molécules contenant des motifs DAMPS (Damage-Associated Molecular Patterns). La lyse des cellules infectées conduit à la libération des parasites ce qui peut favoriser leur propagation.

II.2.3. Lymphocytes B et réponse humorale

Le parasite *Leishmania* est principalement intracellulaire et la réponse humorale ne semble pas jouer un rôle important au cours de l'infection. Chez la souris, il a été démontré que les anticorps développés contribuent à la progression de la maladie via l'activation des LT rég et l'induction d'IL-10 (Miles *et al.*, 2005). Chez l'homme, des titres élevés en anticorps spécifiques peuvent être observés au cours de la LCL, la LMC, la LD et la LV (Gutierrez *et al.*, 1991; Ozbilge *et al.*, 2006).

La LV est aussi caractérisée par une hypergammaglobulinémie avec des taux élevés en IgG, IgM et IgE (Ryan *et al.*, 2002; Ravindran *et al.*, 2004). Il a été démontré que ces anticorps anti-*Leishmania* étaient inefficaces pour neutraliser le parasite, mais utiles pour le diagnostic.

II.3. Mécanisme de développement de la résistance et de la mémoire immunitaire contre les leishmanioses

La plupart des individus ayant déjà contracté l'une des formes de leishmanioses au cours de leur vie deviennent résistants à une seconde infection. Cette résistance prouve la capacité de ces individus à développer une mémoire immunologique durant l'infection primaire.

Les cellules T mémoires sont classiquement divisées en deux sous populations distinctes: Les cellules T mémoires centrales (TCM) et les cellules T mémoires effectrices (TEM). Cette distinction a été basée sur l'expression des marqueurs de surface, le tropisme tissulaire, la capacité proliférative et les fonctions effectrices (Sallusto *et al.*, 1999; Farber *et al.*, 2014).

Les TCM sont caractérisées par l'expression des marqueurs d'adhésion CD62L et CCR7, ce qui leur permet de circuler à travers le sang et les ganglions lymphatiques. Les TCM prolifèrent rapidement lors d'une stimulation antigénique et fournissent ainsi un pool de cellules T différenciées et spécifiques de l'Ag pour combattre une seconde infection. Cependant, les TEM, n'expriment pas le CD62L et le CCR7, circulent à travers le sang et ont une fonction effectrice comme la sécrétion des cytokines et la cytotoxicité (Sallusto *et al.*, 1999; Sallusto *et al.*, 2004). Les TEM se différencient des T effecteurs par leur capacité à persister après l'élimination du pathogène.

Plusieurs équipes ont tenté d'élucider les mécanismes de développement de la mémoire immunologique chez la souris comme chez l'homme au cours de l'infection par *Leishmania* (Scott *et al.*, 2004; Glennie et Scott, 2016).

II.3.1. Réponse mémoire développée dans le modèle murin

Chez des souris C57BL/6, il a été démontré que la résistance à l'infection par *L. major* était corrélée à une « immunité concomitante » correspondant à la persistance d'un faible nombre de parasite permettant de maintenir un pool de cellules effectrices pouvant agir rapidement lors de la réinfection (Belkaid *et al.*, 2002a). La persistance des parasites est assurée par des cellules T rég CD4⁺ CD25⁺ qui suppriment, via l'IL-10, la capacité des T effectrices CD4⁺ CD25⁻, à éliminer le parasite (Belkaid *et al.*, 2002a). D'autres études ont rapporté l'importance de la persistance du parasite dans l'établissement d'une mémoire efficace et protectrice chez la souris (Uzonna *et al.*, 2001). Il a été démontré que l'immunité stérilisante

associée à la clairance parasitaire induite soit par l'injection d'un faible nombre de parasites (**Uzonna et al., 2001**), soit par blocage de la cytokine régulatrice, l'IL-10 (**Belkaid et al., 2002a**), entraînait la perte de la mémoire immunologique protectrice.

Plus tard, d'autres données ont permis de suggérer que des TCM étaient capables de persister longtemps après l'infection même en absence de parasites, contrairement aux TEM dont le maintien, nécessitait la présence du parasite (**Zaph et al., 2004**). Ainsi, Zaph et collaborateurs ont démontré que le transfert de cellules TCM issues de souris immunisées avec une souche mutante de *L. major* (*dhfr-ts-*) non pathogène et incapable de persister *in vivo*, à des souris naïves, étaient capables de leur conférer un état de résistance (**Zaph et al., 2004**). Ces auteurs ont démontré l'implication de 2 populations cellulaires T CD4+ dans le maintien d'une immunité protectrice contre l'infection par *L. major* ; l'une T CD4+ mémoire effectrice, n'exprimant pas ou peu le CD62L, produisant de l'IFN- γ et médiatrice d'une réaction d'hypersensibilité retardée (DTH), dépendante de la persistance du parasite et à courte durée de vie, l'autre T CD4+ mémoire centrale, exprimant le CD62L, migrant vers les ganglions lymphatiques, ne produisant pas d'IFN- γ et maintenue en absence du parasite. Cette population de TCM est capable, après une seconde infection, de proliférer dans les ganglions lymphatiques, de se transformer en cellules effectrices et d'assurer une immunité protectrice (**Zaph et al., 2004 ; Scott et al., 2004**).

En se basant sur l'ensemble de ces données, une représentation schématique du développement et du maintien des sous populations T CD4+ mémoires suite à une infection par *Leishmania*, a été proposée (**Gollob et al., 2005**) (**Figure 9**).

Une troisième population de cellules T mémoires, les cellules mémoires résidentes (TRM) de phénotype CD62L- CCR7-, joue un rôle important dans la protection contre les pathogènes intracellulaires. Ces cellules occupent des sites constituant les premières barrières de protection comme la peau, les poumons et les intestins (**Masopust et al., 2001**). Le rôle protecteur des TRM a été démontré dans plusieurs infections virales (**Gebhardt et al., 2009; Jiang et al., 2012**). Glennie et collaborateurs ont été les premiers à démontrer la présence de TRM CD4+ dans la peau, après résolution de l'infection murine par *L. major* (**Glennie et al., 2015**). Les TRM générées d'une façon précoce lors de l'infection de souris C57BL/6 par *L. major*, infiltrèrent la peau et sécrètent l'IFN- γ . Ces cellules ont une longue durée de vie et ont la capacité de recruter des cellules T circulantes au niveau du site lésionnel permettant un meilleur contrôle du parasite, et persistent en absence de parasites (**Glennie et al., 2015**). Plus récemment, il a été démontré qu'elles étaient médiatrices de DTH et qu'elles joueraient un

rôle dans l'activation et le recrutement de monocytes inflammatoires (Glennie *et al.*, 2017).

Les données sur l'implication aussi bien des cellules T circulantes que des cellules résidentes TRM dans l'établissement d'une immunité protectrice contre l'infection par *Leishmania*, doivent être intégrées dans le développement d'un candidat vaccin optimal, lequel devrait être capable d'induire ces 2 populations cellulaires.

Par ailleurs, les faits que les TCM et les TRM soient maintenues en l'absence du parasite, qu'elles soient médiatrices d'une immunité protectrice et qu'elles aient une longue durée de vie, sont des données très importantes à prendre en considération pour le développement de vaccins anti-*Leishmania*.

II.3.2. Réponse mémoire développée chez l'homme

Chez l'homme, des études ont démontré que les populations T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques de *Leishmania* sont maintenues des années après la guérison d'une LC (Da-Cruz *et al.*, 2002). La réponse mémoire au cours des leishmanioses humaines reste encore mal élucidée. Le profil des T mémoires (TCM/TEM) a été caractérisé chez des volontaires guéris d'une LC due à *L. major* ou *L. tropica*, et il a été suggéré que les TCM/TEM aussi bien CD4⁺ que CD8⁺, pourraient être impliquées dans la réponse protectrice contre l'infection (Keshavarz Valian *et al.*, 2013). Il a été démontré que les TCM CD4⁺ proliféraient avec production d'IL-2, alors que les TEM ne proliféraient pas mais sécrétaient de fortes doses d'IFN- γ après stimulation par du SLA. Une baisse du pourcentage des TCM et une augmentation du pourcentage des TEM, ont été observés après stimulation par le SLA. Ce changement des proportions cellulaires a été expliqué par la capacité des TCM à se différencier en TEM après stimulation (Keshavarz Valian *et al.*, 2013). Khamesipour et collaborateurs ont démontré que l'IFN- γ détecté après stimulation des cellules T CD8⁺ mémoires totales issues d'individus guéris de LC due à *L. major* ou *L. tropica*, par du SLA, était principalement produit par des T CD8⁺ mémoires effectrices (Khamesipour *et al.*, 2012). Ces données sont similaires à celles rapportées dans le modèle murin suggérant qu'une combinaison de TEM et de TCM contribue à une réponse immune efficace lors de la réinfection, chez l'homme.

L'expansion des cellules TEM a aussi été rapportée, en réponse à une stimulation par des Ags de *Leishmania*, chez des individus guéris d'une LC due à *L. braziliensis* (Pereira-Carvalho *et al.*, 2013). Par ailleurs, la production d'IFN- γ détectée en réponse à une stimulation par du SLA, chez des individus guéris d'une LC ou LM due à *L. braziliensis*, a été attribuée aux cellules TEM (Carvalho *et al.*, 2013).

Cependant, plus récemment, il a été rapporté qu'un enrichissement en cellules TEM en même

temps qu'en cellules T cytotoxiques, pourrait être associé à la chronicité des lésions dues à *L. braziliensis* (de Oliveira Mendes-Aguiar *et al.*, 2016).

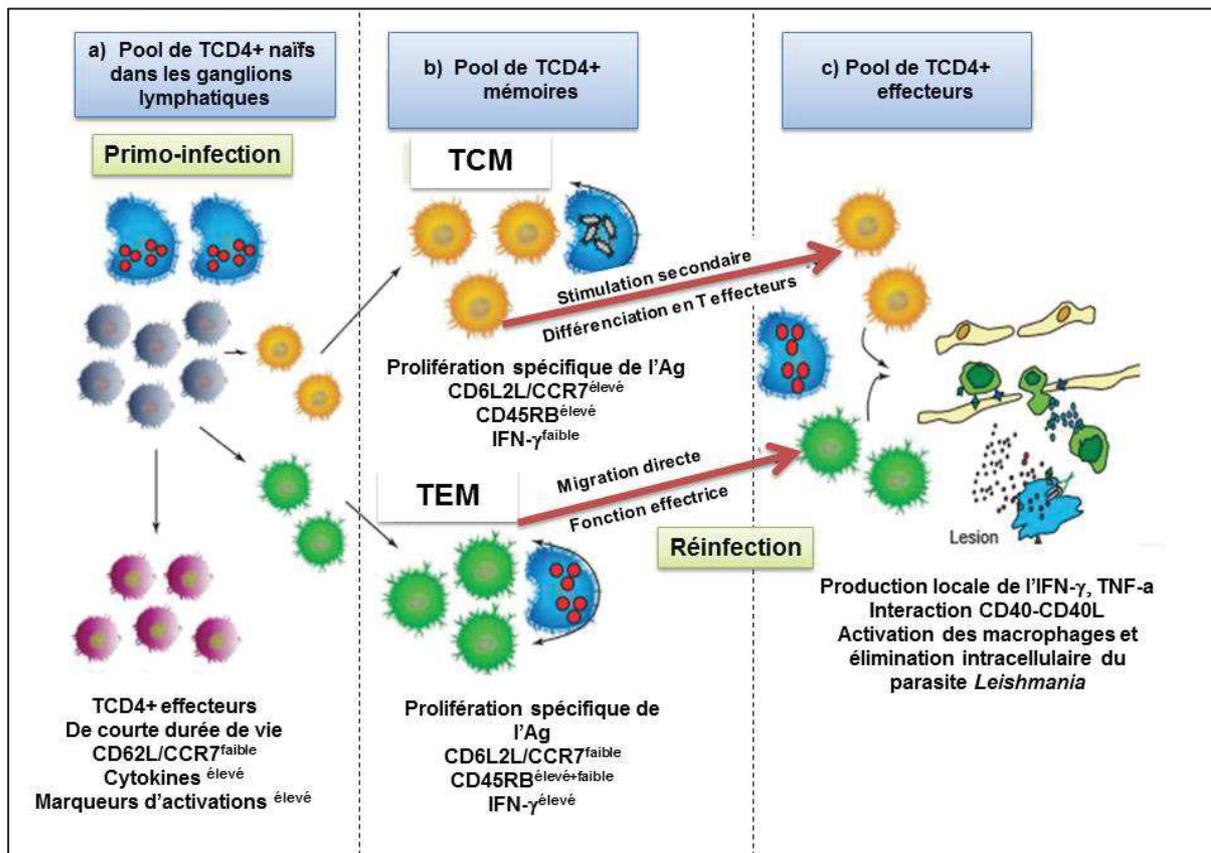


Figure 9. Développement et maintien des sous populations T CD4+ mémoires suite à une infection par *Leishmania* (Gollob *et al.*, 2005)

a) Lors de la primo-infection, les cellules T CD4+ naïves sont activées par les macrophages infectés et se différencient en cellules T CD4+ effectrices (CD62L/CCR7^{faible}, cytokines^{élevé}, marqueurs d'activation^{élevé}) productrices de cytokines. Les cellules T CD4+ effectrices interagissent avec les macrophages/monocytes infectés pour éliminer le parasite intracellulaire, augmentent leur capacité à présenter l'Ag et à activer les autres cellules T. Ces cellules quittent le ganglion lymphatique et migrent vers le site d'infection. La majorité de ces cellules effectrices meurent et les cellules mémoires sont générées. b) Deux sous populations de cellules T CD4+ mémoires sont générées: **TCM** (CD62L/CCR7^{élevé}, IFN- γ ^{faible}) et **TEM** (CD62L/CCR7^{faible}, IFN- γ ^{élevé}). c) Lors d'une seconde stimulation, les TEM vont très vite migrer vers les sites d'infection ou elles sécrètent des cytokines effectrices tandis que les TCM doivent passer par une phase d'activation et de différenciation pour générer des cellules T effectrices.

III. Vaccination contre les leishmanioses

Si un vaccin contre les leishmanioses humaines n'existe pas à ce jour, plusieurs données constituent des arguments solides en faveur de sa faisabilité. Chez l'homme, la guérison est généralement associée au développement d'une immunité à la réinfection. Chez les individus guéris, une réponse immune cellulaire spécifique des Ags parasitaires est observée aussi bien

in vivo, lors de la réaction d'hypersensibilité retardée en réponse au test cutané à la leishmanine, qu'*in vitro*, lors de la stimulation des PBMC avec des Ags leishmaniens (Ajdary *et al.*, 2000). Depuis longtemps plusieurs travaux se sont focalisés sur l'identification de candidats vaccins contre les leishmanioses.

Le développement d'un vaccin efficace est entravé par le fait que les corrélats de protection ne soient pas encore bien définis ainsi que par le manque de données relatives au développement et au maintien de la réponse T mémoire. L'histoire de la vaccination contre les leishmanioses a commencé avec les vaccins vivants ou leishmanisation. Cette pratique a, par la suite, été abandonnée et plusieurs recherches se sont focalisées sur les vaccins de première génération incluant des vaccins à base de parasites tués ou de parasites vivants atténués, les vaccins de seconde génération (sous unitaires) ou les vaccins à bases d'ADN.

III.1. Leishmanisation

Cette méthode a consisté en l'injection de parasites vivants virulents, dans des parties peu exposées du corps d'individus sains, afin de prévenir la formation de lésions laissant des cicatrices indélébiles après une infection naturelle (Okwor *et al.*, 2012). Bien que ce soit la seule stratégie de vaccination efficace chez l'homme jusqu'à nos jours, la leishmanisation a dû être abandonnée en raison de plusieurs complications comme la persistance des parasites et la probabilité de développement de lésions chroniques chez des individus immuno-déprimés (Greenblatt, 1980).

III.2. Vaccins de première génération

Les vaccins de première génération sont constitués de parasites vivants atténués, de parasites tués, ou d'extraits antigéniques bruts de *Leishmania*.

III.2.1. Vaccins à base de parasites vivants atténués

Les vaccins vivants atténués ont été utilisés pour leurs caractéristiques proches de la leishmanisation. Ils sont capables de mimer l'infection naturelle et peuvent induire des réponses immunitaires associées à une immunité durable. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour atténuer la virulence du parasite comme la culture du parasite *in vitro* à long terme (Daneshvar *et al.*, 2014), l'irradiation (Rivier *et al.*, 1993), ou encore la délétion de certains gènes de virulence (Cruz *et al.*, 1993). L'utilisation de souches de *Leishmania* non pathogènes pour l'homme, comme *L. tarentolae*, parasite infectant le lézard, a été décrite (Breton *et al.*, 2005). La vaccination avec *L. tarentolae* a été associée au développement d'une réponse

cellulaire T de type Th1 et à la protection de souris BALB/c infectées par *L. donovani* (Breton *et al.*, 2005). Cependant les risques de réversions des souches atténuées en souches virulentes ont fait qu'aucun essai clinique n'a été réalisé avec les vaccins vivants atténués chez l'homme.

III.2.2. Vaccins à base de parasites inactivés ou d'extraits parasitaires totaux

Ce type de vaccin, généralement constitués d'extraits protéiques totaux préparés à partir de parasites autoclavés ou traités par des agents chimiques et administrés avec ou sans adjuvants, ne présente pas de problèmes de réversions ou de développement incontrôlé de lésions, est facile à produire et de faible coût. Cependant, les obstacles ont consisté en des difficultés de standardisation des protocoles de production de ces vaccins dérivés de cultures parasitaires, de faibles capacités protectrices et la probabilité d'induire des réponses immunes indésirables, vu la complexité protéique.

Plusieurs essais vaccinaux contre les leishmanioses impliquant les vaccins à base d'extraits parasitaires totaux ont été réalisés sur des modèles expérimentaux et ont montré des capacités protectrices (Shargh *et al.*, 2012; Jafari *et al.*, 2018). Un vaccin, le CaniLeish®, constitué de protéines excrétées secrétées de *L. infantum* et d'un adjuvant, le muramyl dipeptide (MDP), a été développé contre la LV canine (Lemesre *et al.*, 2005). Ce vaccin, commercialisé en Europe en 2011, est efficace et capable de conférer une réponse immune cellulaire de type Th1 protectrice et durable contre l'infection canine par *L. infantum* (Lemesre *et al.*, 2007; Oliva *et al.*, 2014). Chez l'homme, les essais cliniques de phase II menés en Colombie et en Equateur, ont montré que la vaccination par *L. amazonensis* inactivé par autoclavage, ou par des promastigotes inactivés de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* et *L. guyanensis*, chez des volontaires sains, était sans danger et induisait une forte réponse en IFN- γ , mais n'étaient pas associés à une protection de longue durée (Armijos *et al.*, 1998; Velez *et al.*, 2000; Armijos *et al.*, 2003). Des essais cliniques de phase II réalisés en Iran, au Pakistan et au Soudan avec un vaccin composé de parasites *L. major* autoclavés et conjugué avec du BCG et de l'aluminium (Alum-ALM+BCG) ont démontré que ce vaccin était sans danger, immunogène et qu'il induisait une forte réaction d'hypersensibilité retardée (Kamil *et al.*, 2003).

III.3. Vaccins de seconde génération

Ces vaccins sont composés soit de protéine recombinante individuelle soit d'une combinaison de protéines ou polyprotéines, administrées avec un adjuvant.

Les vaccins de seconde génération ou sous-unitaires ne présentent aucun risque de provoquer la maladie. Les inconvénients sont les coûts élevés de production et la probabilité que certaines protéines ne puissent pas être reconnues par la majorité des individus.

Plusieurs protéines de *Leishmania* ont été identifiées comme candidats vaccins, incluant des molécules de surface (lipophosphoglycane (LPG), Glycoprotéine GP63, PSA (promastigote surface antigen)), intracellulaires (protéines histones), sécrétées/excrétées (PSA, H2B) et des biomolécules impliquées dans des voies métaboliques variées (cystéine peptidase) (**Singh et Sundar, 2012**). Parallèlement aux protéines parasitaires, certaines protéines issues de la salive du phlébotome vecteur de *Leishmania*, ont aussi été décrites comme candidats vaccins potentiels contre la leishmaniose, depuis la démonstration qu'une pré-exposition aux composants de la salive du phlébotome pouvait protéger contre la leishmaniose expérimentale murine (**Oliveira et al., 2015**).

Certains de ces candidats vaccins protéiques, sont en cours de développement, mais chez l'homme l'homme, aucun d'entre eux n'a dépassé des essais cliniques de phase II (**Thomaz-Soccol et al., 2018**). Seules les polyprotéines recombinantes, Leish-111f ou LEISH-F1, constituées de la fusion de 3 protéines: *Leishmania major* stress-inducible protein 1 (LmsTII), thiol-specific antioxidant (TSA) et *Leishmania* elongation initiation factor (Leif), et LEISH-F2, une version améliorée du LEISH-F1 (sans queue histidine en N-terminal, plus proche de la forme naturelle de la protéine et remplacement d'un résidu aa pour améliorer le processus de fabrication), ont atteint les essais cliniques de phase I et II (**Gillespie et al., 2016**).

L'innocuité et l'immunogénicité du LEISH-F1 ont été démontrées chez des volontaires sains ou guéris de LV et chez des patients atteints de LC ou de LM (**Coler et al., 2007; Llanos-Cuentas et al., 2010; Nascimento et al., 2010; Chakravarty et al., 2011**). Ce candidat vaccin, utilisé avec la chimiothérapie, a démontré une certaine efficacité thérapeutique chez des patients atteints de LCM (**Nascimento et al., 2010**). Enfin, une troisième version, le LEISH-F3, constitué de la fusion de la nucleoside hydrolase (NH) de *L. donovani* et de la sterol 24-c-methyltransferase (SMT) de *L. infantum* est actuellement en essai clinique de phase I, chez des volontaires sains (**Gillespie et al., 2016**).

Deux vaccins à base de protéine recombinante, ont été développés contre la leishmaniose viscérale canine et ont été commercialisés au Brésil. Le Leishmune® constitué du ligand Fucose-mannose de *L. donovani* et de saponine (ce vaccin a été commercialisé puis suspendu pour des raisons d'innocuité) (**Borja-Cabrera et al., 2002; Borja-Cabrera et al., 2008**) et le

Leish-tec® constitué de la protéine recombinante A2 (Fernandes *et al.*, 2008; Regina-Silva *et al.*, 2016). Récemment, un autre vaccin contre la leishmaniose canine a été commercialisé en 2017 en Europe, le LetiFend® constitué de la protéine Q recombinante de *L. infantum* (Borja-Cabrera *et al.*, 2002; Regina-Silva *et al.*, 2016).

III.4. Vaccins à base d'ADN

Cette approche implique l'introduction directe dans les tissus appropriés d'un plasmide contenant la séquence d'ADN cible codant pour le ou les Ags contre lesquels une réponse immunitaire est recherchée. Cette méthode offre un certain nombre d'avantages, comme l'absence de matériel infectieux, une meilleure stabilité, un coût de production peu élevé et la capacité à induire une réponse T CD4⁺ et T CD8⁺. Les inconvénients de ce type de vaccins sont des risques d'intégration de l'ADN vaccin dans le génome de l'hôte et une réponse immune anti-ADN (Khan, 2013).

Plusieurs molécules ont été évaluées dans différents modèles animaux comme la protéine GP63, A2, LACK et KMP-11 (Kumar et Samant, 2016). L'immunisation de hamsters ou de souris BALB/c avec l'Ag KMP-11 délivré sous forme d'ADN, a induit une protection significative avec une réponse cellulaire T mixte Th1/Th2 (Basu *et al.*, 2005; Bhaumik *et al.*, 2009). Un vaccin ADN GP63 a induit une protection significative chez des souris BALB/c infectées par *L. donovani* (Mazumder *et al.*, 2011).

Un vaccin ADN, le LEISHDNAVAX correspondant à des vecteurs MIDGE-TH1 codant pour des peptides issus de 5 protéines de *Leishmania* (KMP11, TSA, CPA, CPB et P74), a récemment été décrit, comme étant protecteur chez la souris BALB/c (Das *et al.*, 2014). Les vecteurs MIDGE (Minimalistic immunogenically defined gene expression) (MIDGE), sont des vecteurs ADN optimisés pour l'induction de réponse cellulaire T. Les peptides inclus dans ce vaccin ont été sélectionnés sur la base de leur capacité à activer des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ productrices d'IFN- γ chez des individus guéris de LC due à *L. major* ou de LV due à *L. donovani*.

III.5. Vaccins peptidiques

III.5.1. Principe de la vaccinologie inverse et la vaccination peptidique

Grâce à la génomique et la protéomique, les scientifiques connaissent désormais les séquences complètes du génome et du protéome de nombreuses espèces pathogènes pour l'homme. Aujourd'hui, le développement de la bioinformatique et des algorithmes ont permis d'utiliser le génome ou le protéome entier d'un pathogène pour sélectionner des régions susceptibles

d'être immunogènes, au sein des Ags, par des approches *in silico*, sans avoir recours à la culture, *in vitro*, du pathogène.

Cette approche, appelée la vaccination inverse, consiste à identifier au sein du génome ou du protéome, les épitopes immuno-dominants, capables de déclencher une réponse immunitaire spécifique. La connaissance des mécanismes impliqués dans la reconnaissance des Ags à l'échelle moléculaire (détaillés dans le paragraphe III.5.7), a largement contribué au développement des vaccins peptidiques. Les épitopes T (qui nous intéressent plus particulièrement dans notre travail), sont présentés à la surface de la CPA, en association avec les molécules du CMH (HLA chez l'homme) de classe I ou II, dans le but d'induire des réponses immunitaires.

La caractérisation des épitopes T capables d'induire des réponses immune protectrices fait face à des problèmes liés à la complexité de leur apprêtement et de leur présentation au sein des molécules HLA et à la grande diversité allélique de ces molécules. Un vaccin peptidique efficace doit pouvoir se lier à des molécules HLA parmi les plus représentées dans la population mondiale, afin d'assurer une bonne couverture vaccinale.

La prédiction des épitopes est réalisée à l'aide de l'immuno-informatique qui utilise différents algorithmes permettant de prédire la liaison des épitopes aux molécules HLA de classe I ou II, le clivage par le protéasome ou encore les interactions avec le transporteur TAP (Transporter associated with Antigen Processing) (**Figure 10**).

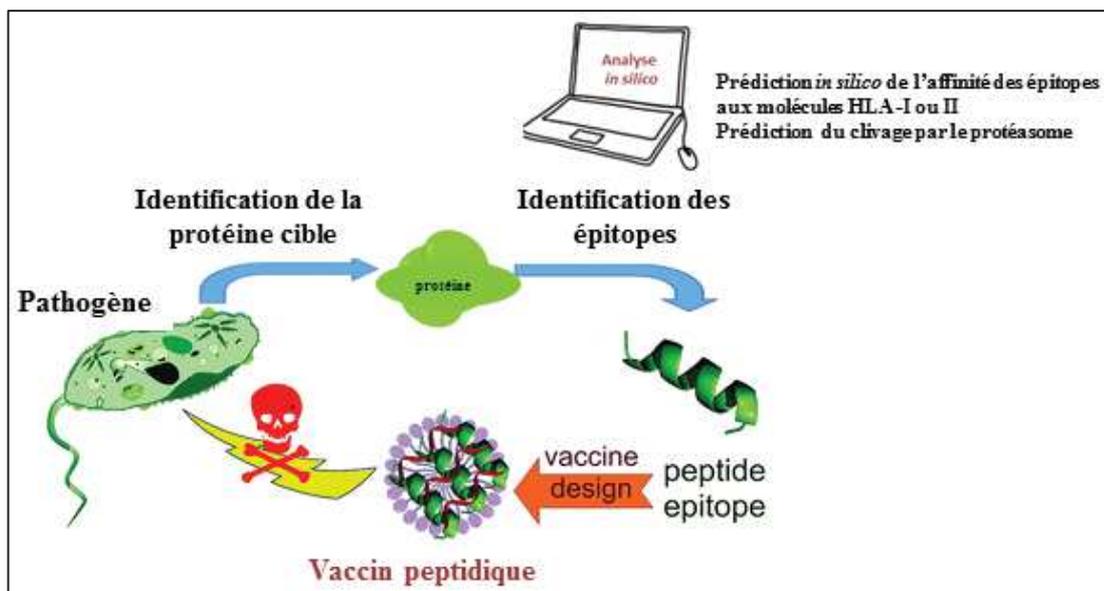


Figure 10. Principe des vaccins peptidiques (Skwarczynski et Toth, 2016)

avec modifications

Plusieurs logiciels de prédiction des épitopes, accessibles en ligne, ont révolutionné et accéléré ce domaine (**Tableau 4**).

Ces épitopes sont, par la suite, rassemblés pour constituer des peptides dont la capacité à induire des réponses immunitaires protectrices, est évaluée soit dans un modèle animal, soit *in vitro*, chez l'homme.

Tableau 4. Différents outils de prédiction *in silico* disponibles en ligne

Nom de l'outil de prédiction	Description	URL
EpiMer	Recherche des motifs de liaison aux CMH au sein de la séquence protéique	http://epivax.com
NetMHC-3.2	Prédiction des liaisons de peptides aux différents allèles HLA-I	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC-3.2/
NetMHCII	Prédiction de la liaison de peptides aux différents allèles HLA-II	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/
Immune epitopes	Prédiction des épitopes pour les cellules T et B	http://tools.immuneepitope.org/main/index.html
SYFPEITHI	Recherche de peptides et prédiction des épitopes pour les LT	http://www.syfpeithi.de
IEDB	Prédiction de la liaison des peptides au CMH I et II et prédictions des sites de clivage par le protéasome	http://www.iedb.org
NetCHOP3.1	prédiction des sites de clivage par le protéasome	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/
PAProC II	prédiction des sites de clivage par le protéasome	http://www.paproc2.de/paproc1/paproc1.html

La vaccination inverse a prouvé son potentiel dans l'identification d'un vaccin contre le méningocoque du groupe B (MenB) (Bexsero®) qui a été approuvé par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (Food and Drug Administration (FDA)) (**O'Ryan et al., 2014**).

Plusieurs travaux ont utilisé cette approche pour concevoir des vaccins peptidiques synthétiques contre plusieurs maladies parasitaires comme le paludisme, qui compte actuellement neuf essais cliniques utilisant de tels vaccins. Ces essais ont donné des résultats encourageants (**Nardin, 2010**). Des vaccins peptidiques ont aussi été décrits contre le VIH (**Purcell et al., 2007**) et la toxoplasmose (**Wang et al., 2013**). Plusieurs travaux ont concerné la vaccination peptidique thérapeutique contre le cancer (**Hirayama et Nishimura, 2016**).

III.5.2. Validation de l'immunogénicité des peptides multi-épitopiques conçus par bioinformatique

Des tests cellulaires, *in vitro*, peuvent être utilisés pour valider la caractérisation, *in silico*, des épitopes et permettent d'évaluer les capacités de ces épitopes à stimuler des cellules cibles.

Les tests de stimulation et d'activation, *in vitro*, des LT humains sont les plus informatifs pour prédire le potentiel immunogène des épitopes T identifiés par les outils de la bioinformatique. Des techniques comme l'ELISPOT permettant d'évaluer la production spécifique d'IFN- γ après reconnaissance de l'épitope par la cellule T, ou la cytométrie en flux, permettant de déterminer les phénotypes des différentes populations cellulaires productrices de cytokines, activées par les épitopes, peuvent être utilisées.

III.5.3. Avantages et inconvénients des vaccins peptidiques

En comparaison avec les vaccins conventionnels, les peptides synthétiques présentent plusieurs avantages, en particulier en termes de sécurité et de facilité d'utilisation (Purcell *et al.*, 2007). Les vaccins peptidiques ne contiennent pas de matériel infectieux, et ne présentent donc aucun risque de réversion. Contrairement aux vaccins à ADN, les vaccins peptidiques ne présentent pas de risque d'intégration ou de recombinaison génétique. Les séquences oncogènes ou susceptibles de déclencher des réponses auto-immunes peuvent être exclues de la séquence entière de l'Ag. Par ailleurs, des modifications peuvent être effectuées au niveau des séquences peptidiques, dans le but d'améliorer leur immunogénicité, leur stabilité et leur solubilité. Ainsi, des groupements lipidiques, carbohydrates et phosphates peuvent être ajoutés aux séquences peptidiques.

Sur le plan économique, la production des peptides peut être assurée et standardisée à grande échelle et à faible coût. Les peptides peuvent être conservés à température ambiante facilitant ainsi leur stockage, transport et distribution.

Les vaccins peptidiques peuvent être conçus de manière à inclure de multiples déterminants antigéniques provenant du même pathogène ou de plusieurs pathogènes.

Les épitopes sélectionnés peuvent être assemblés dans un long peptide appelé peptide multi-épitopique, permettant ainsi de contourner l'un des inconvénients majeurs des vaccins peptidiques, qui est leur faible immunogénicité en raison de leur petite taille. Il est aussi possible d'intégrer dans la même construction, des épitopes dérivant de plusieurs protéines distinctes et affines pour plusieurs molécules HLA, ce qui permet d'avoir un plus grand répertoire de réponses immunes et une couverture vaccinale plus large.

Un autre inconvénient des vaccins peptidiques est leur possible dégradation, *in vivo*, par des protéases. Il a été démontré que l'acétylation ou l'amidation des extrémités N- et C-terminales, respectivement, améliorent la stabilité métabolique des peptides et les protège contre la dégradation enzymatique (Skwarczynski et Toth, 2016).

III.5.4. Adjuvants utilisés dans les vaccins peptidiques

La conjugaison des peptides à des molécules adjuvantes est primordiale pour augmenter leur immunogénicité et amplifier la réponse immune induite (Reed *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014).

Un adjuvant est un composé, qui, lorsqu'il est administré conjointement avec un Ag, stimule et augmente la réponse immunitaire spécifique contre cet Ag (Petrovsky et Aguilar, 2004). Les adjuvants sont composés de molécules immunostimulantes, qui activent les cellules du système immunitaire, et/ou de véhicules qui s'associent à l'Ag et participent à son transport et parfois à l'optimisation de sa présentation par les CPA. Dans certains cas les véhicules ont eux-mêmes des propriétés immunostimulantes.

Les adjuvants peuvent être utilisés à diverses fins: (i) améliorer l'immunogénicité d'un Ag purifié ou recombinant, (ii) réduire la quantité d'Ag ou le nombre d'immunisations nécessaire à l'induction d'une immunité protectrice (iii) améliorer l'efficacité des vaccins chez les nouveau-nés, les personnes âgées ou immunodéprimées ou (iv) utilisés comme un système d'administration et de véhicule de l'Ag.

Plusieurs adjuvants ont été exploités au cours des essais cliniques des candidats vaccins peptidiques: L'alum a été employé comme adjuvant dans les vaccins peptidiques contre la grippe (<https://clinicaltrials.gov>: identifiant de l'étude: NCT00851266) et le paludisme (<https://clinicaltrials.gov>: identifiant de l'étude: NCT00652275). Son efficacité n'a cependant pas été démontrée (Petrovsky et Aguilar, 2004; Skwarczynski et Toth, 2016).

Au cours d'essais cliniques d'un candidat vaccin peptidique contre le paludisme, il a été démontré que le Montanide ISA 720 (version modifiée de l'Adjuvant Incomplet de Freund) était bien toléré et que le vaccin était fortement immunogène chez les individus vaccinés (Oliveira *et al.*, 2005; Roestenberg *et al.*, 2008).

Les adjuvants vésiculaires comprenant les liposomes et les enveloppes virales reconstituées ou virosomes, sont constitués par une bicouche lipidique délimitant une microsphère aqueuse. Le peptide peut être adsorbé à leur surface, inséré dans leur membrane, ou contenu dans leur phase aqueuse. Les virosomes sont surtout utilisés comme adjuvants pour les vaccins peptidiques thérapeutiques contre le cancer (Goydos *et al.*, 1996; Wiedermann *et al.*, 2010). Ils ont aussi montré leur efficacité à induire une réponse immunitaire appropriée dans les

essais cliniques de vaccins à base de peptides contre le paludisme ([Genton et al., 2007](#)) (<https://clinicaltrials.gov: NCT00400101>).

L'utilisation des lipopeptides est une stratégie prometteuse pour stimuler les réponses immunitaires via le récepteur Toll-like 2 (TLR2). Il a été démontré que l'ajout d'un groupement lipidique à des peptides fournit des propriétés «auto-adjuvantes» et génère une forte réponse immunitaire sans adjuvant. Plusieurs types de lipides conjugués à l'Ag peptidique ont été étudiés, tels que les Pam3cys/Pam2Cys, l'acide palmitique et l'acide lipoamine. Certains peptides palmitoylés ont été évalués dans différents essais cliniques de candidats vaccins peptidiques contre le VIH et le CMV ([Diamond et al., 1997](#); [Gahery-Segard et al., 2000](#); [Durier et al., 2006](#)). Des études ont aussi rapporté que l'ajout d'un groupement lipidique facilite l'ancrage du peptide aux membranes cellulaires, assurant son internalisation et permettant ainsi l'accès aux voies d'apprêtement endogène nécessaires à l'induction des réponses lymphocytaires T CD8+ cytotoxiques ([Andrieu et al., 2000](#)).

Diverses cytokines telles que le GM-CSF et l'IL-12 sont aussi utilisées comme adjuvant principalement dans les vaccins peptidiques thérapeutiques contre le cancer ([Murray et al., 2002](#); [Peoples et al., 2005](#)).

III.5.5. Sélection des Ags candidats comme source des épitopes

Le principal défi dans le développement des vaccins peptidiques est l'identification des protéines candidates capables de déclencher une réponse immunitaire protectrice.

Le parasite possède des protéines de surface et des protéines sécrétées (sécrétome) qui jouent un rôle clé dans l'établissement de l'infection et dans son maintien ([Rittig et Bogdan, 2000](#)).

Bon nombre de ces protéines ont aussi été démontrées comme étant capables d'induire des réponses immunes protectrices aussi bien, *in vivo*, dans les modèles animaux, qu'*in vitro*, chez l'homme. Elles sont, par conséquent, considérées comme étant les protéines candidates les plus intéressantes pour l'identification d'épitopes et de peptides candidats vaccins. Cependant, bien que la plupart des recherches sur les vaccins se soient focalisées sur des protéines sécrétées et de surface, le parasite possède aussi des Ags intracellulaires non sécrétés, membres de familles de protéines conservées, lesquelles sont aussi capables d'induire des réponses immunes importantes et spécifiques ([Santarem et al., 2007](#)).

Les Ags non sécrétés comme les protéines histones, ribosomes et protéines de choc thermique (HSP), sont hautement conservés entre les différentes espèces de *Leishmania* et provoquent une forte réponse immunitaire à médiation humorale et ont aussi été impliqués dans l'induction de réponse cellulaire T associée à la protection ([Requena et al., 2000](#)).

Parmi les paramètres importants dans la sélection des Ags pour l'identification de candidats vaccins peptidiques, le taux de conservation des protéines entre les différentes espèces de *Leishmania* et leur niveau d'expression au niveau des deux stades du parasite (**Kaye et Aebischer, 2011; Aebischer, 2014**).

Les protéines H2B, LmlRAB et PSA, utilisées au cours de ce travail pour identifier des candidats vaccins peptidiques, sont des exemples de protéines candidates.

La protéine histone H2B forme avec les autres protéines histones H2A, H3 et H4 les constituants majeurs du nucléosome. Elle a un rôle dans l'organisation et la fonction de l'ADN dans le noyau des cellules eucaryotes (**Khorasanizadeh, 2004**). Cette protéine est présente au stade promastigote et amastigote, est fortement conservée entre les différentes espèces de *Leishmania*, avec toutefois, une partie N-terminale présentant un certain niveau de divergence avec les protéines homologues chez les mammifères. Cette protéine est capable de conférer une protection chez des souris BALB/c contre un challenge avec une souche virulente de *L. major* (**Chenik et al., 2006b**) et d'induire une réponse cellulaire spécifique de type Th1 chez des individus guéris de LC (**Meddeb-Garnaoui et al., 2010**).

La LmlRAB est une protéine intracellulaire, appartenant à la superfamille des RAB GTPases, très conservée parmi les espèces de *Leishmania*, qui a été identifiée dans notre laboratoire (Laboratoire de Parasitologie Médicale, Biotechnologies et Biomolécules à l'IPT) (**Chenik et al., 2006a**). Cette protéine est caractérisée par une partie C-terminale présente seulement dans le genre *Leishmania*, suggérant que la LmlRAB serait une protéine spécifique de ce parasite. Les RAB GTPases jouent un rôle crucial dans la régulation du transport vésiculaire, au cours de l'endocytose et de l'exocytose. Des rôles dans la maturation des phagosomes et dans la régulation des voies de sécrétion ont été attribués aux protéines RAB de *Leishmania* (**Bahl et al., 2015; Rastogi et al., 2016**). La protéine LmlRAB s'exprime dans les stades promastigote et amastigote du parasite et est capable d'induire, *in vitro*, des taux élevés d'IFN- γ et de GrB chez des individus immuns à la LC (**Chamakh-Ayari et al., 2017**).

La PSA (Promastigote Surface Antigen) fait partie d'une famille de protéines membranaires et sécrétées/excrétées de *Leishmania*, jouant un rôle primordial dans les interactions hôte-pathogène et a été impliquée dans l'attachement aux macrophages (**Kedzierski et al., 2004; Devault et Banuls, 2008**). Elle est présente dans les 2 stades du parasite et est surexprimée dans les promastigotes métacycliques suggérant son implication dans la virulence (**Beetham et al., 2003**). En tant que candidat vaccin, cette protéine est capable d'induire une protection médiée par une réponse Th1, contre l'infection expérimentale murine ou canine (**Handman et**

al., 1995) et des réponses de type Th1 chez des individus ayant développé une immunité contre *Leishmania* (Kemp *et al.*, 1998; Chamakh-Ayari *et al.*, 2014). Par ailleurs, des travaux réalisés dans le laboratoire UMR-177 INTERTRYP à l'IRD, ont montré que des sérums de chiens vaccinés avec des Ags sécrétés/excrétés de *L. infantum*, reconnaissaient des Ag immunodominant appartenant à la famille des PSA (Lemesre *et al.*, 2005; Lemesre *et al.*, 2007; Bras-Goncalves *et al.*, 2014).

III.5.6. Vaccins peptidiques épitopiques contre les leishmanioses

L'identification de peptides épitopiques comme candidats vaccin contre les leishmanioses, a été décrite. La prédiction d'épitopes T, *in silico*, à partir de protéines candidates, a été rapportée chez la souris comme chez l'homme (De Brito *et al.*, 2018). Plusieurs protéines candidates de différentes espèces parasitaires, issues de la forme promastigote ou amastigote, ont été criblées, *in silico*, pour déterminer les peptides à potentiel vaccinal. Actuellement plusieurs protéines telles que la GP63 (Jardim *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1991; Sachdeva *et al.*, 2009; Elfaki *et al.*, 2012), KMP-11 (Delgado *et al.*, 2003; Basu *et al.*, 2007; Agallou *et al.*, 2011; Agallou *et al.*, 2014), le facteur de virulence amastigote (A2) (Resende *et al.*, 2008), la cystéine protéinase (Pereira *et al.*, 2011) et le LACK (Kedzierska *et al.*, 2012), ont été utilisées pour la recherche d'épitopes T.

Des épitopes T ont ainsi été identifiés soit à partir d'une ou de plusieurs protéines immunogènes de *Leishmania*, soit en utilisant une approche plus globale, à partir du protéome complet. Le tableau 5 résume les différentes approches ainsi que les outils de prédiction des épitopes T utilisés chez la souris ou chez l'homme.

III.5.6.1. Vaccins peptidiques candidats contre la leishmaniose expérimentale murine

La souris est le modèle expérimental le plus utilisé dans l'évaluation de l'immunogénicité d'un candidat vaccin contre la leishmaniose. L'efficacité d'un vaccin est évaluée par différents paramètres tels que la réduction de la taille des lésions et de la charge parasitaire dans les organes affectés (le foie, la rate, la moelle osseuse et les ganglions).

La GP63 est la protéine la plus étudiée chez la souris, elle est hautement conservée, exprimée à la fois dans le stade promastigote et amastigote et elle est impliquée dans de nombreux mécanismes liés à la virulence du parasite. Plusieurs travaux ont démontré sa capacité à induire des réponses immunes protectrices, et est, de ce fait, considérée comme une protéine candidate intéressante (De Brito *et al.*, 2018). Des épitopes T de 12 à 16 résidus ont été

identifiés à partir de la structure primaire de la GP63 et leur capacité à stimuler la prolifération des cellules T CD4⁺ de type Th1, a été rapportée (**Jardim et al., 1990**). Ces auteurs ont aussi montré que l'un de ces épitopes, conjugué à un adjuvant, était capable de conférer une protection contre deux espèces de *Leishmania*, chez des souris BALB/c (**Jardim et al., 1990**). Une autre étude, utilisant un modèle de souris BALB/c humanisées, transgéniques pour le gène HLA-A*0201, a identifié, au sein de la protéine GP63, des peptides affins pour la molécule HLA-A*0201, et a démontré que ces peptides induisaient une réponse T cytotoxique et la sécrétion d'IFN- γ (**Rezvan et al., 2012**).

En 2009, une équipe de l'Institut Pasteur de Tunis a analysé un ensemble de protéines sécrétées de *L. major* et a identifié, en utilisant une approche bio-informatique, des épitopes de 9 aa pouvant être présentés par des molécules du CMH-I aux cellules T, chez la souris BALB/c (**Guerfali et al., 2009**).

Plus récemment, Agallou et collaborateurs, ont analysé l'immunogénicité de peptides identifiés, en utilisant des outils de prédiction de liaison aux molécules CMH-I et -II, au sein de quatre protéines de *L. infantum* (cystéine peptidase A (CPA), histone H1, KMP-11 et le facteur d'initiation eukaryotique de *Leishmania* (LeIF)), chez la souris BALB/c (**Agallou et al., 2014**). Les peptides ont été combinés afin de générer des peptides multi-épitopiques et ont été utilisés en présence d'un adjuvant. Cette étude a démontré que certains de ces peptides étaient capables d'induire le développement de cellules T CD4⁺ de type Th1 productrices d'IFN- γ ainsi que le développement d'une réponse T CD8⁺ cytotoxique protectrice (**Agallou et al., 2014**).

L'immunogénicité d'un candidat vaccin ADN codant pour des peptides restreints par l'allèle HLA-A*0201, issus des protéines LPG-3, LmSTI-1, CPB et CPC, a été évaluée chez des souris humanisées pour des molécules du CMH-I et -II et sa capacité à induire des réponses T CD8⁺, a été décrite (**Seyed et al., 2014**).

En utilisant une approche protéomique, un peptide PEPCK, présenté dans le contexte de molécules du CMH-II et traité de façon naturelle, a été identifié à partir de CD murines infectées (**Mou et al., 2015**). Ce peptide issu de la protéine *Leishmania* glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase de *L. major* a induit l'activation de cellules T CD4⁺ spécifiques et la production d'IFN- γ chez des souris infectées et chez des individus guéris de LCZ (**Mou et al., 2015**).

Enfin, plus récemment, il a été rapporté qu'une protéine chimérique constituée du domaine N- et C-terminal de la protéine nucléoside hydrolase (NH36) de *L. donovani* était capable d'induire des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ sécrétrices d'IFN- γ et des cellules T CD4⁺

polyfonctionnelles ainsi qu'une protection croisée chez des souris BALB/c infectées par *L. amazonensis* (Alves-Silva *et al.*, 2017). De façon intéressante, en caractérisant la réponse T dirigée contre les épitopes T de cette construction chimérique, ces auteurs ont montré que la présentation des épitopes dans cette protéine chimère était associée à une immunogénicité plus importante que celle observée avec les domaines N- et C-terminal utilisés séparément (Alves-Silva *et al.*, 2017).

III.5.6.2. Vaccins peptidiques candidats contre la leishmaniose humaine

Plusieurs protéines candidates telles que la GP63, les cystéines peptidases, le KMP-11 et le LPG, ont été utilisées pour prédire les épitopes T affins pour des molécules HLA.

Des épitopes T affins pour des molécules HLA-II, ont été sélectionnés, en utilisant l'outil bio-informatique, à partir de la protéine GP63 et leur immunogénicité a été évaluée chez des individus guéris de LV (Elfaki *et al.*, 2012). Utilisés sous forme de pools, ces peptides ont induit des taux modérés d'IFN- γ (Elfaki *et al.*, 2012).

Une autre analyse bio-informatique a permis d'identifier des épitopes T dans la région C-terminale de la protéine cystéine protéinase de *Leishmania*, pouvant être reconnus dans le contexte de molécules HLA-II, et capables de stimuler l'activation de PBMC de patients atteints de leishmaniose (Alves *et al.*, 2001).

Des peptides capables d'induire de l'IFN- γ par des cellules T CD8⁺ de donneurs sains, ont été identifiés parmi des nonapeptides chevauchants couvrant la totalité de la séquence de la protéine KMP-11 (Basu *et al.*, 2007).

Il a été rapporté que des épitopes T dérivés de la protéine NH36 de *L. donovani* étaient capables d'induire de l'IFN- γ par des T CD4⁺ et des T CD8⁺, lors de la stimulation, *in vitro*, de PBMC issus d'individus asymptomatiques (Barbosa Santos *et al.*, 2017).

D'autres études ont montré que des peptides de 9 aa, conçus, *in silico*, à partir des protéines LmsTI-1, et LPG-3, ou à partir de protéines sécrétées/excrétées de *Leishmania*, affins pour la molécule HLA-A2 et regroupés en pools, étaient capables d'induire, respectivement, une réponse T CD8⁺ sécrétrice d'IFN- γ spécifique, ou du GrB, chez des individus guéris de LC due à *L. major* (Seyed *et al.*, 2011; Naouar *et al.*, 2016).

Malgré des résultats encourageants, les principaux inconvénients de ces travaux étaient le fait de cibler soit un seul supertype HLA, soit seulement la réponse T CD8⁺, sachant que le système HLA est très polymorphe et que la protection contre l'infection nécessite le développement d'une réponse T CD4⁺ et T CD8⁺.

Le polymorphisme du système HLA, marqueur de l'hétérogénéité de la population humaine, constitue l'un des paramètres majeurs à considérer pour le développement d'un vaccin à usage humain. Un vaccin poly-épitopique idéal doit impliquer plusieurs allèles HLA permettant une bonne couverture vaccinale.

Récemment, Silva et collaborateurs ont recherché des épitopes affins aussi bien aux molécules HLA-I qu'aux molécules HLA-II, exprimés par diverses populations humaines, à partir du protéome de *L. braziliensis* (plus précisément à partir des protéines de *L. braziliensis* montrant 60% d'homologie avec celles de *L. major* et *L. infantum*). Le but de ces auteurs a été d'identifier des épitopes capables de stimuler les T CD4⁺ et les T CD8⁺ pour favoriser le développement d'une réponse immune plus équilibrée nécessaire à la prévention de la maladie. Parmi les épitopes sélectionnés, certains, dérivés de protéines différentes, étaient capables de stimuler la prolifération de PBMC issus d'individus guéris de LC ([Silva et al., 2016](#)).

Tableau 5. Résumé des travaux décrivant des candidats vaccins peptidiques contre les leishmanioses

Souris vs Homme	Protéines	Espèce de <i>Leishmania</i> utilisée	Epitopes	Outils de prédiction	Hôte	Résultats
Souris	GP63	<i>L. major</i>	7 peptides (12-16AA)	Predictive algorithm	BALB/c	Prolifération in vitro
		<i>L. major</i>	24 peptides chevauchants (12-35 AA)	Algorithme AMPHI	BALB/c et CBA	Induction d'une réponse Th1 et induction d'une réponse Th2
		<i>L. major</i>	2 peptides (16AA)	Algorithme AMPHI	CBA	Réponse Th1 et Th2
		<i>L. major</i>	1 peptide (16AA)	Predictive algorithm	BALB/c	Protection contre la maladie
		<i>L. major</i>	Peptides restreints au CMH-II (15AA)	SYFPETHI	souris transgénique FVB/N-DR1	Réponse Th1/Th2
		<i>L. mexicana/ L. major</i>	Peptides restreints au HLA-A2 (9AA)	SYFPETHI	HHDI et BALB/c	Induction d'une réponse Th1
	NH36	<i>L. donovani</i>	Peptides restreints aux CMH-I et II	Protean Pad program/SYFPEITHI	BALB/c	protection contre la maladie et immunisation
	A2	<i>L. donovani</i>	Peptides restreint au CMH-I et II + epitopes B	BIMAS et protScale	BALB/c et C57BL/6	Induction de la réponse Th1
Homme	CPA, H1, KMP-11, LeIF	<i>L. infantum</i>	8 peptides multiépitopiques (20-30AA)	SYFPETHI/BIMAS/Net MHCII	BALB/c	Réponses Th1 et Th2
	NH36	<i>L. donovani</i>	Peptides affins pour HLA-DR (19 allèles les plus fréquents)/ HLA-A (A02; A03; A01) et B (B07; B44)	T EPITOPE/SYFPEITHI	PBMC Humains (individus asymptomatiques à une LV)	Production d'anticorps
	KMP-11	<i>L. donovani</i>	4 peptides(9-18AA)	EpiMatrix	PBMC humains (individus guéris d'une LV)	Augmentation de la réponse Th1
		<i>L. donovani</i>	84 peptides chevauchants (9AA)	SYFPETHI	TCD8 humains (individus naïfs)	Sécrétion de cytokines
	CPB, CPC,LmsTI-1, TSA, LeIF, LPG3	<i>L. major</i>	18 peptides restreints au HLA-A*0201(9AA)	SYFPETHI/BIMAS/EpiJen/Rankpep/NetCTL/Multipred	PBMC humains (individus guéris d'une LC et naïfs)	Induction d'une réponse Th1
	Protéome	<i>L. braziliensis</i>	10peptides restreints aux HLAII(15AA)	NetMHC/NetCTL/Net MHCII	PBMC humains(individus guéris d'une LC ou naïfs)	Prolifération de cellules T
excrétées/sécrétées	<i>L. major</i>	78 peptides (9AA) restreints au HLA-A0201	SYFPEITHI/BIMAS/RANKPEP/ NetMHC	PBMC humains (guéris d'une LC)	Sécrétion de cytokines	

III.5.7. Concepts immunologiques fondamentaux pour la compréhension de la vaccination peptidique

III.5.7.1. Structure des molécules du Complexe Majeure d'Histocompatibilité (CMH) et liaison avec le peptide

Les molécules du CMH ont pour fonction principale, de présenter des Ags, sous forme de fragments peptidiques aux LT, afin de les activer.

Les Ags intracellulaires (endogènes, s'exprimant à l'intérieur de la cellule) comme les protéines du soi (protéines en fin de vie, protéines tumorales) et les protéines virales codées par un génome viral intégré dans l'ADN de la cellule hôte, vont être dégradés par le protéasome et présentés par les molécules du CMH-I, aux LT CD8+ (Neeffjes *et al.*, 2011; Blum *et al.*, 2013; Rock *et al.*, 2016). Les molécules du CMH-I sont exprimées par l'ensemble des cellules.

Les protéines exogènes provenant soit d'agents pathogènes soit de corps apoptotiques, sont dégradées par les voies endosomales et présentées par les molécules du CMH de classe II (CMH-II), aux LT CD4+ (Neeffjes *et al.*, 2011). Contrairement aux molécules du CMH-I, l'expression des molécules du CMH-II est restreinte aux CPA telles que les macrophages, les CD et les cellules B.

Le CMH est appelé HLA (Human Leukocyte Antigen) chez l'homme et H-2 chez la souris. Dans ce qui suit, nous évoquerons principalement le système HLA.

La molécule HLA-I est un hétérodimère formé d'une chaîne lourde α , polymorphe, constituée de trois domaines: $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ et de la $\beta 2$ microglobuline, non polymorphe (Dausset, 1958; Bjorkman *et al.*, 1987; Melief et Kessler, 2017) (Figure 11 A). Le site de liaison peptidique est constitué des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ qui forment une cavité dans laquelle va se loger le peptide. Cette cavité est fermée à ses 2 extrémités et accueille des peptides de 8 à 10 acides aminés (Figure 11 B).

La molécule HLA-II est également un hétérodimère composé d'une chaîne α et d'une chaîne β , associées d'une manière non covalente (Figure 11 C). Le site de liaison peptidique est constitué des domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ qui forment une cavité dans laquelle se fixe le peptide antigénique. Contrairement à la molécule HLA-I, le site de liaison peptidique de la molécule HLA-II est ouvert aux extrémités et peut donc accueillir des peptides plus longs que ceux des molécules de classe I, variant entre 13 à 18 résidus (Figure 11 D).

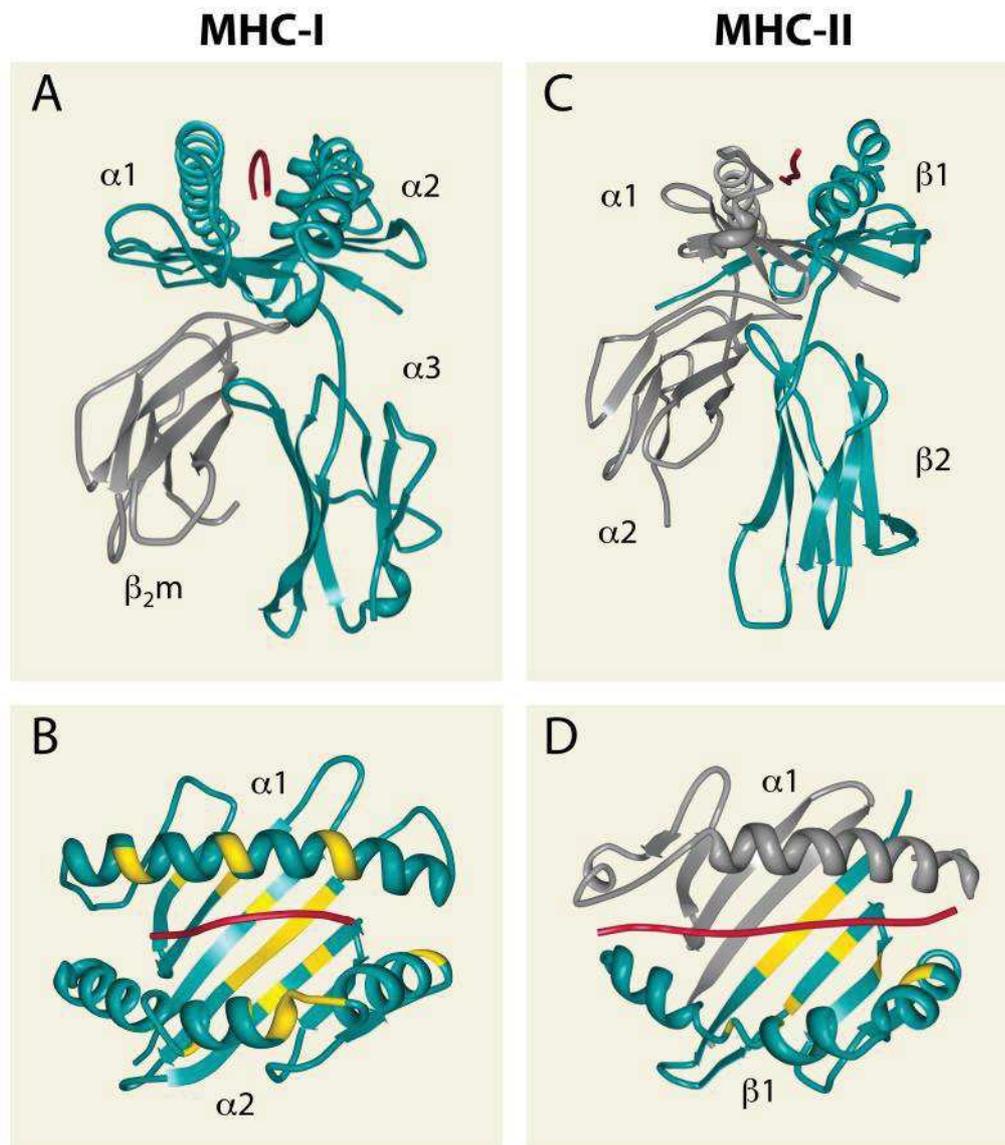


Figure 11. Structure tridimensionnelle des molécules HLA-I et HLA-II
(Blum *et al.*, 2013)

A/B : Structure de la molécule HLA-I (HLA-A2 associée aux résidus 58-66 de la protéine de matrice de virus de la grippe). Chaîne lourde en Bleu, β_2 microglobuline en gris, peptide en rouge.
C/D : Structure de la molécule HLA-II (HLA-DR1 associée aux résidus 306-318 de l'hémagglutinine du virus de la grippe). Chaîne α en gris, chaîne β en Bleu, peptide en Rouge
B/D : Les résidus hautement polymorphes des molécules HLA-A (**B**) et HLA-DR(**D**) sont colorés en Jaune.

Les molécules HLA sont très polymorphes. Les chaînes α des molécules HLA-I, sont codées par trois gènes classiques, HLA-A, HLA-B et HLA-C, tous trois dotés d'un important polymorphisme allélique (Bjorkman et Parham, 1990; Williams, 2001) (hla.alleles.org). Les molécules HLA-II sont codées par 3 paires de gènes classiques, HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP, très polymorphes (Williams, 2001) (hla.alleles.org).

Le polymorphisme des molécules HLA est principalement localisé au niveau du site de liaison peptidique. Ce polymorphisme va déterminer la spécificité de liaison peptidique pour chacun des variants alléliques. Le répertoire peptidique présenté par les molécules HLA est principalement déterminé par la structure du site de liaison peptidique.

Ainsi, la fixation d'un peptide sur la molécule HLA dépend de la présence de résidus spécifiques à des positions bien déterminées le long du peptide. Ces résidus sont qualifiés de résidus d'ancrage et leurs chaînes latérales interagissent avec des poches situées dans le sillon de la molécule HLA ([Sidney *et al.*, 2008](#)).

En dépit de leur polymorphisme, les différentes molécules HLA peuvent être regroupées en supertypes (groupe de molécules HLA pouvant lier des peptides similaires, donnant lieu à un certain chevauchement dans les répertoires de peptides liés à ces molécules) ([del Guercio *et al.*, 1995](#); [Sidney *et al.*, 1995](#)). Les allèles de classe I ont été classés en neuf supertypes distincts (A1, A2, A3, A24, B7, B27, B44, B58 et B62) qui couvrent la plupart du polymorphisme des molécules HLA-A et HLA-B (**Tableau 6 et 7**). Par exemple, le supertype A2 inclut 11 molécules apparentées reconnaissant des peptides ayant des résidus hydrophobes et aliphatiques en position 2 et en position C-terminale ([Sidney *et al.*, 2008](#)). Par ailleurs, il a été rapporté que les supertypes A2, A3 et B7 pourraient fournir une large couverture de la population (**Tableau 8**) ([Sette et Sidney, 1999](#)).

Contrairement aux supertypes HLA-I, les supertypes HLA-II ont fait l'objet d'études moins approfondies à cause de la complexité de leur structure ([Ou *et al.*, 1998](#); [Baas *et al.*, 1999](#); [Castelli *et al.*, 2002](#); [Lund *et al.*, 2004](#); [Doytchinova et Flower, 2005](#); [Greenbaum *et al.*, 2011](#)). En 2011, Greenbaum et collaborateurs ont classifiés les différents allèles des molécules HLA-II en sept supertypes différents (Main DR, DR4, DRB3, Main DQ, DQ7, Main DP et DP2) ([Greenbaum *et al.*, 2011](#)). Le Tableau 9 représente les différents allèles des molécules HLA-II les plus communs, classés en supertypes.

Ces données révèlent une grande flexibilité dans les interactions HLA/peptides. Une molécule HLA peut se lier à de nombreux peptides différents et certains peptides peuvent se fixer à plusieurs molécules HLA différentes (ils sont alors appelés « promiscuous peptides ») ([Panina-Bordignon *et al.*, 1989](#); [Ueno *et al.*, 2002](#)).

Tableau 6. Classification des allèles HLA-A en supertypes

HLA A-supertypes									
A01									
A*0101	A*0103	A*0112	A*2609	A*2618	A*3012	A*3602	A*2501	A*3603	
A*2601	A*0104	A*0114	A*2610	A*2619	A*3202	A*3604	A*2502	A*7410	
A*2602	A*0106	A*0115	A*2611	A*2621	A*3205		A*2504	A*8001	
A*2603	A*0107	A*2604	A*2612	A*2623	A*3206		A*2622		
A*3002	A*0108	A*2605	A*2613	A*2624	A*3207		A*3110		
A*3003	A*0109	A*2606	A*2614	A*2626	A*3209		A*3203		
A*3004	A*0110	A*2607	A*2615	A*3006	A*3210		A*3204		
A*3201	A*0111	A*2608	A*2617	A*3009	A*3601		A*3208		
A01 A03									
A*3001	A*3008	A*3011	A*3014	A*3015			A*0252	A*3013	A*6806 A*6807
A01 A24									
A*2902	A*2901	A*2905	A*2909	A*2911			A*2913		
	A*2903	A*2906	A*2910	A*2912					
A02									
A*0201	A*0209	A*0224	A*0240	A*0257	A*0271	A*6827	A*0241		
A*0202	A*0211	A*0225	A*0243	A*0258	A*0272	A*6828	A*0242		
A*0203	A*0212	A*0226	A*0244	A*0259	A*0274		A*0250		
A*0204	A*0213	A*0227	A*0245	A*0261	A*0275		A*0260		
A*0205	A*0215	A*0228	A*0246	A*0262	A*0277		A*0273		
A*0206	A*0216	A*0230	A*0247	A*0263	A*0278		A*0284		
A*0207	A*0218	A*0231	A*0248	A*0266	A*0279		A*6815		
A*0214	A*0219	A*0236	A*0249	A*0267	A*0282				
A*0217	A*0220	A*0237	A*0251	A*0268	A*0283				
A*6802	A*0221	A*0238	A*0254	A*0269	A*0285				
A*6901	A*0222	A*0239	A*0256	A*0270	A*0286				
A03									
A*0301	A*0302	A*0316	A*1112	A*3105	A*3404	A*6812	A*7402	A*0265	
A*1101	A*0304	A*0317	A*1113	A*3106	A*3406	A*6813	A*7403	A*0280	
A*3101	A*0305	A*1102	A*1114	A*3109	A*6602	A*6814	A*7404	A*0309	
A*3301	A*0306	A*1103	A*1115	A*3111	A*6603	A*6816	A*7405	A*1106	
A*3303	A*0307	A*1104	A*1116	A*3304	A*6604	A*6819	A*7407	A*1122	
A*6601	A*0308	A*1105	A*1120	A*3305	A*6803	A*6821	A*7408	A*3112	
A*6801	A*0310	A*1107	A*1121	A*3306	A*6804	A*6822	A*7409	A*6805	
A*7401	A*0312	A*1108	A*1123	A*3307	A*6808	A*6824	A*7411	A*6820	
	A*0313	A*1109	A*3103	A*3402	A*6809	A*6825		A*6823	
	A*0314	A*1110	A*3104	A*3403	A*6810	A*6826		A*7406	
A24									
A*2301	A*2302	A*2310	A*2410	A*2422	A*2433	A*2440	A*2305	A*2442	
A*2402	A*2303	A*2403	A*2411	A*2423	A*2434	A*2443	A*2312	A*2444	
	A*2304	A*2405	A*2413	A*2426	A*2435	A*2446		A*2417	A*2452
	A*2306	A*2406	A*2418	A*2427	A*2437	A*2447		A*2425	
	A*2307	A*2408	A*2420	A*2428	A*2438	A*2448		A*2430	
	A*2308	A*2409	A*2421	A*2429	A*2439	A*2449		A*2441	
Unclassified									
A*0102	A*0233	A*0276	A*1118	A*2414	A*2432	A*2616	A*3007	A*3308	
A*0113	A*0234	A*0281	A*1119	A*2415	A*2450	A*2620	A*3010	A*3401	
A*0208	A*0235	A*0315	A*2309	A*2419	A*2451	A*2904	A*3102	A*3405	
A*0210	A*0255	A*1111	A*2404	A*2424	A*2453	A*2907	A*3107	A*4301	
A*0229	A*0264	A*1117	A*2407	A*2431	A*2503	A*2914	A*3108	A*6817	

Tableau 7. Classification des allèles HLA-B en supertypes

HLA B-supertypes										
B07										
B*0702	B*0704	B*0741	B*3540	B*5109	B*5134	B*5310	B*0707	B*3518	B*5112	B*8102
B*0703	B*0706	B*0742	B*3541	B*5110	B*5135	B*5315	B*0709	B*3529	B*5113	
B*0705	B*0715	B*0743	B*3542	B*5111	B*5136	B*5317	B*0712	B*3530	B*5114	
B*1508	B*0719	B*3507	B*3543	B*5116	B*5138	B*5319	B*0714	B*3534	B*5120	
B*3501	B*0720	B*3508	B*3544	B*5117	B*5302	B*5603	B*0716	B*3537	B*5137	
B*3503	B*0721	B*3511	B*3545	B*5118	B*5306	B*5605	B*0717	B*3539	B*5304	
B*4201	B*0722	B*3514	B*3546	B*5119	B*5308	B*5613	B*0718	B*3551	B*5508	
B*5101	B*0724	B*3515	B*3554	B*5121	B*5310	B*5615	B*0723	B*3553	B*5511	
B*5102	B*0725	B*3521	B*3555	B*5123	B*5403	B*5616	B*0736	B*3558	B*5513	
B*5103	B*0726	B*3522	B*3557	B*5124	B*5404	B*7802	B*0737	B*3560	B*5514	
B*5301	B*0730	B*3524	B*3561	B*5126	B*5406	B*7804	B*3502	B*3806	B*5602	
B*5401	B*0731	B*3531	B*3910	B*5128	B*5407		B*3504	B*3807	B*5604	
B*5501	B*0733	B*3532	B*3916	B*5129	B*5503		B*3505	B*3917	B*5609	
B*5502	B*0734	B*3533	B*4204	B*5130	B*5504		B*3506	B*4206	B*5610	
B*5601	B*0735	B*3535	B*4205	B*5131	B*5505		B*3509	B*4406	B*5611	
B*6701	B*0739	B*3536	B*5105	B*5132	B*5507		B*3512	B*5104	B*5612	
B*7801	B*0740	B*3538	B*5108	B*5133	B*5509		B*3517	B*5106	B*8101	
B08										
B*0801	B*0807	B*0811	B*0815	B*0819	B*0821	B*0823	B*0825	B*0803	B*0812	
B*0802	B*0809	B*0813	B*0818	B*0820	B*0822	B*0824		B*0808	B*0816	
B27										
B*1402	B*1401	B*1593	B*3926					B*1405	B*3913	B*5518
B*1503	B*1403	B*1598	B*3927					B*1523	B*3915	
B*1509	B*1406	B*1599	B*3929					B*1568	B*3924	
B*1510	B*1407	B*2710	B*3930					B*2701	B*3928	
B*1518	B*1537	B*2713	B*3932					B*2711	B*3933	
B*2702	B*1547	B*2715	B*4012					B*2714	B*3934	
B*2703	B*1549	B*2717	B*4802					B*2719	B*4440	
B*2704	B*1551	B*2723	B*4803					B*2720	B*4807	
B*2705	B*1552	B*2728	B*4804					B*2721	B*4808	
B*2706	B*1554	B*3805	B*4805					B*2724		
B*2707	B*1561	B*3809	B*4809					B*2727		
B*2709	B*1562	B*3810	B*4810					B*2730		
B*3801	B*1569	B*3811	B*4811					B*3526		
B*3901	B*1572	B*3904	B*4812					B*3903		
B*3902	B*1574	B*3907	B*4813					B*3905		
B*3909	B*1580	B*3914	B*9503					B*3906		
B*4801	B*1590	B*3918						B*3908		
B*7301	B*1591	B*3923						B*3911		
B44										
B*1801	B*1553	B*1820	B*4029	B*4056	B*4422	B*4435	B*5001	B*1546	B*4028	B*4048
B*3701	B*1803	B*3704	B*4035	B*4057	B*4424	B*4436	B*5002	B*1802	B*4030	B*4051
B*4001	B*1805	B*4005	B*4039	B*4102	B*4426	B*4437	B*5004	B*1814	B*4033	B*4052
B*4002	B*1806	B*4011	B*4040	B*4103	B*4427	B*4438		B*4003	B*4034	B*4058
B*4006	B*1810	B*4014	B*4049	B*4404	B*4428	B*4503		B*4004	B*4036	B*4059
B*4402	B*1811	B*4015	B*4050	B*4407	B*4429	B*4504		B*4009	B*4038	B*4101
B*4403	B*1813	B*4016	B*4053	B*4413	B*4430	B*4505		B*4010	B*4042	B*4104
B*4501	B*1815	B*4020	B*4054	B*4416	B*4432	B*4507		B*4018	B*4043	B*4106
	B*1819	B*4026	B*4055	B*4421	B*4433	B*4904		B*4019	B*4044	B*4107
								B*4023	B*4045	B*4405
								B*4024	B*4047	B*4414
B58										
B*1516	B*1567	B*5804						B*5704		
B*1517	B*1595	B*5806						B*5705		
B*5701	B*5703	B*5807						B*5706		
B*5702	B*5707	B*5808						B*5805		
B*5801	B*5708	B*5809								
B*5802	B*5709	B*5811								
B62										
B*1501	B*1505	B*1530	B*1548	B*1578	B*1596	B*5202	B*9502	B*1504	B*1558	B*1309
B*1502	B*1514	B*1531	B*1550	B*1581	B*1597	B*5203	B*9504	B*1507	B*1573	B*1313
B*1512	B*1515	B*1533	B*1560	B*1582	B*3528	B*5204		B*1524	B*1586	
B*1513	B*1519	B*1534	B*1563	B*1583	B*4021	B*5205		B*1535	B*4408	
B*4601	B*1520	B*1538	B*1565	B*1585	B*4603	B*5207		B*1542	B*4602	
B*5201	B*1525	B*1539	B*1570	B*1588	B*4604	B*5208		B*1545		
	B*1528	B*1540	B*1575	B*1592	B*4605	B*7805		B*1555		
Unclassified										
B*0708	B*0806	B*1310	B*1543	B*1589	B*2723	B*3547	B*3709	B*4008	B*4410	B*4901
B*0710	B*0810	B*1311	B*1544	B*1804	B*2726	B*3548	B*3802	B*4013	B*4411	B*4902
B*0711	B*0814	B*1312	B*1556	B*1807	B*2729	B*3549	B*3803	B*4025	B*4412	B*4903
B*0713	B*0817	B*1404	B*1557	B*1808	B*3510	B*3550	B*3804	B*4027	B*4415	B*5107
B*0727	B*1301	B*1506	B*1564	B*1809	B*3513	B*3552	B*3808	B*4037	B*4417	B*5115
B*0728	B*1302	B*1511	B*1566	B*1812	B*3516	B*3556	B*3912	B*4046	B*4418	B*5122
B*0729	B*1303	B*1521	B*1571	B*1818	B*3519	B*3702	B*3919	B*4060	B*4506	B*5206
B*0732	B*1304	B*1527	B*1576	B*2708	B*3520	B*3705	B*3920	B*4061	B*4701	B*5303
B*0738	B*1306	B*1529	B*1577	B*2712	B*3523	B*3706	B*3922	B*4105	B*4702	B*5305
B*0804	B*1307	B*1532	B*1584	B*2716	B*3525	B*3707	B*3931	B*4202	B*4703	B*5307
B*0805	B*1308	B*1536	B*1587	B*2718	B*3527	B*3708	B*4007	B*4409	B*4806	B*5309

Les tableaux 6 et 7 représentent la classification des allèles HLA-A et HLA-B en supertypes. Certains allèles peuvent être associés à un ou plusieurs supertypes (neuf allèles ont des spécificités chevauchantes avec les supertypes A01 et A03 et dix autres allèles ont des spécificités chevauchantes pour les supertypes A01 et A24). Cependant, certains allèles ne sont attribués à aucun supertype connu (non classés). Les allèles en vert représentent le groupe de référence où le motif de liaison a été établi expérimentalement. Les allèles restants ont été classés selon la correspondance de leurs poches B et F à différents résidus: En Blanc: 2 correspondances parfaites, Jaune: une correspondance parfaite et une partielle, Gris: 2 correspondances partielles. Rouge: Aucune correspondance (allèles non classés)

L'identification d'épitopes T pouvant se lier à plusieurs allèles d'un même supertype serait donc d'un grand intérêt puisque la reconnaissance et la présentation de ces épitopes fournirait une bonne couverture vaccinale de la population humaine. Il est cependant à noter que les superotypes ne sont pas toujours prédictifs d'une fixation peptidique stable ([Macdonald *et al.*, 2003](#)).

Tableau 8. Estimation de la couverture de la population mondiale par combinaison de différents superotypes HLA-I ([Sette et Sidney, 1999](#))

HLA-supertypes	Phenotypic frequency					
	Caucasian	N.A. Black	Japanese	Chinese	Hispanic	Average
A2, A3, and B7	83.0	86.1	87.5	88.4	86.3	86.2
A2, A3, B7, A24, B44 and A1	99.5	98.1	100.0	99.5	99.4	99.3
A2, A3, B7, A24, B44, A1, B27, B62, and B58	99.9	99.6	100.0	99.8	99.9	99.8

Tableau 9. Classification des allèles HLA-II en superotypes ([Greenbaum *et al.*, 2011](#))

Supertype	Alleles
Main DR	DRB1*0101, 0701, 0901, DRB1*1101, 1201 and 1501, DRB5*0101 and DPB1*1401
DR4	DRB1*0401, 0405 and 0802
DRB3	DRB1*0301, 1302, DRB3*0101, 0202 and DRB4*0101
Main DP	DPB1*0101, 0402 and 0501
DP2	DPB1*0201, and 0401
Main DQ	DQB1*0201, 0302, 0402, and 0501
DQ7	DQB1*0301 and 0602

III.5.7.2. Processing et présentation des Antigènes par les molécules HLA

- Interaction HLA-I/peptides et présentation croisée

La voie classique de la présentation par les molécules HLA-I implique l'apprêtement et la présentation de protéines intracellulaires. Dans le cytosol, la protéine est dégradée en peptides par un complexe enzymatique multi-protéique appelé protéasome ([Figure 12](#)). Les peptides générés vont être transportés vers le RE d'une manière active ATP-dépendante par le transporteur de peptides TAP. A ce niveau, l'hétérodimère TAP s'associe avec un certain nombre de protéines chaperons, comme la calreticuline, ERp57 et tapasine pour former le PLC ou Peptide Loading Complex, permettant de recruter et de stabiliser les molécules HLA-I vides de peptides, nouvellement synthétisées dans le RE. La fixation du peptide sur la molécule du HLA va s'accompagner de la dissociation des molécules chaperons.

Le complexe HLA-I-peptide va migrer à travers l'appareil de golgi et atteindre la surface

cellulaire où il sera exposé aux LT CD8+ (**Figure 12, cercle rouge**).

Parallèlement à cette voie de présentation classique, les molécules HLA-I peuvent aussi se lier à des peptides provenant de protéines exogènes internalisées par endocytose ou phagocytose. Ce processus est la cross-présentation (**Rock et Shen, 2005**). La capacité du parasite *Leishmania* à induire des cellules T CD8+ malgré sa présence à l'intérieur de la vacuole parasitophore, est un exemple de présentation d'Ag exogènes par les molécules CMH-I (**Bertholet et al., 2006**). Par ailleurs la fixation de peptides exogènes tels que ceux présents dans des vaccins peptidiques, aux molécules HLA-I, se ferait via cette voie de cross-présentation (**Purcell et al., 2007**) (**Figure 12**).

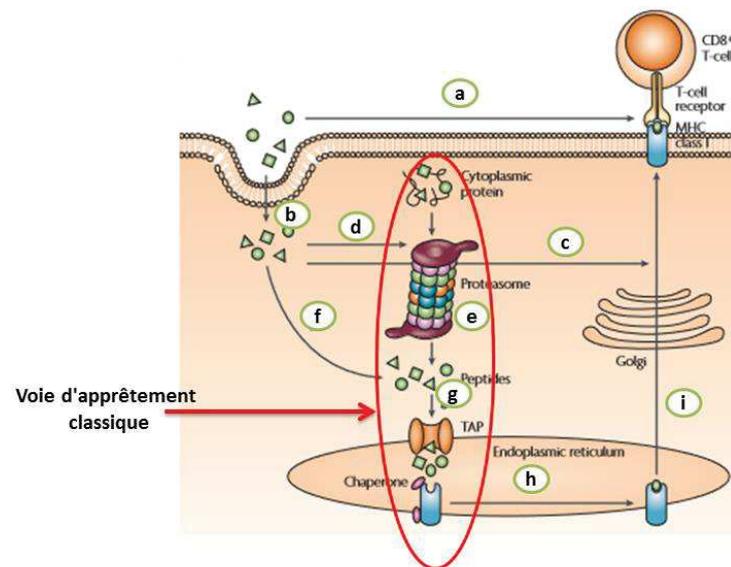


Figure 12. Interaction HLA-I-peptide: présentation classique et cross-présentation (Purcell et al., 2007)

Des peptides très affins aux molécules HLA-I, sont capables de se lier directement à ces dernières, à la surface de la CPA, sans nécessiter une internalisation par la cellule (**a**). Cependant, pour plusieurs peptides, la fixation sur la molécule HLA-I, requiert l'internalisation par la CPA, qui se ferait probablement par macropinocytose (Ackerman *et al.*, 2003; Rock et Shen, 2005) (**b**). Les peptides internalisés peuvent alors, soit croiser la voie sécrétoire par la fusion des compartiments endosomaux (**c**) soit échapper à ce compartiment endosome/lysosome et rentrer dans le cytosol (**d**). Dans le cytosol, les peptides peuvent être directement transportés vers le RE ou être dégradés, de façon supplémentaire, par le protéasome puis être transportés vers le RE à l'aide des transporteurs TAP (**e,f**). Durant ces étapes, les peptides peuvent être exposés à une dégradation supplémentaire ou être détruits par des peptidases présentes dans le cytosol et dans le RE (**g**). Les peptides transportés dans le RE, se lient rapidement au sillon de fixation de la molécule HLA-I, avec l'aide de molécules chaperons (**h**). Le complexe HLA-I-peptide est alors protégé de la protéolyse et migre à la surface cellulaire à travers l'appareil de Golgi, pour être présenté aux cellules T CD8+ (**i**).

- Interaction HLA-II/peptides

Les Ags exogènes sont internalisés par endocytose ou par leur fixation à un récepteur de surface, puis dégradés par des protéases du compartiment endolysosomal acide, en peptides

d'une vingtaine d'AA. Les molécules de classe II néosynthétisées s'associent dans le RE où elles sont stabilisées en présence d'une chaîne invariante li (protéine chaperon) (**Figure 13**). Cette protéine a pour rôle de protéger le site de fixation peptidique et de diriger la molécule du CMH-II vers les compartiments endosomaux au niveau desquels elle va rencontrer son ligand. Le complexe MHC-li migre à travers l'appareil de golgi vers un compartiment endosomal appelé MIIC (MHC class II compartment). La chaîne li va subir une protéolyse progressive dans les endosomes, aboutissant à un peptide d'une vingtaine d'aa appelé CLIP (Class II-associated invariant chain peptide) qui maintient la cavité dans sa bonne conformation tout en empêchant la fixation de peptides libres. La libération du CLIP va permettre à la molécule HLA-II l'accueil, dans sa cavité, d'un peptide issu de la protéolyse endosomale. Ce complexe HLA-II-peptide migre à la surface cellulaire où il est présenté aux TCR des LT CD4+ (**Figure 13**). Les peptides très affins aux molécules HLA-II peuvent être directement liés à ces dernières sans dégradation préalable du peptide.

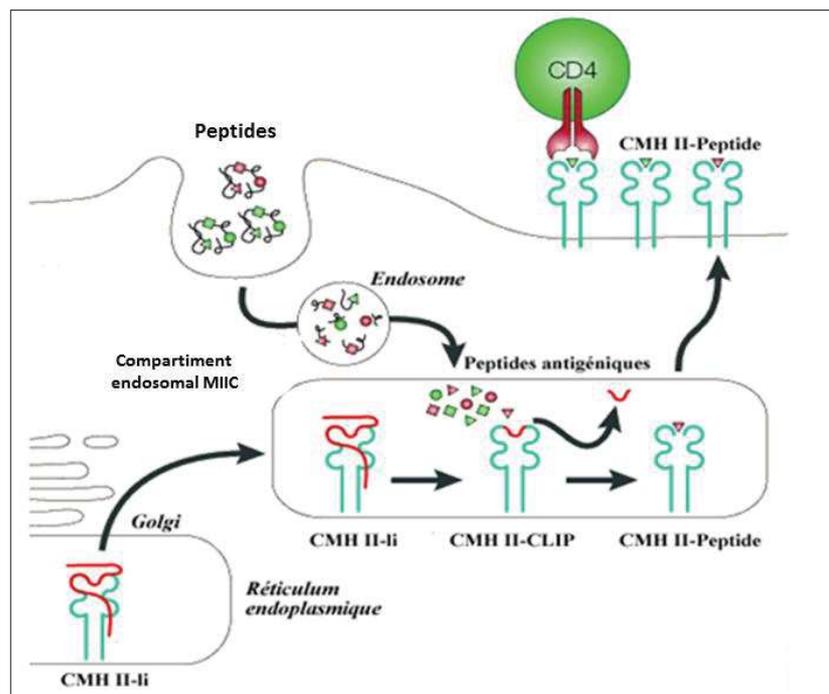


Figure 13. Présentation antigénique par les molécules HLA-II

http://virologie.free.fr/documents/virologie/06-CMH_2/CMH_II.htm

Matériel et méthodes

I. Matériel

I.1. Groupes de donneurs

I.1.1. Donneurs immuns (guéris de LCZ) utilisés pour évaluer l'immunogénicité des peptides

Les cellules mononucléées humaines ont été isolées à partir d'individus guéris de LC due à *L. major* (CLm, Cured *L. major* infected patients) (Tableau 10).

61 individus volontaires adultes, avec une moyenne d'âge de 44 ± 14.5 ans ont été recrutés dans des foyers d'endémie pour la LC, situés dans les gouvernorats de Kairouan et de Gafsa (centre de la Tunisie), dans lesquels la LCZ due à *L. major* est présente à l'état endémique (Ben Salah *et al.*, 2005; Bettaieb *et al.*, 2014).

Tableau 10. Données clinico-épidémiologiques et immunologiques des individus guéris de LCZ

Statut	Guéris de LCZ (CLm)	Naïfs (N-tn)
Nombre d'individus	61	28
Moyenne d'âge (ans) (Moy \pm DS)	44.6 ± 14.5	32 ± 11.7
Sexe-ratio (M/F)	0.48	0.3
Nombre moyen de cicatrices (Moy \pm DS)	1.8 ± 1.1	0
Réponse IFN- γ au SLA (pg/ml)*	$2298 \pm 1689.9 / 219.9 \pm 843$	$18.9 \pm 19.5 / 64.9 \pm 137.7$

*Moyenne du SLA \pm DS/Moyenne de NS \pm DS

Les critères d'inclusion étaient les suivants:

- Individus vivant en zone d'endémie de LCZ due à *L. major*
- Présence de cicatrices spécifiques de l'infection par *L. major*
- Production d'IFN- γ par les PBMC, *in vitro*, en réponse à une préparation d'Ag solubles de *Leishmania* (SLA, Soluble *Leishmania* Antigen).

Ce groupe d'individus a été utilisé pour évaluer l'immunogénicité des peptides et la capacité de ces derniers à stimuler les LT déjà sensibilisés (LT effecteurs/mémoires) par les parasites *Leishmania* au cours de l'infection.

Nous avons aussi utilisé des individus naïfs comme contrôles négatifs (N-Tn, Individus naïfs recrutés à Tunis). 28 individus, volontaires adultes sains, avec une moyenne d'âge de 32 ± 11.7 ans ont été recrutés dans des zones de faible endémicité (Tunis) (Tableau 10).

Les critères de sélection étaient les suivants :

- Individus n'ayant pas vécu en zone d'endémie de leishmaniose
- Aucun antécédent de leishmaniose
- Pas de production d'IFN- γ , par les PBMC, *in vitro*, en réponse au SLA.

Ce groupe d'individus a été utilisé pour évaluer la spécificité des peptides multi-épitopiques. Une réponse négative observée dans ce groupe d'individus naïfs atteste de la spécificité de la réponse des peptides vis à vis des Ags parasitaires.

Les critères d'exclusion pour ces 2 groupes de donneurs ont été la présence de pathologies autres que la leishmaniose (pathologies infectieuses, auto-immunes, déficits immunitaires...).

Les femmes enceintes ont été également exclues de nos groupes.

Tous ces individus (CLm et N-Tn) ont subi un prélèvement sanguin de 20ml, effectué dans des tubes héparinés (anti-coagulant).

Le recrutement des donneurs, la collecte des données clinico-épidémiologiques et les prélèvements sanguins, ont été réalisés suivant des protocoles définis et approuvés par le comité d'éthique bio-médicale de l'IPT. Tous les individus recrutés dans le cadre de ce travail ont reçu une fiche d'information ainsi qu'une fiche de consentement, qu'ils ont signé, après avoir accepté de participer à notre étude. Pour chaque donneur, une fiche de renseignement (voir section Annexe) contenant des informations telles que âge, sexe, résultat du diagnostic, présence ou non de cicatrice, réponse IFN- γ au SLA, antécédents médicaux (HIV, hépatites, diabète...), a été établie.

I.1.2. Donneurs naïfs utilisés pour évaluer l'immunogénicité des peptides

Ces donneurs (**N-Fr, Individus naïfs recrutés en France**) ont été utilisés pour évaluer la capacité des peptides multi-épitopiques à stimuler les LT naïfs d'individus n'ayant aucun antécédent de leishmaniose.

Des poches de sang total de 500 ml issus de 3 individus adultes, sains et naïfs pour les leishmanioses ont été fournies par l'établissement français du sang de la région de Bordeaux (France).

Il faut bien noter que le groupe des individus naïfs (**N-Fr**) décrit ci-dessus est différent de celui utilisé comme contrôle négatif noté (**N-Tn**). Deux protocoles de stimulations distincts ont été utilisés pour chacun des deux groupes.

I.2. Antigènes et peptides multi-épitopiques

- **Phytohémagglutinine (PHA)** : C'est un mitogène des cellules T, utilisé comme contrôle positif pour le dosage des cytokines (IFN- γ , TNF- α , GrB, IL-10) chez tous les individus (sains ou guéris), à une concentration finale de 10 μ g/ml (Sigma).

- **Soluble *Leishmania* Antigens (SLA)** : Le SLA a été préparé à partir de promastigotes en phase stationnaire (isolat *L. major*, MHOM/TN/94/GLC94), à une concentration finale de

10µg/ml. Cette préparation a été utilisée comme contrôle positif, chez les individus guéris, permettant de valider une infection antérieure par *Leishmania*.

- **PMA/Ionomycin** : La PMA/Ionomycin a été utilisée comme contrôle positif lors du phénotypage des LT, à une concentration finale de 50ng/ml pour la PMA (Sigma) et de 10⁻⁶M pour le calcium Ionomphore (Sigma).

- **Peptides contrôles CEF (Cytomegalovirus, Epstein Barr virus et Influenza virus)** : Ce mix est formé par 23 peptides viraux restreints aux molécules HLA-I les plus représentées dans la population mondiale. Ces peptides sont issus du cytomégalovirus (CMV), d'Epstein Barr (EBV) et du virus de la grippe (Influenza). Il a été démontré que ce pool était capable d'induire des réponses IFN-γ chez près de 90% des caucasiens (Currier *et al.*, 2002).

Le mix CEF a été utilisé comme contrôle positif à une concentration de 2.5 µM pour pulser les CD afin de stimuler les LT CD8+ naïfs des individus sains (N-Fr).

- **Protéines candidates** : Les peptides multi-épitopiques utilisés au cours de notre travail ont été conçus à partir de trois protéines de *Leishmania*, candidats vaccins potentiels contre l'infection par *Leishmania*; une protéine sécrétée/excrétée, La PSA (Promastigote Surface Antigen de *L. amazonensis*), et 2 protéines intracellulaires, la LmlRAB (RAB GTPase de *L. major*) et la H2B (Histone de *L. major*) (Tableau 11).

Tableau 11. Protéines candidates utilisées pour le criblage des épitopes

Abbreviations	Nom de la protéine	Espèce de <i>Leishmania</i>	Numéro d'accension*	Nombre d'aa**
H2B	Histone	<i>L. major</i>	AF336276	111
		<i>L. donovani</i>	XP_003858819	111
		<i>L. infantum</i>	XP_001463598	111
		<i>L. braziliensis</i>	XP_001564132	111
		<i>L. Mexicana</i>	XP_003874182	107
PSA	Promastigote Surface Antigen	<i>L. amazonensis</i>	ACY70940	371
		<i>L. infantum</i>	ACY70941	463
		<i>L. donovani</i>	AAY96325	386
		<i>L. major</i>	AAB38549	385
		<i>L. tropica</i>	AAF80491	626
		<i>L. braziliensis</i>	XP_001563125	912
		<i>L. mexicana</i>	XP_003873184	367
LmlRAB	<i>Leishmania major</i> large RAB GTPase	<i>L. chagasi</i>	AAB62271	417
		<i>L. major</i>	AY962589	611
		<i>L. donovani</i>	XP_003863179	609
		<i>L. infantum</i>	XP_001467349	609
		<i>L. braziliensis</i>	XP_001567099.1	609
		<i>L. mexicana</i>	XP_003877608.1	610

* Les séquences des protéines ont été extraites de la base de données NCBI

**aa : Acide Aminé

Peptides multi-épitopiques

Au cours de ce travail, nous avons testé des peptides multi-épitopiques dont la conception a été effectuée dans le laboratoire UMR 177 INTERTRYP, à l'IRD de Montpellier par Yasmine Messaoudi, au cours de son master intitulé « *Conception de peptides multi-épitopiques à partir de protéines de Leishmania et analyse préliminaire de leur immunogénicité chez l'homme* », (master co-encadré par R. Bras-Gonçalves et A. Garnaoui, dans le cadre d'une cotutelle entre l'IRD et l'IPT).

Les peptides multi-épitopiques ont été conçus, à partir des protéines PSA, LmlRAB et H2B en utilisant des outils de la bio-informatique, selon une stratégie décrite dans la partie Méthodes.

La production des peptides a été effectuée par la société Protéogenix (France). Ils ont été reçus sous forme lyophilisée, ont été solubilisés selon les recommandations du fournisseur et stockés à -80°C.

II. Méthodes

II.1. Processus de conception, *in silico*, des peptides multi-épitopiques

Les étapes du processus de conception des peptides multi-épitopiques sont schématisées dans la **figure 14**.

Brièvement, les séquences peptidiques des protéines H2B, LmlRAB et PSA issues de différentes espèces de *Leishmania* (*L. major*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. chagasi*) ont été extraites à partir de la base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>).

Align Sequences Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi/>) et **Clustal Omega**, des programmes d'alignement de séquences multiples (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), ont été utilisés afin d'analyser la similarité des séquences entre les protéines de différentes espèces de *Leishmania*. Les séquences consensus pour certaines régions des protéines, présentant une bonne homologie mais qui ne sont pas complètement identiques (100% d'identité), ont été obtenues par **CONS EMBOSS Explorer** (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/cons>) et ont été créées selon la proximité entre les aa donnée par la classification de Taylor (**Taylor, 1986**). La similarité des séquences entre le parasite *Leishmania* et les protéines humaines a été également analysée par le serveur **Protein BLAST** (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) afin d'exclure les régions protéiques ayant une homologie significative avec les protéines humaines.

- **Prédiction des épitopes affins pour les molécules HLA et conception des peptides multi-épitopiques**

L'identification des épitopes T affins aux molécules HLA-I et -II issus des séquences conservées ou consensus a été réalisée par les serveurs **NetMHC 3.2** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC-3.2/>), **NetMHCII 2.2** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII-2.2/>) et **IEDB T Cell Epitope Prediction Tools** (<http://tools.iedb.org/mhci/> and <http://tools.iedb.org/mhcii/>).

Pour les épitopes qui se fixent aux molécules HLA-I, les peptides de 8, 9 ou 10 aa ont été analysés. Chaque épitope a été prédit pour son affinité de liaison à 57 molécules HLA (29 HLA-A et 28 HLA-B), les plus fréquentes dans la population mondiale et représentatives de groupes d'allèles appelés supertypes, caractérisés par des répertoires de fixation peptidique chevauchants (**Lund et al., 2004; Sidney et al., 2008**). La sélection des épitopes a été basée sur leur affinité théorique aux molécules HLA-I sélectionnées, calculée par **IEDB** et **NetMHC 3.2** et exprimée en unité IC50 (nM) (quantité d'épitope nécessaire pour concurrencer un épitope de référence). Un seuil inférieur à 50nM correspond à une forte affinité ou strong binding (SB) et celui inférieur à 500nM correspond à une affinité modérée à faible ou weak binding (WB). Les épitopes ayant une IC50 supérieure à 500nM, ont été éliminés.

Les épitopes sélectionnés ont par la suite été assemblés (en « collier de perles ») pour construire des peptides multi-épitopiques (**Sette et al., 2002**).

Une prédiction des sites de clivage par le protéasome a été réalisée par NetCHOP 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/>) et PAMProC II (<http://www.paproc2.de/paproc1/paproc2.html>). Des résidus 'linkers ou spacers' composés de certains acides aminés (ARY, RY, GR ou TV) ont été rajoutés, si nécessaire, pour améliorer le clivage des peptides par le protéasome lors de la présentation par HLA-I (**Levy et al., 2007; Cardinaud et al., 2009**).

Concernant les épitopes affins aux molécules HLA-II, des épitopes de 15 mer ont été prédits à partir de chaque séquence protéique conservée ou consensus. L'affinité de fixation de chaque épitope a été prédite pour les allèles HLA-II les plus représentés dans la population classés en supertypes: Main DR (DRB1 * 0101, DRB1 * 0701, DRB1 * 0901, DRB1 * 1101, DRB1 * 1201, DRB1 * 1501, DRB1 * 1501, DRB1 * 0101 et DPB1 * 1401), DR4 (DRB1 * 0401, DRB1 * 0405 et DRB1 * 0802, DRB3 (DRB1 * 0301, DRB1 * 0301, DRB1 * 0301, 1302, DRB3 * 0101, DRB3 * 0301, DRB3 * 0201 et DRB4 * 0101), Main DP (DPB1 * 0101,

DPB1 * 0402 et DPB1 * 0501) et DP2 (DPB1 * 0201 et DPB1 * 0401) (**Greenbaum et al., 2011**). Les valeurs IC50 ont été calculées en utilisant les serveurs **IEDB** et **NetMHCII 2.2**.

Des régions riches en épitopes affins aux molécules HLA-II (Hot spot areas) ont été sélectionnées au sein de chaque séquence protéique conservée ou consensus afin de concevoir de longs peptides.

L'estimation théorique de la couverture mondiale des épitopes sélectionnés a été calculée par **IEDB Population coverage tools** (<http://tools.iedb.org/population/>). Cette estimation a été réalisée pour 115 pays et pour 21 ethnies regroupées en 16 zones géographiques différentes.

Ci-dessous, seront détaillés les résultats des prédictions, *in silico*, des épitopes affins aux molécules HLA-I ou HLA-II ainsi que ceux de la conception des peptides multi-épitopiques. Cette partie n'a pas été incluse dans la partie Résultats de la thèse étant donné qu'elle a été effectuée par Y. Messaoudi et R. Bras Gonçalves.

- Résultats de la prédiction, *in silico*, des épitopes affins aux molécules HLA-I et conception de peptides multi-épitopiques de classe I

Un alignement de séquence des protéines H2B et LmlRAB de *L. major* a été réalisé avec les séquences protéiques correspondantes de *L. donovani*, *L. infantum*, *L. mexicana* et *L. braziliensis*. Les alignements ont montré un pourcentage d'identité allant de 80,7 à 98,2% et de 63,6 à 90,8% pour H2B et LmlRAB, respectivement.

Les alignements de séquences protéiques de la PSA de *L. amazonensis* avec les autres protéines de la famille PSA de *L. infantum*, de *L. donovani*, de *L. tropica*, de *L. chagasi* et de *L. braziliensis*, ont révélé un pourcentage d'identité allant de 47,4% à 80,3%. Ces variations dans les pourcentages d'homologie s'expliquent par le fait que la région centrale (domaine LRR) et C-terminale des protéines PSA sont plus divergentes que la région N-terminale (**Bras-Goncalves et al., 2014**).

La prédiction de l'affinité des épitopes T aux molécules HLA-I, a été effectuée au niveau des régions hautement conservées ou des séquences consensus de ces protéines. La sélection a été basée sur (i) le score de liaison (IC50), calculé à partir de IEDB et NetMHC 3.2 (ii) la promiscuité des épitopes (présentation par plusieurs molécules HLA-I d'un supertype et, lorsque cela a été possible, par différents supertypes HLA-I) (iii) l'absence d'homologie avec les protéines humaines.

Un total de 19 épitopes ont été sélectionnés, parmi lesquels 4, 8 et 7 épitopes affins aux molécules HLA-I ont été identifiés à partir de H2B, LmlRAB et PSA, respectivement (**Tableau 12**).

Tableau 12. Caractéristiques des épitopes affins aux molécules HLA-I, conçus *in silico*, à partir des protéines H2B, PSA et LmlRAB

Protéine	Séquence des épitopes	Supertypes HLA-I à forte affinité (SB*) (IC50 ^a)	Supertypes HLA-I à faible affinité (WB**) (IC50)
H2B	KAINAQMSM	HLA-B27 (42), HLA-B58 (16)	HLA-A01/03 (107), HLA-B62 (293)
	MERICTEAA	HLA-B44 (24)	
	MSMSHRTMK	HLA-A01/A03 (41), HLA-A03 (5)	HLA-B27 (415)
	SMSHRTMKI	HLA-A02 (10)	HLA-A01 (110), HLA-B08 (165), HLA-B27 (235)
PSA	TPEQRTNTL	HLA-B07 (18), HLA-B27 (50)	HLA-B08 (68)
	ELGKKWIG	HLA-B08 (14)	
	TLPEMPVGV	HLA-A02 (2)	
	PEMPAGVDY		HLA-B44 (193)
	ARGREGYFLA		HLA-B27 (233)
	EGYFVTDEK	HLA-A03 (19)	
	GARGREGY		HLA-B58 (80)
LmlRAB	MENNITGGL	HLA-B44 (14)	
	KTKQHLREM	HLA-A01/A03 (26), HLA-B58 (12)	HLA-A01 (71)
	RFAQGEHDI		HLA-A24 (151)
	RLPENAFVI	HLA-A01 (26), HLA-A02 (4)	
	TQGSSKAGF		HLA-B27 (120), HLA-B62 (73)
	MPHVDQSSI	HLA-B07 (23)	
	ASFRSTEAI		HLA-A01 (103), HLA-B27 (62)
	SSIMVVANK	HLA-A03 (7)	HLA-A01/A03 (94)

^aValeurs de IC50 (nM) calculées par NetMHC 3.2 et IEDB.

*Strong binders: Forte affinité (IC50<50nM). **Weak binders: Affinité modérée à faible (50nM>IC50<500nM).

Les épitopes sélectionnés possèdent une affinité forte à faible pour au moins un des supertypes HLA-I analysés. Des peptides multi-épitopes composés d'épitopes HLA-I dérivés de chaque protéine ont été conçus afin d'augmenter la couverture de la population cible. Au total 7 peptides multi-épitopiques affins aux molécules HLA-I ont été obtenus (i) un peptide multi-épitopique contenant 4 épitopes de 9-mer dérivés de H2B (**H2BI**, 40-mer) (ii) trois peptides multi-épitopiques de 9-mer issus de LmlRAB (**RABI.1**, 25-mer, 2 épitopes ; **RABI.2**, 34-mer, 3 épitopes et **RABI.3**, 36-mer, 3 épitopes) et (iii) trois peptides multi-épitopiques contenant des épitopes de 8, 9 ou 10-mer dérivés de la PSA (**PSAI.3**, 19-mer, 2 épitopes; **PSAI.4**, 18-mer, 2 épitopes et **PSAI.5**, 28-mer, 3 épitopes) (**Tableau 13**). Ces séquences peptidiques ont fait l'objet d'un brevet (Patents WO/2014/102471, PCT / EP2019 / 064088).

Tableau 13. Caractéristiques des épitopes affins aux molécules HLA-I, conçus *in silico*, à partir des protéines H2B, PSA et LmlRAB

Protéine	Peptide	Séquence des peptides multi-épitopiques	Nombre d'aa*	PM** (g/mol)	Supertypes HLA-I pour lesquels les peptides sont affins
H2B	H2BI	KARYMSMSHRTMKSMHRTMKIKAINAQMSMMERICTEAA	40	4917.00	HLA-A01, HLA-A02, HLA-A01/A03, HLA-A03, HLA-B08, HLA-B27, HLA-B44, HLA-B58, HLA-B62
					HLA-B07, HLA-B08, HLA-B27
					HLA-A01, HLA-A02, HLA-A01/A24, HLA-B08, HLA-B44, HLA-B62
PSA	PSAI.3	KTPEQRTNLTVELGKKWIG	19	2538.10	HLA-A01, HLA-A02, HLA-A01/A03, HLA-A03, HLA-B27, HLA-B44, HLA-B58, HLA-B62
					HLA-A01, HLA-A02, HLA-A01/A24, HLA-B08, HLA-B44, HLA-B62
					HLA-A01, HLA-A02, HLA-A01/A03, HLA-A03, HLA-B27, HLA-B44, HLA-B58, HLA-B62
LmlRAB	RABI.1	KARYMENNITGGLARYKTKQHVREM	25	3233,93	HLA-A01/A03, HLA-B44, HLA-B58, HLA-A01
					HLA-A01, HLA-A02, HLA-A24, HLA-B27, HLA-B62
					HLA-A01, HLA-A01/A03, HLA-A03, HLA-B07, HLA-B27
LmlRAB	RABI.2	KARYRFAQGEHDIRLPENAFVIARYTQGSSKAGF	34	4123.82	HLA-A01, HLA-A02, HLA-A24, HLA-B27, HLA-B62
					HLA-A01, HLA-A01/A03, HLA-A03, HLA-B07, HLA-B27
					HLA-A01, HLA-A01/A03, HLA-A03, HLA-B07, HLA-B27
LmlRAB	RABI.3	KARYMPHVDQSSIARYASFRSTEAIRYSSIMVVANK	36	4373.20	HLA-A01, HLA-A01/A03, HLA-A03, HLA-B07, HLA-B27
					HLA-A01, HLA-A02, HLA-A24, HLA-B27, HLA-B62
					HLA-A01, HLA-A01/A03, HLA-A03, HLA-B07, HLA-B27

*aa: acide aminée

**PM: Poids moléculaire (g/mol) obtenu par spectrométrie de masse

Les lettres en gras (**K**, **KARY**, **ARY**, **RY**, **TV**) représentent les spacers ajoutés aux séquences des peptides multi-épitopiques. Les cystéines (C) ont été remplacées par les glycines (G) soulignées.

Ces peptides possèdent une forte ou faible affinité pour tous les supertypes HLA-I, fournissant ainsi une large couverture de la population (couverture estimée à 95,55% calculée par IEDB) (**Tableau14**).

Tableau 14. Estimation de la couverture de la population

Population / Région	HLA-I			HLA-II			HLA-I/-II Combiné		
	Coverage ^a	Average_hit ^b	pc90 ^c	Coverage ^a	Average_hit ^b	pc90 ^c	Coverage ^a	Average_hit ^b	pc90 ^c
Monde	95.55%	4.51	1.81	99.59%	10.39	5.6	99.98%	14.91	9.2

^aProjected population coverage: Couverture de la population

^bAverage number of epitope hits/HLA combinations recognized by the population: Nombre moyen de combinaisons épitopes/HLA reconnues par la population

^cMinimum number of epitope hits/HLA combinations recognized by 90% of the population: Nombre minimal de combinaisons épitopes/HLA reconnues par 90% de la population

- Résultats de la prédiction, *in silico*, des régions riches en épitopes affins aux molécules HLA-II et conception de peptides multi-épitopiques de classe II

Des régions riches en épitopes de 15-mer, restreints par les molécules HLA-II et pouvant se lier à un ou plusieurs supertypes HLA-II (régions « Hot spot »), ont été sélectionnées à partir de régions hautement conservées ou de séquences consensus de H2B, LmIRAB et PSA. Les peptides sélectionnés ont été alignés avec les séquences protéiques correspondantes de *L. amazonensis*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. chagasi* et *L. major* (40,74 à 100%). Les analyses d'homologies de séquences avec les protéines humaines ont montré très peu ou pas d'homologie avec les peptides sélectionnés.

Des aa supplémentaires (K ou KGR) ont été introduits pour améliorer la solubilité des peptides dans l'eau ou pour introduire une queue lipidique en position N-terminale. Les peptides riches en épitopes affins aux molécules HLA-II ont été sélectionnés en se basant sur leur affinité (forte ou faible) aux 18 allèles HLA-II les plus fréquents et représentatifs des supertypes HLA-II (**Tableau 15**).

Tableau 15. Caractéristiques des séquences riches en épitopes affins aux molécules HLA-protéines H2B, PSA et LmlRAB

Protéine	Peptide	Séquence riche en épitopes HLA-II	Nombre d'aa*	PM** (g/mol)	Supertypes HLA-II à forte affinité (SB ^a) (IC50 ^b)
H2B	H2BII	KGRKPKRSWNVYVGRSLKAINAQMSMSHRTMKIV	34	4199.23	DR1: DRB1*0101(4), DR7: DRB10701 (19), DR9: DRB1*0901 (43), DR11/DR12: DRB1*1101/DRB1*1201 (44), DRB5: DRB5*0101 (43), DRB4: DRB4*0101 (13)
					DR3: DRB1*0301 (8), DRB3: DRB3*0101/DRB3*0202 (26)
PSA	PSAII.6	KGRAAR <u>S</u> ARS <u>G</u> EGYFLTDEK <u>T</u> SLVYGDGG	29	3287.76	DR1: DRB1*0101 (39), DR7: DRB10701 (14), DR4: DRB1*0401 (22), DP402: DPB1*402 (30)
					DR1: DRB1*0101 (13), DR7: DRB10701 (6), DR13: DRB1*1302 (27), DRB3: DRB3*0101/DRB3*0202 (16), DRB4: DRB4*0101 (48)
LmlRAB	RABII.4	KGRLHSVGRHLSIVADHMPHLDQ	24	2941.58	DR7: DRB*10701 (31), DR11/DR12: DRB1*1101/DRB1*1201 (32), DR3: DRB1*0301 (38), DP1: DPB1*0101 (34), DP2: DPB1*0201 (11), DP401: DPB*0101 (32)

*aa: Acide aminé **PM Poids Moléculaire ^aStrong binders. ^bValeurs de IC50 (nM) calculées par NetMHC
^cWeak binders. Les sérines soulignées (S) ont remplacé les cystéines C).

Au total, 5 peptides multi-épitopiques ayant une forte ou faible affinité pour tous les supertypes HLA-II, ont été conçus, fournissant ainsi une large couverture de la population qui a été estimée à 99,59% (**Tableau 14**).

Il est intéressant de noter que si l'on considérait l'ensemble des peptides multi-épitopiques conçus, ayant une forte affinité pour différentes molécules HLA-I et -II, en tant que composants d'un candidat vaccin, ces derniers pourraient être associés à un fort potentiel immunisant dans les zones d'endémie de la leishmaniose (**Tableau 14**).

- Propriétés physico-chimiques et synthèse de peptides multi-épitopiques

ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) et Peptide property calculator (<https://www.pepcalc.com/>) ont été utilisés pour évaluer les propriétés physico-chimiques des peptides conçus. Le poids moléculaire des peptides multi-épitopiques a été obtenu par spectrométrie de masse (Proteogenix, Schiltigheim, France).

Les peptides multi-épitopiques ont été couplés à une queue palmitoylée en position N-terminale fixée sur une Lysine (N ϵ -palmitoyl-lysine). Il a été démontré que la queue lipidique favorisait la présentation des peptides par les CPA et que les lipopeptides pouvaient constituer de puissants immunoadjuvants (**Baier et al., 2000; Loing et al., 2000; Moyle et Toth, 2008**).

Il est à noter que pour certains peptides multi-épitopiques conçus, les cystéines (S) de la séquence peptidique d'origine, ont été remplacées par une glycine (G) ou une sérine (S) afin d'éviter la formation de ponts disulfure, le repliement ou la multimérisation du peptide. D'autre part, un spacer hydrophobe (GR) a été inséré entre la lysine K N-terminale et le premier épitope du peptide afin d'améliorer leur solubilité dans l'eau (**Launay et al., 2007**).

Les peptides sélectionnés ont été synthétisés sous forme lyophilisés avec une pureté supérieure à 95% par la société Proteogenix (Schiltigheim, France) et ont été dissous, en fonction de leur solubilité, dans l'eau bidistillée, dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou le bicarbonate de sodium, dilués dans de l'eau stérilisée bidistillée et conservés à -80 ° C.

Les peptides ont été conservés à une concentration de 0.2mM et dilués 100x dans du milieu de culture (RPMI PS/GLU), lors de leur utilisation pour stimuler les cellules.

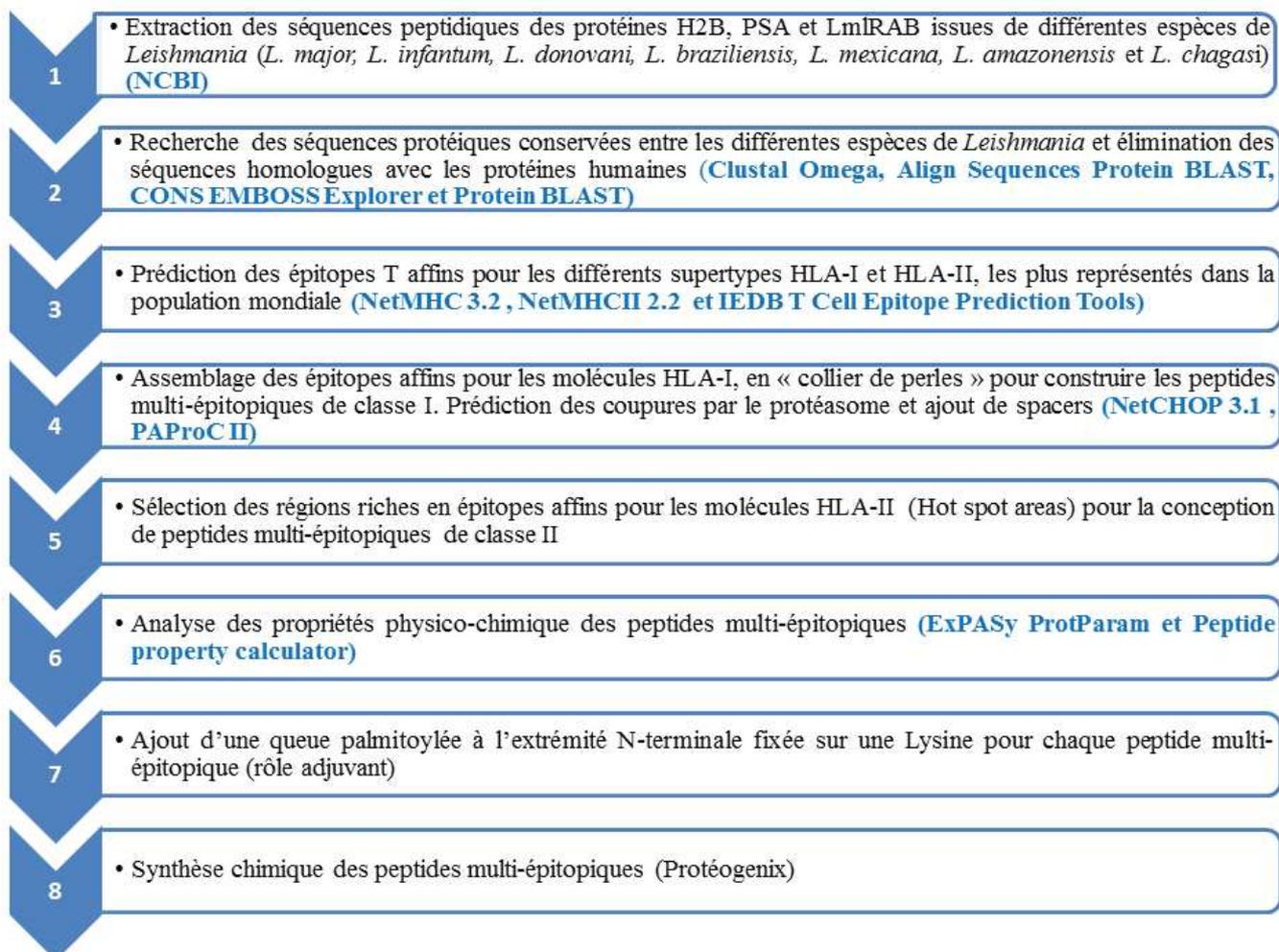


Figure 14. Processus de conception des peptides multi-épitopiques

II.2. Evaluation de l'immunogénicité des peptides multi-épitopique chez des individus guéris d'une leishmaniose cutanée due à *L. major*

II.2.1. Stimulation des PBMC par les pools de peptides et induction de la sécrétion des cytokines

Les cellules mononucléées (PBMC ou Peripheral Blood Mononuclear Cells) ont été isolées à partir du sang périphérique, par séparation sur un gradient de densité (Ficoll-Hypaque).

Le protocole de stimulation décrit ci-dessous concerne les individus guéris (CLm) et les individus naïfs (N-Tn) et s'est basé sur le protocole de stimulation décrit par Seyed et collaborateurs (Seyed *et al.*, 2011).

Les PBMC ont été incubés une nuit à 37°C, sous 5% de CO₂ (J-1) et ont été stimulées par la PHA (10µg/ml) ou le SLA (10µg/ml), utilisés comme contrôles positifs, pendant 5 jours, ou par les peptides multi-épitopiques utilisés séparément ou en combinaison, pendant 10 jours.

Chaque peptide a été utilisé à une concentration finale de 1µM. Toutes les conditions de stimulation ont été testées en triplicate.

Deux contrôles négatifs (cultures non stimulées, NS) ont également été utilisés, l'un pour les cultures de 5 jours (NS5 jr, utilisé pour les contrôles positifs PHA et SLA), l'autre pour les cultures de 10 jours (NS10 jr, utilisé pour les peptides multi-épitopiques).

De l'IL-2 recombinante humaine (BD Pharmingen™) a été rajoutée dans tous les puits à J1, J4 et J7 de la culture. Cette cytokine est un facteur de croissance essentiel pour les LT, elle joue un rôle dans la prolifération, la survie cellulaire et la différenciation des cellules T naïves en cellules effectrices et mémoires (Bamford *et al.*, 1994; Cho *et al.*, 2007). Des expériences de mise au point ont été nécessaires pour déterminer la concentration optimale d'IL-2. Différentes concentrations d'IL-2 ont été évaluées: 0,01ng/ml, 0,05ng/ml, 0,1ng/ml, 1ng/ml, 2,5ng/ml et 5ng/ml.

Au dixième jour de stimulation, les cellules et les surnageants de culture ont été récoltés après centrifugation à 300 g pendant 10 minutes. Les surnageants de culture ont été stockés à -80°C pour le dosage de IL-10 et de l'IFN-γ par ELISA et pour le dosage du TNF-α et du GrB par Cytometric beads array (CBA).

Les cellules ont été collectées et restimulées, pour l'analyse de la fréquence des LT producteurs d'IFN-γ par ELISPOT ou pour l'analyse des phénotypes des LT spécifiques par cytométrie en flux. Les conditions de re-stimulation sont décrites pour chaque test dans les paragraphes ci-dessous.

II.2.2. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

L'ELISA a été utilisée pour doser l'IFN-γ et l'IL-10

Principe

Selon la technique dite en sandwich, un premier anticorps, **l'anticorps de capture** adsorbé de façon covalente à la surface des puits, est capable de lier spécifiquement la cytokine à doser ainsi que les cytokines standard. Un deuxième anticorps spécifique couplé à une enzyme, **l'anticorps de détection**, se fixe au complexe anticorps/cytokine formé. Cette fixation est détectée par une réaction enzymatique qui transforme un substrat chromogène en un produit coloré dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de cytokine d'intérêt. Les quantités de cytokines dans les échantillons sont estimées à partir d'une gamme étalon réalisée avec des concentrations connues d'une cytokine standard (**Figure 15**).

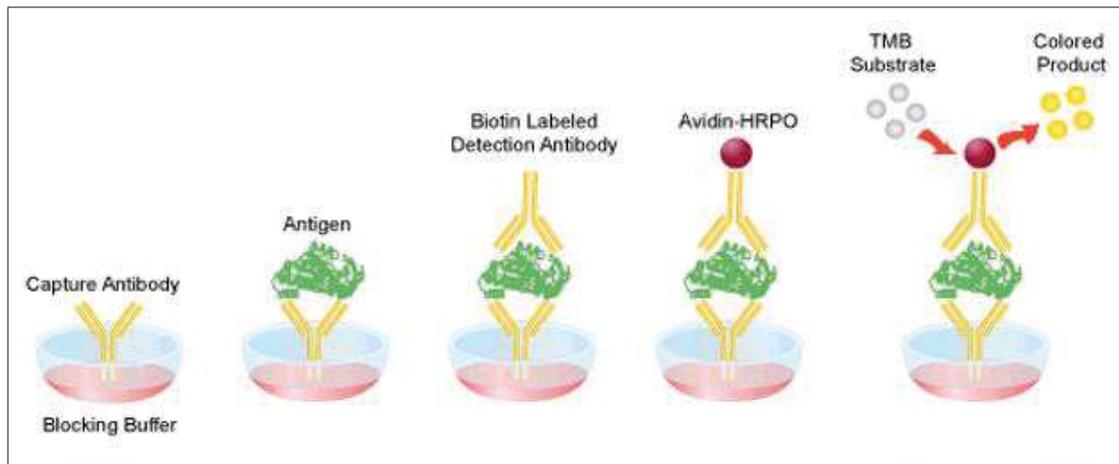


Figure 15. Détection des cytokines dans les surnageants de cultures cellulaires par ELISA

Méthodologie

Des microplaques (Maxisorps, nunc) ont été « coatées » pendant une nuit à 4°C avec 100µl/puit d'anticorps monoclonaux anti-cytokine humaine (IFN- γ , IL-10) purifiés, dilués au 1/250ème dans un tampon de coating (0,1M Carbonate de sodium, pH 9.5). Les plaques ont été lavées 3 fois avec une solution de lavage: PBS-Tween 20 à 0,05% (PBS-T). Une étape de saturation a été effectuée en rajoutant 200µl/puits d'une solution de saturation: PBS 10% SVF pendant 1 heure à température ambiante, afin de prévenir toute fixation non spécifique des anticorps utilisés ultérieurement. Après 2 lavages, la cytokine recombinante et les surnageants de culture à tester ont été rajoutés à raison de 100µl/puits et incubés pendant 2 heures à température ambiante. Une gamme de concentrations allant de 7.5 pg/ml à 1000 pg/ml, diluées dans le tampon de saturation (dilution au 1/2), a été utilisée pour la cytokine standard.

Après 5 lavages, une solution de détection a été préparée extemporanément avec un volume adéquat d'anticorps de détection (anti-IFN- γ ou anti-IL-10, humains biotinylés) dilué au 1/250ème dans le tampon de saturation et de l'enzyme (Avidin-Horseradish Peroxidase conjuguée : Avidin-HRP) dilué au 1/250^{ème} dans la préparation d'anticorps biotinylés, a été rajoutée à raison de 100µl/puits.

Après 1 heure d'incubation à température ambiante et 7 lavages, la révélation a été effectuée avec 100µl d'une solution de substrat (3, 3', 5, 5' tetramethyl benzidine: TMB), préparée en mélangeant volume à volume le substrat A et le substrat B du TMB. Après 15 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la réaction enzymatique a été arrêtée avec 50µl/puits d'une solution stop (H₂SO₄, 2N). La densité optique (DO) a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm.

Les résultats ont été exprimés en pg/ml après extrapolation à partir des courbes étalons, tracées à partir de la gamme standard correspondant à chaque cytokine.

II.2.3. CBA (Cytometric Beads Array)

Cette technique a été utilisée pour doser le TNF- α et le GrB

Principe

La technique CBA permet de doser simultanément plusieurs analytes (cytokines (dans notre cas), chémokines, protéines du complément...), dans un volume minimal d'un même échantillon biologique (surnageant de culture (dans notre cas), sérum, plasma, ...).

Elle se base sur l'utilisation de billes en polystyrène colorées par un fluorophore rouge, l'Allophycocyanine (APC), qui sont coâtées par des anticorps spécifiques pouvant capturer les cytokines à doser. Chaque population de billes est spécifique d'une cytokine déterminée et possède une intensité de fluorescence unique, permettant de la distinguer des autres populations (**Figure 16**). Ainsi, différentes populations de billes possédant des intensités de fluorescence différentes peuvent être combinées pour détecter plusieurs cytokines à la fois (test de multiplexage).

La cytokine capturée est détectée par l'addition d'un anticorps de détection fluorescent couplé à la phycoérythrine (PE) (la longueur d'onde d'émission du PE se distingue de celle des billes de capture (APC)). Grâce à une analyse par cytométrie en flux, les taux de cytokines capturées par les différents groupes de billes sont déterminés en analysant le signal du PE, qui est proportionnel à la quantité de cytokine présente dans l'échantillon. Les concentrations des cytokines sont calculées en traçant des courbes standard à partir d'une dilution en série d'un mélange des cytokines standard, de concentration connue.

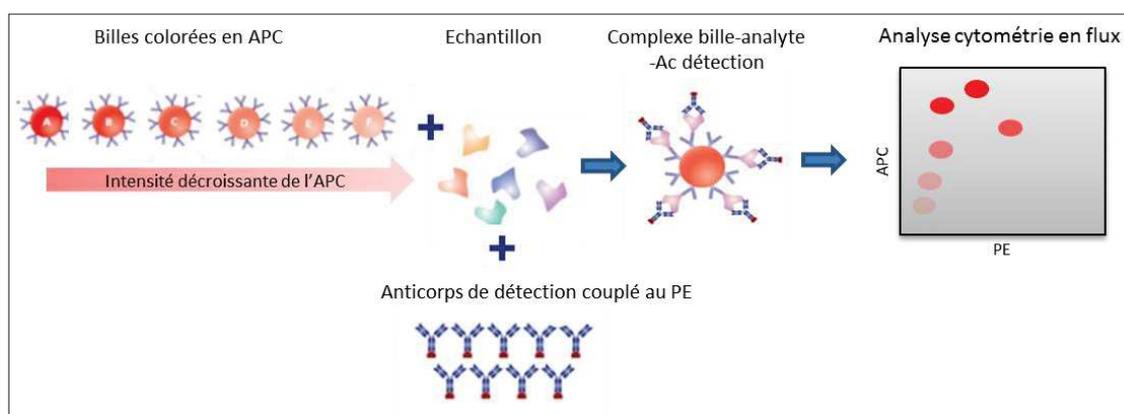


Figure 16. Schéma illustrant le principe de la CBA

Méthodologie

Des kits BD CBA Human Flex set (BD Biosciences) ont été utilisés pour doser le TNF- α et le GrB. Chaque kit spécifique d'une cytokine, contient les billes coatées par l'anticorps de capture spécifique, l'anticorps de détection PE spécifique et 2 fioles de la cytokine standard, lyophilisée. Le kit BD CBA Human Soluble Protein Master Buffer Kit (BD Biosciences), contenant « Assay diluent, capture bead diluent, capture bead diluent for serum/plasma samples, detection reagent diluent, wash buffer, instrument setup reagents », a aussi été utilisé.

1/ Préparation du mix des standards (TNF- α et GrB)

Les standards (TNF- α et GrB) ont été lyophilisés et reconstitués le jour même de l'expérience dans le tampon « Assay Diluent ». Les standards ont été mélangés dans un même tube dans lequel 2 mL du tampon « Assay diluent » ont été rajoutés. Ce tube a été placé pendant 15 minutes sur la paillasse afin de stabiliser la solution. A partir de ce tube (noté Top standard), une dilution en série (dilution au $\frac{1}{2}$) a été réalisée dans le tampon « Diluent Assay » pour avoir une gamme standard de 10 concentrations allant de 5000 pg/ml à 9,76 pg/ml (**Tableau 16**).

Tableau 16. Différentes concentrations de la gamme standard de chaque cytokine

dilution	Top standard	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Cytokine (pg/mL)	5000	2500	1250	625	312,5	138,8	78,12	39,06	19,52	9,76

2/ Préparation du mix des billes de capture de TNF- α et du GrB

Les billes de capture spécifiques du TNF- α et du GrB ont été mélangées dans un tube (noté Mix Capture Beads) (1 μ l de chaque bille/test) et diluées dans le « Capture Bead Diluent ».

Le nombre de tests incluant le nombre d'échantillons à tester, chacune des dilutions des standards et le contrôle négatif (surnageant de culture de cellules non stimulées), a été déterminé.

Par exemple pour un échantillon de surnageant de culture (un test), il faut mélanger :

- 1 μ l de billes anti-TNF- α
- 1 μ l de billes anti-GrB

Compléter à 50 μ l (2 μ l Mix de Billes de capture + 48 μ l Capture Bead Diluent)

Le mix de billes de capture « Mix TNF- α et GrB Capture Beads » a été préparé, en prenant en considération le nombre de tests à analyser par expérience.

Par exemple, pour une expérience incluant 86 échantillons (surnageants de culture à tester), 10 dilutions de standards et un contrôle négatif, nous avons prévu un mix de billes de capture pour 100 tests (1 μ l de chaque bille de capture x 100 (100 μ l par bille de capture), qsp 50 μ l x 100 soit 5 ml).

3/ Préparation du Mix Reactifs Detection PE

Les anticorps de détection spécifiques de TNF- α et de GrB couplés au PE ont été mélangés (1 μ l d'anticorps de détection/test) et dilués dans le tampon « Detection Reagent Diluent » (tube noté Mix Detection).

Pour 1 test (50 μ l): 2 μ l Mix d'anticorps de détection couplé au PE + 48 μ l Detection Reagent Diluent.

4/ Procédure du test CBA Human Flex Set

50 μ l de billes de captures ont été prélevés à parti du tube **Mix Capture Beads** préalablement vortexé et distribués dans les tubes test (tubes pour FACS). Les surnageants de culture à analyser et les différentes dilutions de la gamme standard, ont été rajoutés dans les tubes test correspondants, à raison de 50 μ l/tube. Les tubes ont été incubés à l'obscurité pendant 1 heure à température ambiante. 50 μ l d'anticorps de détection prélevés à partir du tube **Mix Detection**, ont été rajoutés à chacun des tubes test et incubés à l'obscurité pendant 2 heures à température ambiante.

Après un lavage avec du « Wash Buffer », les tubes ont été centrifugés à 200g pendant 5 min et les surnageants ont été éliminés par aspiration. 300 μ l de tampon de lavage ont été rajoutés pour resuspendre le culot de billes. Les tubes ont été conservés à l'obscurité et analysés le même jour par FACS (FACS Canto II).

5/ Préparation des tubes CBA Flex set control pour le réglage du FACS

Cette étape de réglage du FACS a dû être réalisée pour chaque expérience CBA.

Des billes annotées A9, PE-F1, F1, F9 et A1, fournies dans le kit BD CBA Human Soluble Protein Master Buffer Kit, ont été utilisées pour les réglages des voltages FSC-SSC (taille/structure), des fluorochromes (APC, APC-Cy7 et PE) et des compensations automatiques. Ces réglages permettent de paramétrer le cytomètre à flux pour la taille de la population de billes (FSC-SSC) et pour les fluorescences utilisées (**Figure 17**).

200 μ l de wash buffer ont été rajoutés dans chacun des tubes A9, PE-F1, F1, F9 et A1, et 25 μ l de chaque bille setup control ont été rajoutés dans les tubes correspondants.

6/ Expression et analyse des résultats

Les résultats ont été exprimés en pg/ml et déterminés à partir des courbes standard. L'analyse des résultats a été faite à l'aide du logiciel FCAP (FCAP Array; BD Biosciences).

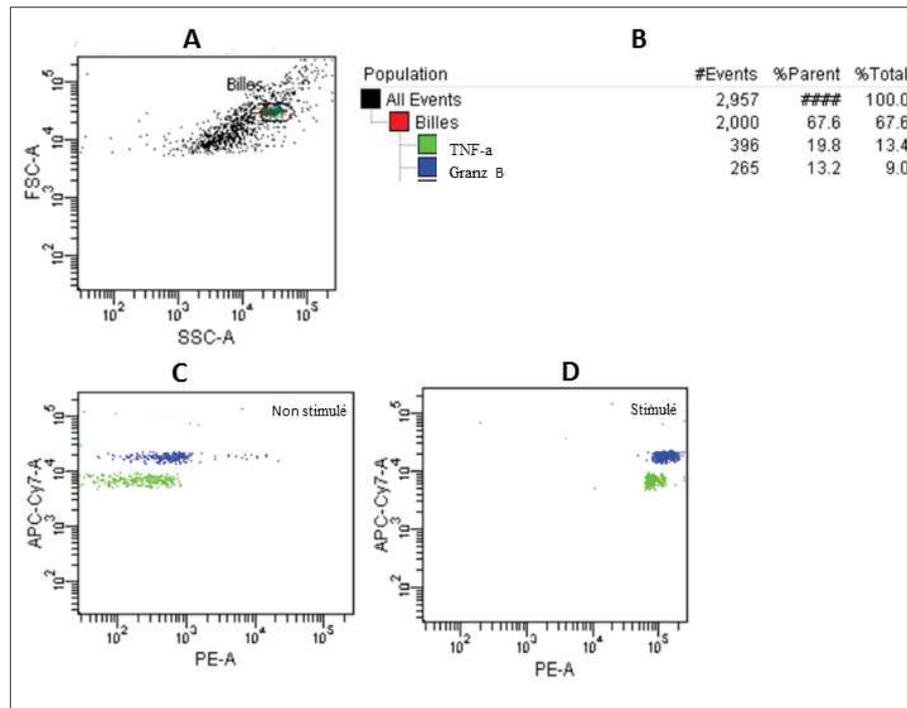


Figure 17. Acquisition des données du test CBA par un cytomètre à flux

A Dot Plot SSC versus FSC utilisé pour localiser la position des billes de cytokine. **B.** Hiérarchie de populations des billes. **C** représentation biparamétrique APC-Cy7/PE des différentes populations de billes analysées : Les nuages de points de haut en bas représentent respectivement le TNF- α et le GrB (cultures non stimulées). **D** Avec une concentration élevée des cytokines, les nuages de points se déplacent vers la droite. L'intensité de la fluorescence PE est corrélée à la concentration de cytokines testées (cultures stimulées par PHA)

II.2.4. ELISPOT (Enzyme-Linked Immunosorbent SPOT assay)

L'ELISPOT a été utilisée pour quantifier les cellules sécrétrices d'IFN- γ

Principe

Le test ELISPOT permet de mesurer la production d'une molécule d'intérêt (IFN- γ dans notre cas), par des cellules T individuelles après stimulation par un Ag, et par suite, permet de quantifier le nombre de cellules T spécifiques de l'Ag dans une population de PBMC.

Les PBMCs sont incubées en présence ou non de l'Ag, dans des plaques pourvues de membranes PVDF (PolyVinylidene Fluoride), coatées avec un anticorps de capture spécifique de la cytokine d'intérêt (IFN- γ). Après une période d'incubation optimale correspondant à l'induction de la quantité maximale de cytokine (24h dans le cas de l'induction de l'IFN- γ par les cellules T), les cellules sont éliminées et les cytokines sécrétées restent fixées aux Ac de capture, dans les puits. Un anticorps de détection marqué (dans notre cas, l'Ac de détection est couplé à la biotine), spécifique de l'IFN- γ , est rajouté. L'addition d'une enzyme couplée à la streptavidine et d'un substrat chromogène est suivie de la

précipitation localisée de ce dernier aboutissant à des tâches ou spots colorés sur la membrane. Les spots ainsi détectés représentent l’empreinte d’une cellule sécrétrice d’IFN- γ . Le nombre de spots détectés qui représente la fréquence des cellules T spécifiques de l’Ag reflète l’ampleur de la réponse immunitaire dirigée contre cet Ag. La taille des spots reflète la quantité de cytokine sécrétée par une cellule T individuelle. Des contrôles négatifs (puits ne contenant pas l’Ag) et des contrôles positifs (PHA et SLA), sont utilisés (**Figure 18**).

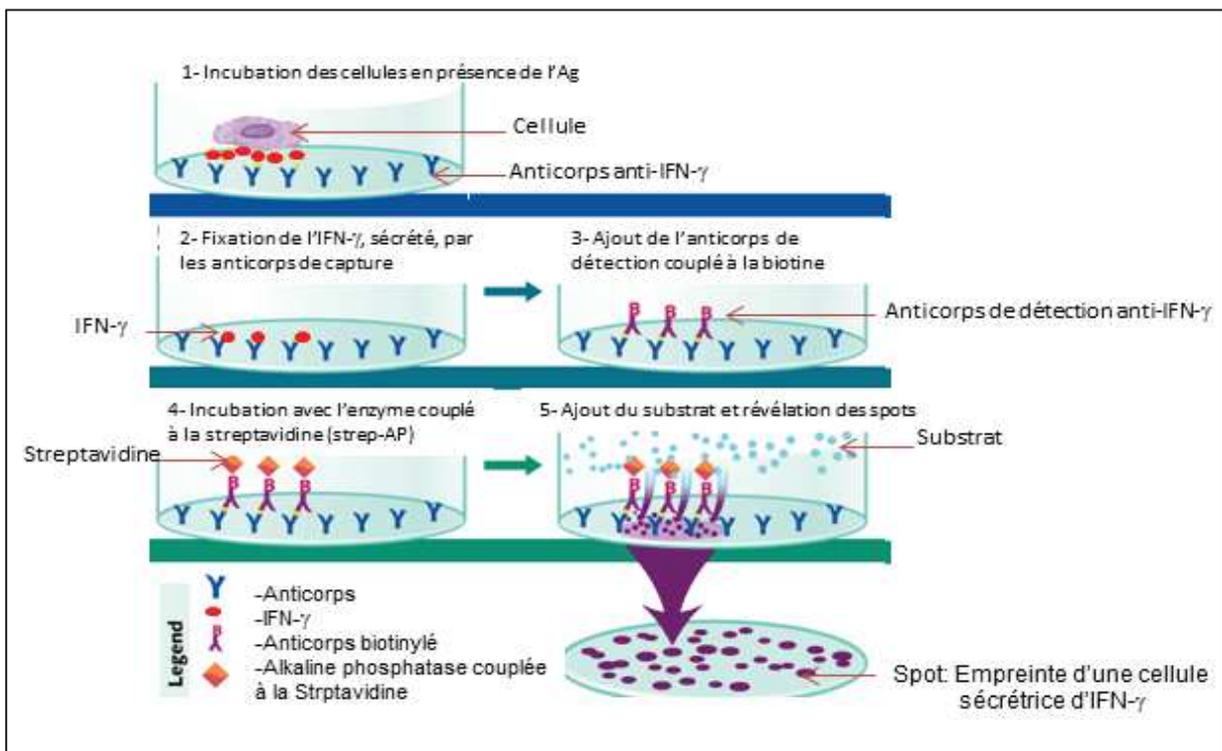


Figure 18. Schéma illustrant le principe de l'ELISPOT

(<https://www.rndsystems.com/products/elispot-assay-principle>)

Méthodologie

Des plaques à membrane PVDF (PolyVinylidene Fluoride) présentant une capacité de liaison élevée aux protéines, ont été utilisées. Ces plaques ont été coatées pendant une nuit à 4°C avec 80 μ L/puits d'une « solution de capture » constituée par l'anticorps de capture anti-IFN- γ (Human IFN- γ Capture Ab) dilué au 1/250^{ème} dans le « diluant A ». Un lavage avec du PBS (150 μ L/puits), a été effectué. Les Ags (PHA, SLA (contrôles positifs utilisés à 10 μ g/ml), pools de peptides (dilués 2X dans le milieu CTL-Test TM, cc finale/peptide 1 μ M) ont été rajoutés à raison de 100 μ L /puits. Les PBMC préalablement sensibilisés par les pools de peptides ont été lavés et rajoutés dans les puits et mis au contact des Ags, à raison de 100 μ L/puits (2.10⁵/puits). Les cellules ont été incubées pendant 24 heures à 37°C, à 5% de

C₀₂ (étape de re-stimulation). Les plaques ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS (200 µl/puits) et deux fois avec une solution de PBS-Tween 0,05% (200 µl/puits). 80 µl/puits d'une solution de détection contenant l'anticorps de détection couplé à la biotine (Anti-human IFN-γ (Biotin) Detection Ab) dilué au 1/250^{ème} dans le « diluant B », ont été rajoutés aux plaques. Après 2h d'incubation à température ambiante, les plaques ont été lavées trois fois avec du PBS-Tween 0.05% (200 µl/puits). La solution tertiaire constituée par l'enzyme phosphatase alcaline couplé à la streptavidine, diluée au 1/1000^{ème} dans le « diluant C », a été rajoutée à raison de 80 µl/puits. Après 30 min d'incubation à température ambiante, les plaques ont été lavées deux fois avec du PBS-Tween 0.05% (200 µl/puits), puis deux fois avec de l'eau distillée (200µl/puits). 80µl/puits de la solution de révélation, constituée par le substrat de l'enzyme (mélange des solutions S1, S2 et S3 diluées dans le diluant bleu), ont été rajoutés aux plaques. Après 15 min d'incubation à température ambiante, la réaction a été arrêtée par un rinçage doux de la membrane à l'eau de robinet. Une étape de décantation suivie de 3 rinçages des plaques a été effectuée. Les plaques ont alors été séchées pendant 24 heures sur la paillasse puis ont été scannées et comptées à l'aide du lecteur Immunospot R S5 Versa Analyser.

Le nombre de cellules productrices d'IFN-γ ont été exprimés en Spots Forming units par 1 million de PBMC (SFU /10⁶PBMC).

II.2.5. Typage HLA des individus CLm

L'ADN requis pour le typage HLA a été extrait à partir du sang périphérique total à l'aide du kit QIAamp DNA Blood Mini (QIAGEN GmbH, Allemagne), en suivant les recommandations du fabricant. Le typage HLA été réalisé par séquençage de nouvelle génération (NGS: Next Generation Sequencing) par la société DKMS (DKMS Life Science Lab, Dresden, Allemagne).

II.2.6. Cytométrie en flux

II.2.6.1. Restimulation des PBMC avec les pools de peptides multi-épitopiques

La cytométrie en flux a été utilisée pour identifier les phénotypes membranaires des populations cellulaires spécifiques des pools peptidiques, après marquage membranaire et pour déterminer les cytokines produites par ces populations cellulaires, après marquage intracellulaire.

Les cellules ont été restimulées par les pools de peptides pour la détection des populations cellulaires spécifiques par cytométrie en flux.

Après 10 jours de stimulation par les pools de peptides, les cellules ont été collectées, lavées avec du RPMI PS/GLU et centrifugées à 250 g pendant 10 minutes. Elles ont été resuspendues à raison de $2 \cdot 10^6$ cellules/ml et redistribuées dans les plaques de culture de 96 puits à fond rond pour être stimulées une seconde fois par les pools de peptides utilisés à une concentration finale de $1 \mu\text{M}$. Les anticorps de costimulation, anti-CD28 et anti-CD49d (BD Biosciences) ($1 \mu\text{M}$ chacun), ont été rajoutés aux cultures. Ces anticorps permettent d'amplifier la costimulation des réponses T spécifiques de l'Ag, sans augmenter l'activation non spécifique (Waldrop *et al.*, 1998).

Les cellules ont été incubées une nuit à 37°C , sous 5% de CO_2 . 6h avant la collecte des cellules, ces dernières ont été traitées avec du GolgiStop (monensine) qui permet d'inhiber le transport intracellulaire des protéines/cytokines aboutissant à leur accumulation à l'intérieur de la cellule.

La PMA (50 ng/ml)/Iono (10^{-6}M) a été rajoutée au cours des dernières 6h (contrôle positif).

Les cellules restimulées ont été collectées par centrifugation pendant 10 min à 250 g pour effectuer le marquage membranaire et intracellulaire.

II.2.6.2. Marquage immunofluorescent des molécules membranaires et intracellulaires des cellules stimulées et analyse par cytométrie en flux

Principe

La Cyométrie en flux est une technique qui permet d'évaluer et de caractériser des cellules en suspension. Le principe réside dans la mesure (métrie) des cellules (cyto) défilant rapidement dans un flux liquide qui est illuminé par une source lumineuse excitatrice (laser). Un cytomètre est composé de (Figure 19):

- **Système fluide** : permettant d'entraîner la suspension cellulaire à l'intérieur d'une chambre d'analyse 'buse' suivant le principe d'hydrofocalisation (les cellules en suspension vont passer à l'intérieur d'une gaine de liquide qui va exercer une compression sur l'échantillon et les cellules vont pouvoir passer, une à une, devant le faisceau lumineux).
- **Système optique** : Constitué d'un laser et d'un ensemble de filtres et de miroirs acheminant la fluorescence sur le détecteur.
- **Système électronique** : Constitué de photomultiplicateurs (PMT) qui convertissent les signaux optiques en signaux électroniques.

- **Système informatique** : Le signal émis par le PMT est envoyé au système informatique qui numérise stocke et traite les données.

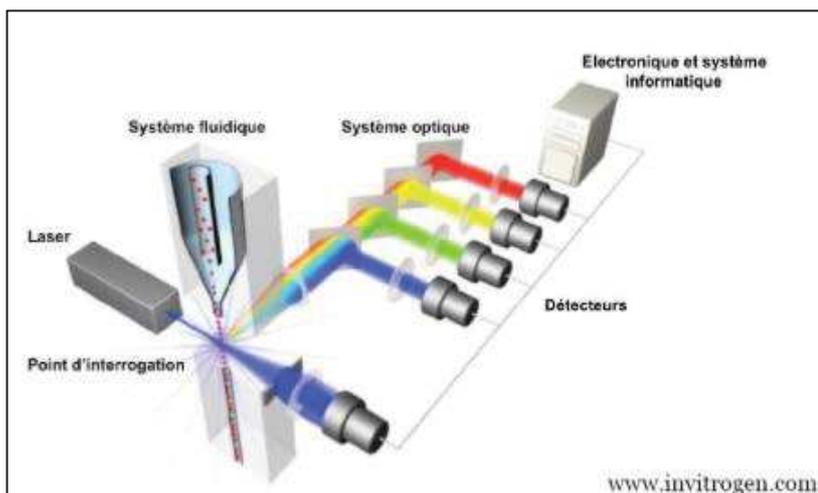


Figure 19. Les différents systèmes et composants d'un cytomètre à flux

Les paramètres analysés par le cytomètre sont (Figure 20):

- Le signal FSC : lumière diffractée proportionnelle à la taille de la cellule
- Le signal SSC : lumière réfléchié proportionnelle à la granulosité de la cellule

Ces 2 paramètres correspondent aux propriétés physiques de la cellule.

- La fluorescence est soit spontanée (auto-fluorescence) soit apportée par un fluorochrome. Le fluorochrome absorbe l'énergie du laser et ré-émet l'énergie absorbée (émission de photons d'une longueur d'onde plus élevée).

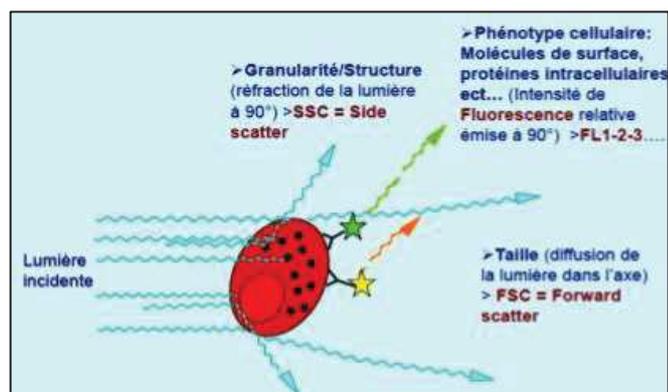


Figure 20. Paramètres mesurés par la cytométrie en flux

Méthodologie

Les cellules restimulées (paragraphe II.6.1) ont été collectées par centrifugation pendant 10 min à 250 g. $2 \cdot 10^5$ et $4 \cdot 10^5$ cellules ont été utilisées, respectivement, pour le marquage membranaire et le marquage intracellulaire. Les cellules ont été resuspendues dans 100 μ l de

tampon de blockage (PBS 10% Sérum AB) et incubées pendant 20 min à 4°C. Un lavage avec 1ml de tampon de marquage (DPBS 2% SVF, 0,09% Sodium Azide, PH 7,4) et une centrifugation à 250 g pendant 10 min, ont par la suite été effectués. Les cellules ont alors été marquées avec des groupes (panel) d'Ac spécifiques de marqueurs membranaires (BD Biosciences), couplés à des fluorophores distincts, utilisés à des volumes adéquats indiqués dans le **tableau 17**, puis incubées pendant 30 min à 4°C. Après 2 lavages avec 1 ml de tampon de marquage, les cellules ont été perméabilisées avec 250 µl d'une solution de fixation/perméabilisation (cytofix/cytoperm BD) et incubées pendant 20 min à 4°C. Après 2 lavages avec du perm/wash (1X), les cellules ont été centrifugées à 300 g pendant 10 min et le marquage intracellulaire a été effectué (la liste des Ac spécifiques des marqueurs intracellulaires (BD Biosciences), utilisés par panel de marquage intracellulaire ainsi que les volumes adéquats, sont indiqués dans le **tableau 17**.

Tableau 17. Panel d'anticorps spécifiques des marqueurs membranaires et intracellulaires utilisés pour la cytométrie en flux

Panel 1		Panel 2		Panel 3	
T CD4+/T CD8+ productrices d'IFN-γ ou de GrB		T CD4+ polyfonctionnelles		T CD4+/T CD8+ mémoires centrales et effectrices	
Ac	V/10 ⁶ cellules	Ac	V/10 ⁶ cellules	Ac	V/10 ⁶ cellules
Anti-CD3 APC-H7	5µL	Anti-CD3-APC-H7	5µL	Anti-CD3 APC-H7	5µL
Anti-CD4 FITC	20µL	Anti-CD4PerCP-Cy5.5	5µL	Anti-CD4 FITC	20µL
Anti-CD8PerCP-Cy5.5	5µL	Anti-IFN- γ Alexa647	5µL	Anti-CD8 PE-cy7	5µL
Anti-IFN- γ Alexa647	5µL	Anti-TNF- α Alexa488	5µL	Anti-CD45RO APC	20µL
Anti- GrB PE	5µL	Anti-IL-2 PE	20µL	Anti-CCR7 PE	20µL

Après 30 min d'incubation à 4°C, les cellules ont été lavées, resuspendues dans 400 µl de tampon de marquage et analysées dans les 24h, à l'aide d'un cytomètre (FACSCanto II). Les données ont été analysées en utilisant le logiciel FlowJo 7.6 (TreeStar, Ashland OR).

La **figure 21** représente un organigramme décrivant les différentes étapes effectuées pour évaluer l'immunogénicité des peptides chez les individus guéris de LCZ.

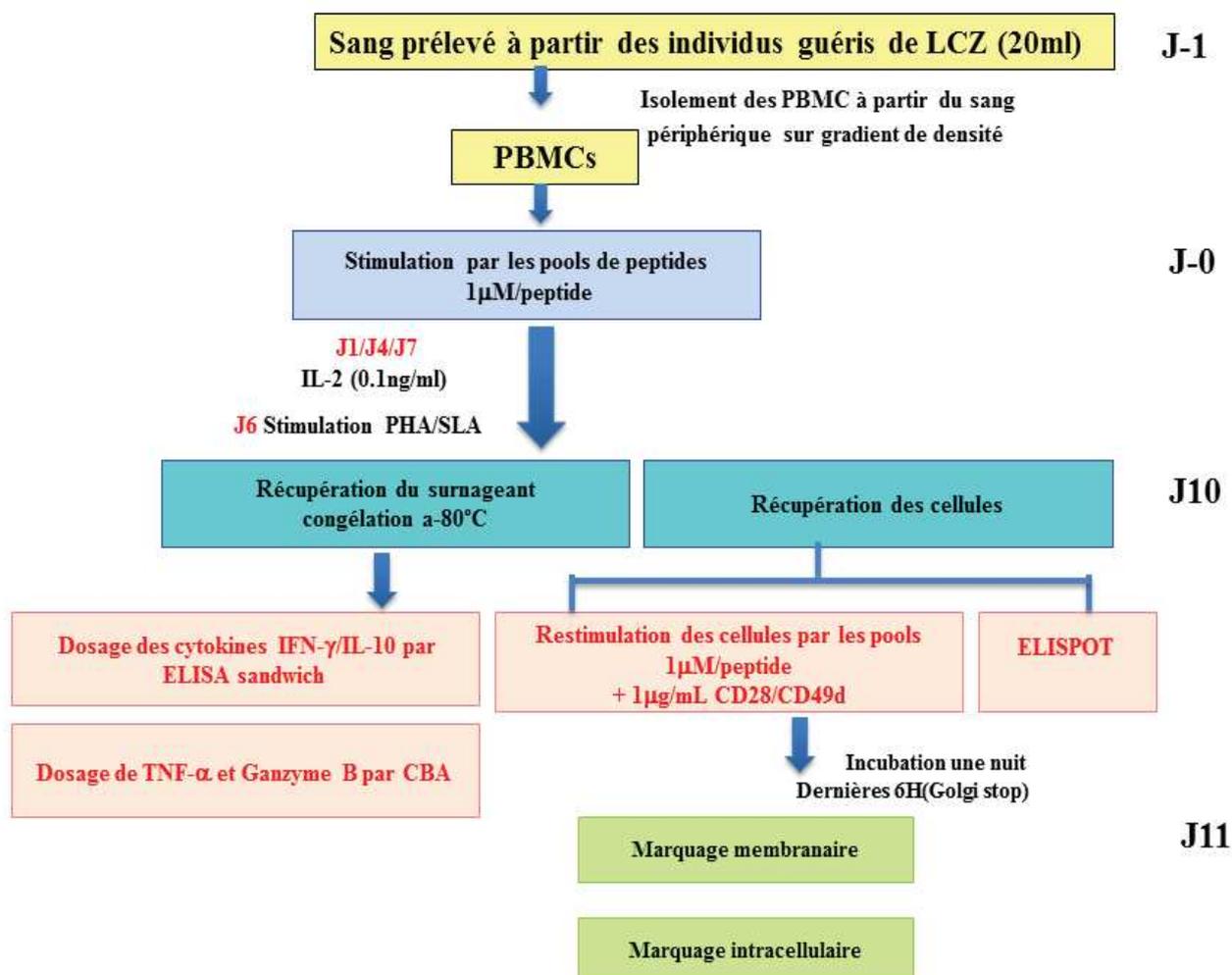


Figure 21. Organigramme des techniques utilisées pour évaluer l'immunogénicité des pools chez les individus guéris de LCZ

II.2.7. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel (GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Les résultats ont été exprimés sous forme de médiane et écart interquartile (IQR : Interquartile range). Des tests non-paramétriques, Wilcoxon et Mann-Whitney, ont été utilisés.

Le test de Wilcoxon a été utilisé pour les analyses en intra-groupe, pour effectuer des comparaisons entre les cultures stimulées et non stimulées.

Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse inter-groupes sur des données normalisées après déduction de la valeur non stimulée.

Les valeurs de p (probabilité) inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives.

Les corrélations ont été estimées à l'aide du coefficient de corrélation de Spearman rank (rs)

II.3. Evaluation de l'immunogénicité des peptides multi-épitopiques chez des individus sains

II.3.1. Coculture des LT CD8+ naïfs avec les CD pulsées avec les peptides multi-épitopiques

- Isolement des LT CD8+ naïves

Principe

L'isolement des LT CD8+ naïfs a été effectué par une sélection positive en utilisant le kit « Naive CD8+ T Cell Isolation Kit ». Cette étape est précédée par une déplétion des cellules NK et des cellules T non naïves (T mémoires, T activés, T effectrices..), lesquelles sont marquées avec un cocktail d'Ac spécifiques des marqueurs CD45RO, CD56, CD57 et CD244, conjugués à la biotine. L'ajout de microbilles magnétiques conjuguées à des Ac dirigés contre la biotine va entraîner la formation d'un complexe : Cellules T non naïves ou NK/Ac biotinylé/Ac anti-biotine/billes magnétiques. Après séparation magnétique (à l'aide d'un dispositif formé par une colonne de séparation et un champ magnétique), le complexe formé est retenu au sein de la colonne tandis que la fraction enrichie en LT CD8+ naïves, lymphocytes B et monocytes passe à travers la colonne. Après élution de cette dernière fraction, un marquage avec des Ac anti-CD8 couplés à des microbilles magnétiques, permet de récupérer les LT CD8+ naïves. Ces dernières sont alors éluées (**Figure 22**).

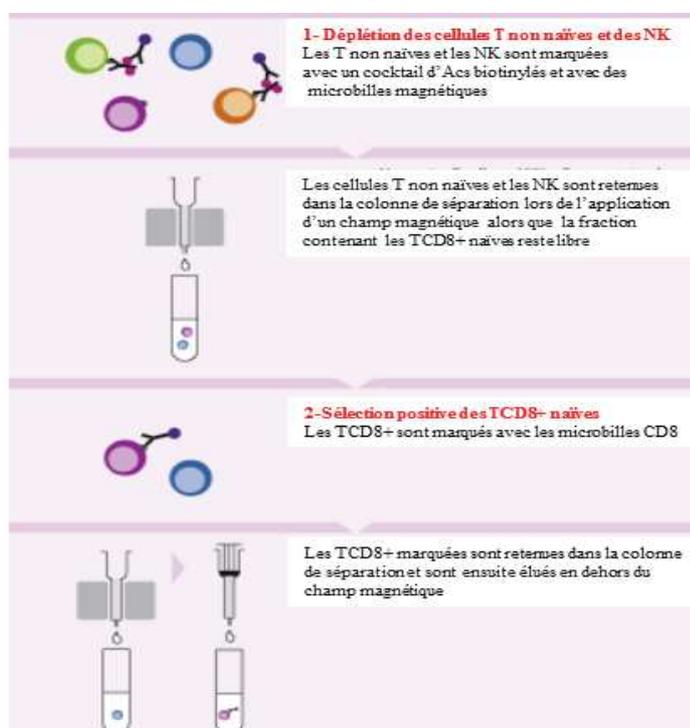


Figure 22. Isolement des LT CD8+ naïfs (Miltenyi)

<https://www.miltenyibiotec.com>

Méthodologie

Les LT CD8⁺ naïves ont été isolés à partir des PBMC de 3 individus adultes sains.

Les PBMC ont été resuspendus dans 40 µl de tampon d'isolement (TI) (PBS PH 7.2, 0.5% BSA et 2mM EDTA) (volume proportionnel au nombre de cellules utilisées). Le protocole décrit ci-dessous a été effectué pour 10⁷ cellules.

10 µl d'un cocktail d'Ac « Naïve CD8⁺ T cell Biotin-Antibody Cocktail » ont été rajoutés aux PBMC. Après une incubation de 5 min à 4°C, 20 µl de billes magnétiques « Anti-Biotin Microbeads » ont été rajoutées avec 30 µl de TI. Les PBMC ont été incubés à 4°C pendant 15 min, lavés avec 1 ml de TI, puis centrifugés à 300 g pendant 10 min et resuspendus dans 500 µl de TI.

Lors de la première séparation magnétique, une colonne LS (Miltenyi) prélavée avec 3ml de TI a été placée sur un dispositif magnétique. La suspension cellulaire, préalablement passée sur un filtre « pre-separation filter Miltenyi », permettant d'éliminer les agrégats cellulaires, a été placée sur la colonne. La fraction éluée contenant les LT CD8⁺ naïves a été récoltée après 2 lavages avec 1ml de TI, centrifugée à 300 g pendant 10 min et le culot a été resuspendu dans 80 µl de TI. 20 µl de « CD8 microbeads » ont été rajoutés et les cellules ont incubées à 4°C pendant 15 min, lavées avec 1ml de TI et centrifugées à 300 g pendant 10 min. Le culot cellulaire a été resuspendu dans 500µl de TI, filtré et transféré sur une colonne MS (Miltenyi), préalablement lavée avec du tampon TI, et soumis à un champ magnétique.

La fraction représentant les cellules non marquées a été éluée après 3 lavages avec 500µl de TI. La fraction riche en LT CD8⁺ naïves a été éluée après détachement de la colonne du support magnétique et lavage avec 1ml de TI.

Les cellules T CD8⁺ naïves ont été resuspendues à raison de 3.10⁶ cellules/ml dans du milieu DC cellgro (CellGenix) additionné de 5% Sérum AB et 250 UI/ml d'IL-7 (Miltenyi) et incubées dans des plaques de 96 puits pendant 4 jours à 37°C.

-Génération et maturation des CD et incubation avec les peptides

Les CD ont été générées soit à partir des cellules adhérentes au plastique, soit à partir des monocytes isolés avec le kit Miltenyi.

- Génération des CD à partir des cellules adhérentes au plastique (monocytes)

Les PBMC ont été resuspendus dans du milieu DC cellgro additionné de 1% Sérum AB à raison de 10⁷cellules/ml. 2ml de cette suspension ont été placés dans les puits d'une plaque de

culture de 6 puits et incubés pendant 2-3h à 37°C sous 5% CO₂, pour permettre l'adhésion des monocytes au plastique. Les cellules ont été ensuite lavées avec du PBS préchauffé à 37°C pour éliminer les cellules non adhérentes en suspension.

Pour la génération des CD, 3ml du milieu de culture DC Cellgro supplémenté de 1% de Sérum AB, 10 ng/ml IL-4 (60 UI/ml BD) et 800UI/ml GM-CSF (BD) ont été rajoutés par puits et les cellules ont été incubées pendant 2 jr à 37°C. 1,5 ml du milieu DC cellgro frais supplémenté de 10 ng/ml d'IL-4 (60 UI/ml) et 1600 UI/ml de GM-CSF ont été rajoutés par puits et les cellules ont été incubées à 37°C pendant 24h supplémentaires. A ce stade, les CD sont immatures.

Pour la maturation des CD, les cellules immatures générées ont été collectées après une resuspension vigoureuse du milieu. Les cellules ont été comptées et resuspendues à une concentration de 10⁶ cellules par ml dans du milieu DC cellgro 1% Sérum AB, additionné de GM-CSF (800 UI/ml), d'IL-4 (10 ng/ml, 60 UI/mL), de LPS (10 ng/ml) et d'IFN- γ (100 UI/ml) (BD) et distribuées à raison de 500 μ l/puits dans des plaques de 48 puits. Les peptides multi-épitopiques ou le mix CEF ont été rajoutés à une concentration de 2,5 μ M par puits et les cultures ont été incubées pendant 16h à 37°C.

Les CD matures pulsées avec les peptides multi-épitopiques ou le mix CEF ont été ensuite récupérées, comptées, lavées et centrifugées à 400 g pendant 10 min et irradiées avec une lampe UV pendant 5 min.

- Génération des CD à partir des monocytes isolés par le Kit « CD14 microbeads Miltenyi »

Principe

L'isolement des cellules CD14⁺ (monocytes) est réalisé par une sélection positive. Les PBMC sont marqués avec des Ac anti-CD14 couplés à des microbilles magnétiques.

Après séparation magnétique (à l'aide d'un dispositif formé par une colonne de séparation et un champ magnétique), le complexe formé (cellules CD14⁺/Ac) est retenu au sein de la colonne puis est élué dans un nouveau tube à l'aide d'un piston après détachement de la colonne du dispositif magnétique.

Méthodologie

Les PBMC ont été resuspendus dans 80 μ l de TI pour 10⁷ cellules (volume proportionnel au nombre de cellules utilisées). Le protocole ci-dessous est décrit pour 10⁷ cellules.

20 μL de « CD14 de microbeads », contenant l'Ac anti-CD14 conjugué aux microbilles magnétiques, ont été rajoutés aux cellules. Après une incubation de 15 min à 4°C, les cellules sont lavées avec 1ml de TI, centrifugées à 300 g pendant 10 min puis resuspendues dans 500 μL de TI. Les cellules sont alors passées sur un filtre « pre-separation filter Miltenyi » et placées sur une colonne MS préalablement lavée avec du tampon TI. La colonne a été détachée du champ magnétique après 3 lavages avec 500 μL de TI et la fraction riche en monocytes a été éluée après lavage avec 1 ml de TI.

Les monocytes isolés ont été resuspendus dans du milieu DC cellgro contenant 1% Sérum AB à raison de 10^6 cellules/ml. 2ml par puits de cette suspension ont été distribués dans des plaques de culture de 6 puits. La génération des CD pulsées avec les peptides multi-épitopiques ou le mix CEF a été réalisée en suivant les mêmes étapes décrites ci-dessus.

-Coculture des LT CD8+ naïves et des CDs matures pulsées avec les peptides

Les CD matures pulsées avec les peptides multi-épitopiques ont été resuspendues dans du milieu Cellgro 5% Sérum AB à raison de $5 \cdot 10^5$ /ml. Les LT CD8+ naïfs ont été resuspendus dans du DC Cellgro 5% Sérum AB à $2 \cdot 10^6$ /ml. Les deux suspensions cellulaires ont été mélangées volume à volume (ratio T CD8+/CD: 4/1).

200 ou 500 μL de ce mélange ont été placés dans des plaques de culture de 96 ou 48 puits, respectivement (en fonction du nombre initial obtenu après l'isolement de T CD8+ naïves et de CD matures générées).

De l'IL-21 recombinante (Miltenyi, 15 UI/ml) a été rajoutée à J0, de l'IL-7 (Miltenyi, 250 UI/ml) et de l'IL-15 (Miltenyi, 40 UI/ml) ont été également rajoutées à J3 et à J5. La concentration de ces cytokines a été doublée à J7 (500 UI/ml pour l'IL-7 et 80 UI/ml pour l'IL-15).

Après 9 jours de cultures, les LT CD8+ ont été récupérées pour évaluer l'immunogénicité des peptides multi-épitopiques par ELISPOT et cytométrie.

Pour les cultures ne présentant pas une prolifération cellulaire (Faible nombre de cellules après stimulation), une deuxième stimulation effectuée avec des PBMC autologues pulsés avec les peptides multi-épitopiques ou le CEF a été réalisée : Les PBMC ont été pulsés avec 2.5 μM de peptides pendant 2h et irradiés avec une lampe UV, afin d'éviter leur prolifération et de ne conserver que leur fonction de CPA. Les cellules T CD8+ ont été collectées, lavées et resuspendues dans le milieu frais DC Cellgro. Les cellules T CD8+ préalablement sensibilisées avec les CD ont été restimulées avec les PBMC irradiés pulsés avec les peptides (ratio LT CD8+/PBMC : 1/4).

De L'IL-2(50 UI/ml), IL-7(250 UI/ml), et IL-15 (40 UI/ml) ont été rajoutées, après 48h de culture, tous les 2 à 3 jrs. Après 7 ou 9 jr de culture supplémentaire, les cellules T CD8+ ont été collectées, et leur profil immunitaire a été évalué par cytométrie ou par ELISPOT.

II.3.2. ELISPOT

Nous avons utilisé un kit Mabtech (Human IFN- γ ELISpot). Les plaques pré-coatées avec l'Ac de capture anti-IFN- γ « Human IFN- γ ELISpot plus Mabtech » ont été lavées 4 fois avec 200 μ l de PBS stérile. Les puits ont été saturés avec 200 μ l de milieu DC cellgro supplémenté de 10% de sérum AB et les plaques ont été incubées pendant 30 min à T ambiante. Les cellules T CD8+ préalablement sensibilisées avec des CD pulsées avec les peptides ont été lavées et stimulées une seconde fois avec des PBMC autologues pulsés avec les peptides (ratio LT CD8+/PBMC : 4/1) dans les plaques ELISPOT et les cellules ont été incubées pendant 20h à 37°C sous 5% CO₂ (étape de restimulation). L'Ac de détection anti-IFN- γ (Mabtech) a été dilué dans du PBS 0.5% SVF (concentration finale : 1 μ g/ml) et 100 μ l ont été rajouté dans les plaques ELISPOT préalablement lavées 5 fois avec 200 μ l de PBS. La plaque ELISPOT a été incubée pendant 2h à T ambiante puis lavée avec 200 μ l de PBS.

100 μ l d'une solution de phosphatase alcaline couplée à la stréptavidine (ALP stréptavidine) diluée 1000 fois dans du PBS 0.5%SVF, ont été rajoutés par puits et la plaque a été incubée pendant une 1 h à température ambiante. Après 5 lavages avec 200 μ l de PBS, la solution substrat (BCIP/NBT) a été rajoutée à raison de 100 μ l par puits et la plaque a été incubée jusqu'à émergence des spots.

Le développement de la réaction a été arrêté par un rinçage abondant à l'eau de robinet et les spots ont été révélés et comptés, après séchage de la plaque, à l'aide d'un lecteur Multispot (AID). Le nombre de LT CD8+ spécifiques produisant l'IFN- γ ont été exprimés en Spots Forming units par 1 million de LT CD8+ (SFU /10⁶ LT CD8+).

II.3.3. Typage HLA

Le typage HLA-I a été effectué par une méthode sérologique en plaque Terasaki (Terasaki HLA Tissue Typing Trays, ONE LAMBDA).

Principe

Les lymphocytes sont incubés dans une plaque Terasaki, dont les puits sont coatés avec des Acs anti-HLA de spécificité connue. Ces Acs ont la capacité de fixer le complément de lapin.

S'il y a reconnaissance entre l'Ac fixé au fond du puits et l'Ag HLA situé à la surface des lymphocytes du donneur, le complexe Ag/Ac formé active le complément de lapin, qui lyse ainsi les cellules. S'il n'y a pas de reconnaissance, le complément n'est pas activé et les lymphocytes ne sont pas lysés. L'addition d'un colorant vital fluoroquenched (mélange d'acridine orange et de bromure d'éthidium) permet de révéler les 2 types de réactions. Les cellules mortes sont marquées d'une fluorescence rouge par le bromure d'éthidium (**Figure 23 A**) alors que les cellules vivantes sont marquées d'une fluorescence verte par l'acridine orange (**Figure 23 B**).

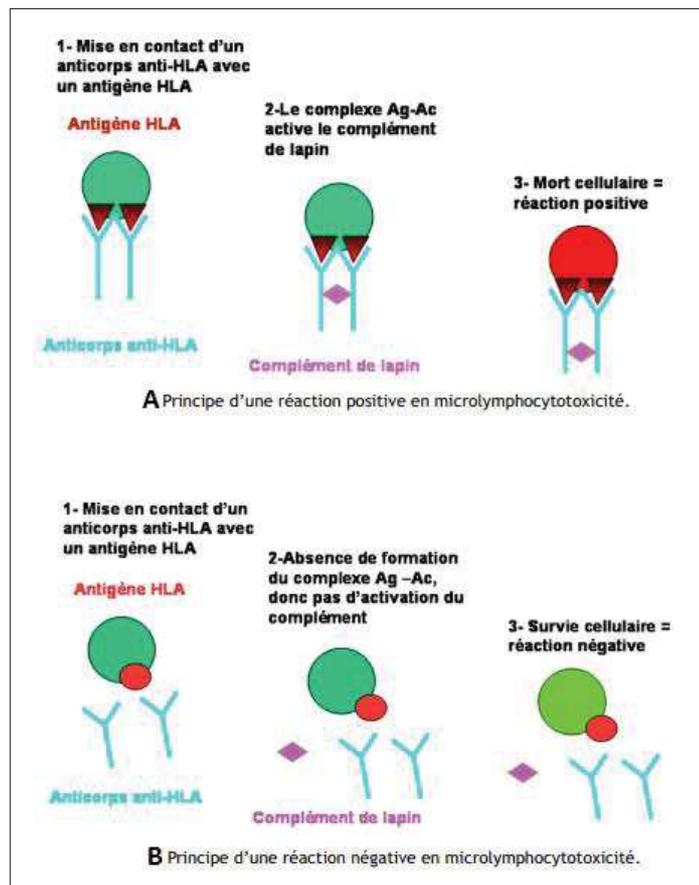


Figure 23. Principe du typage HLA

Méthodologie

Les PBMC ont été resuspendus à 2.10^6 cellules/ml. 1 μ l de cette suspension a été déposé dans chaque puits des plaques Terasaki. Après 30 min d'incubation à T ambiante, le complément de lapin a été rajouté à raison de 5 μ l par puits et les plaques ont été incubées pendant 1h à T ambiante. 5 μ l de FluoroQuench (colorant pour les cellules) ont été rajoutés aux cellules, et ces dernières ont été incubées pendant 15 min à Température ambiante.

La lecture des plaques Terasaki a été effectuée à l'aide d'un lecteur Multispot (AID).

II.3.4. Marquage immunofluorescent des molécules membranaires des cellules et analyse par cytométrie en flux

Les mêmes étapes de phénotypage membranaire ont été réalisées comme décrit ci-dessus pour les individus CLm. Pour le marquage des monocytes et des CD immatures et matures, les cellules ont été marquées avec un volume adéquat de chaque Ac dirigé contre les marqueurs membranaires suivants : Anti-CD14 FITC, Anti-CD86- PE-cy5 et Anti-HLA-DR PE (BD).

Pour le marquage des LT CD8⁺ spécifiques stimulées par les peptides multi-épitopique, et dans le but d'identifier les T CD8⁺ naïves et mémoires: les cellules ont été récoltées à J9 de la coculture et marquées avec un volume adéquat de chaque Ac dirigé contre les marqueurs membranaires suivants : Anti-CD3 FITC (20 µl) (BD), anti-CD8 APC-cy7, Anti-CCR7 APC (10 µl) (Miltenyi), Anti-CD62L PE-vio770 (10 µl) (Miltenyi), Anti-CD45RO PerCP-vio700 (10 µL) (Miltenyi). Les cellules ont été incubées à 4°C, pendant 10 min (Ac miltenyi) ou 30 min (Ac BD). Après 2 lavages avec 1 ml de tampon de marquage, les cellules ont été fixées avec un tampon de fixation (BD Stabilizing Fixative buffer 1X) et analysées à l'aide d'un cytomètre de flux FACSCanto (BD).

La **figure 24** résume les démarches effectuées pour évaluer l'immunogénicité des peptides chez les individus naïfs N-Fr.

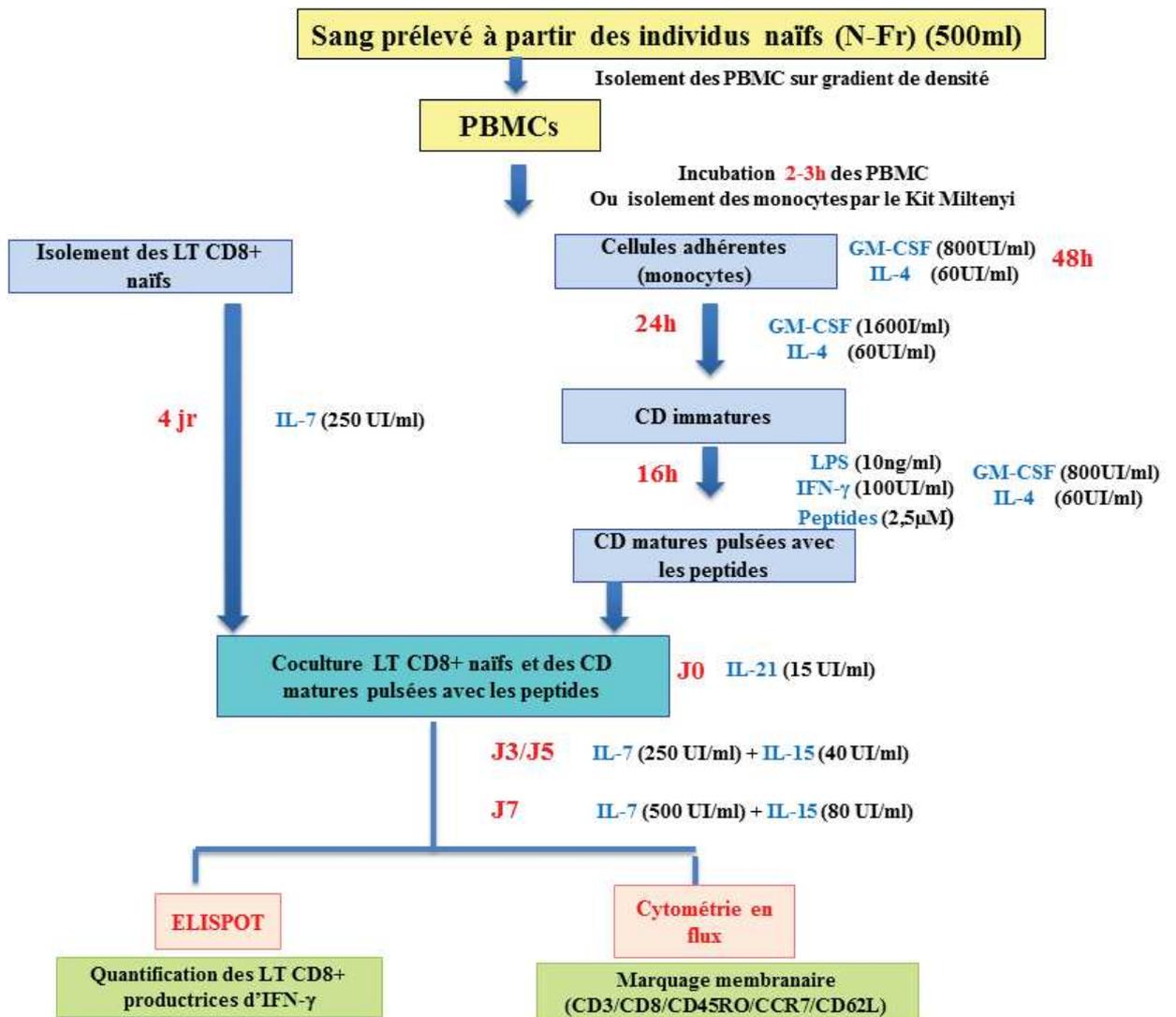


Figure 24. Organigramme des techniques utilisées pour évaluer l'immunogénicité des peptides chez les individus naïfs N-Fr

Résultats

I. Constitution des pools de peptides multi-épitopiques utilisés dans les tests de stimulation cellulaire

Les peptides multi-épitopiques qui ont été décrits dans la partie Méthodes, ont été utilisés sous forme de pools peptidiques pour stimuler les PBMC issus des individus guéris de LCZ. La constitution des pools peptidiques a été réalisée de la manière suivante: pools constitués de (i) peptides multi-épitopiques affins aux molécules HLA-I, (ii) peptides multi-épitopiques affins aux HLA-II et (iii) peptides multi-épitopiques affins à la fois aux HLA-I et HLA-II (Tableau 18).

Tableau 18. Composition des pools de peptides multi-épitopiques

Protéine	H2B		PSA					RABGTPase				
Peptides	H2B I	H2B II	PSA I.3	PSA I.4	PSA I.5	PSA II.6	PSA II.7	RAB I.1	RAB I.2	RAB I.3	RAB II.4	RAB II.5
Pools composés par des peptides affins aux HLA-I												
P1			x	x	x							
RI ^R								x	x	x		
P1	x		x	x	x							
P2 ^R	x							x	x	x		
P3 ^R			x	x	x			x	x	x		
P4 ^R	x		x	x	x			x	x	x		
Pools composés par des peptides affins aux HLA-II												
P11						x	x					
R11											x	x
P5		x				x	x					
P6		x									x	x
P7						x	x				x	x
P8		x				x	x				x	x
Pools composés par des peptides affins aux HLA-I et HLA-II												
P9	x	x										
P10			x	x	x	x	x					
P11 ^R								x	x	x	x	x
P14 ^R	x					x	x	x	x	x		
P15		x		x	x						x	x
P16	x	x	x	x	x	x	x					
P17 ^R	x	x						x	x	x	x	x
P18	x			x	x						x	x
P19 ^R		x				x	x	x	x	x		
P20 ^R			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
P21 ^R	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Il est à noter que nous avons été obligés d'éliminer un peptide LmlRAB (peptide **RAB I.1**), puisque ce peptide a montré une certaine toxicité vis à vis des cellules dendritiques, lors de certaines expériences de cultures cellulaires menées dans le laboratoire UMR 177 INTERTRYP à l'IRD de Montpellier.

Il est aussi à noter aussi que les résultats ayant montré la toxicité du peptide RABI.1 ont été obtenus après que nous ayons effectué les expériences préliminaires et d'optimisation décrites ci-dessous, ce qui explique la présence de ce peptide dans les pools analysés.

Par souci de clarté, les pools contenant le peptide RABI.1, ont été notés P^R (**Tableau 18**), pour les distinguer des pools correspondants, dans lesquels ce peptide a été éliminé et qui ont été utilisés dans les expériences post-optimisation.

II. Evaluation de l'immunogénicité des peptides multi-épitopiques chez des individus guéris d'une LCZ due à *L. major*

L'ensemble des travaux sur l'évaluation de l'immunogénicité des peptides multi-épitopiques chez des individus guéris de LCZ, ont été effectués dans le laboratoire de Parasitologie Médicale, Biotechnologies et Biomolécules (IPT), sous la direction du Pr. A. Garnaoui.

Les individus guéris de LC ont développé une réponse mémoire spécifique des Ags parasitaires leur permettant très probablement de résister à une seconde infection. Ils constituent, de ce fait, un groupe d'intérêt pour l'évaluation de l'immunogénicité de candidats vaccins potentiels. Ces individus ont été sélectionnés dans des zones où la LCZ due à *L. major* est endémique.

Dans un premier temps, les taux d'IFN- γ et d'IL-10, cytokines associée, respectivement à la protection et à la susceptibilité à l'infection, ont été évalués, par ELISA, après stimulation des PBMC d'individus guéris de LCZ, par les pools de peptides multi-épitopiques.

Des expériences d'optimisation du protocole de stimulation des PBMC ont été nécessaires pour déterminer les concentrations optimales des peptides et celles de l'IL-2 recombinante.

Dans un second temps, et dans le but de caractériser de manière approfondie la réponse immunitaire induite par les peptides, nous avons sélectionné les pools de peptides induisant les taux les plus élevés d'IFN- γ , de manière spécifique, chez les individus guéris. Nous avons quantifié par CBA, d'autres cytokines jouant un rôle important au cours de l'infection par *Leishmania*, à savoir, le TNF- α et le GrB, induites par les pools peptidiques. Nous avons également évalué la fréquence des LT spécifiques, produisant de l'IFN- γ , par ELISPOT. Le phénotype ainsi que les pourcentages des LT activés après la stimulation par les pools sélectionnés ont été déterminés par cytométrie en flux. Nous avons effectué un marquage cellulaire afin de détecter les cellules T CD4⁺ ou T CD8⁺ productrices d'IFN- γ , de cellules T CD4⁺ productrices de GrB ou polyfonctionnelles (sécrétrices d'IFN- γ , d'IL-2 et de TNF- α). Le pourcentage des T mémoires a été également évalué.

II.1. Analyse de la réponse cytokinique (IFN- γ et IL-10) induite par les peptides multi-épitopiques, chez les individus guéris d'une LCZ, par ELISA

II.1.1. Analyse de la réponse IFN- γ

II.1.1.1. Expériences préliminaires et optimisation du protocole d'induction d'IFN- γ , en réponse à la stimulation par les peptides

Dans le but de caractériser la réponse cytokinique (IFN- γ) induite par les peptides multi-épitopique, nous avons mené une première série d'expériences chez des individus guéris de LCZ et chez des individus naïfs, utilisés comme groupe contrôle (**Tableau 19, Figure 25**). Il est à noter que le nombre de cellules pour certains individus a été un facteur limitant, ce qui explique la variabilité dans les nombres d'individus testés par condition de stimulation.

Par souci de clarté, il est à noter, que les groupes de peptides de classe I et de classe II/protéine ont été nommés comme suit: PI (PSAI.3, PSAI.4, PSAI.5), PII (PSAII.6 et PSAII.7), RI (RABI.2 et RABI.3), RII (RABII.4 et RABII.5). L'appellation H2BI et H2BII a été maintenue (pour ces 2 derniers peptides, il s'agit de peptides individuels et non pas de pools de peptides).

Les PBMC ont été stimulés par la PHA (contrôle positif pour l'ensemble des individus), le SLA (contrôle positif pour les individus guéris), les pools peptidiques (P1 à P21^R, PI, PII, RI^R, RII), et les peptides H2BI et H2BII.

Selon un protocole de culture décrit par Seyed et collaborateurs (**Seyed et al., 2011**), les cultures ont été incubées pendant 10 jours et de l'IL-2 recombinante a été rajoutée à une concentration finale de 10 ng/ml à J1, J4 et J7. Les peptides ont été utilisés à une concentration optimale de 1 μ M (concentration déterminée au cours d'expériences effectuées dans le cadre du mastère de Y. Messaoudi « Conception de peptides multi-épitopiques à partir de protéines de *Leishmania* et analyse préliminaire de leur immunogénicité chez l'homme », utilisant différentes concentrations peptidiques (1 et 2 μ M), chez des individus immuns).

Les taux d'IFN- γ , ont été déterminés par ELISA.

Les résultats ont été exprimés en médiane \pm écart Interquartile (IQR) et le seuil de significativité a été fixé à une valeur de p (probabilité) inférieure à 0,05.

Des taux élevés et significatifs d'IFN- γ (comparaison entre cultures stimulées et cultures non stimulées, NS) ont été observés après stimulation par la PHA chez tous les individus et après stimulation par le SLA, seulement chez les individus guéris de LCZ (**Tableau 19, Figure 25**).

Des taux significativement élevés d'IFN- γ ont été induits non seulement chez les individus guéris, mais aussi chez les individus naïfs, après stimulation par les pools P5, P9, P14^R, P15^R, P16, P17^R, P18, P19^R, P20^R et P21^R (comparaison entre cultures stimulées et cultures NS, $p < 0.05$) (**Tableau 19**).

De l'IFN- γ a été aussi observé à des taux significativement élevés chez les individus naïfs, après stimulation par les pools P2^R, P4^R, P8, P10 et par le peptide H2BII (**Tableau 19**).

Nous avons comparé les taux d'IFN- γ observés en réponse aux pools P5, P9, P14^R, P15^R, P16, P17^R, P18, P19^R, P20^R et P21^R, entre les groupes d'individus guéris et naïfs. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes (**Tableau 19, Figure 25**).

Par ailleurs, nous avons aussi noté des taux importants d'IFN- γ dans les cultures de PBMC NS (contrôles négatifs des cultures stimulées avec les peptides: culture des PBMC pendant 10 jours, en présence d'IL-2), chez les deux groupes d'individus (**Tableau 19**).

Tableau 19. Taux d'IFN- γ induits, chez des individus guéris et naïfs, après stimulation par des peptides H2BI et H2BII, au cours des expériences préliminaires

Stimuli	Composition des pools de peptides	Médiane IFN- γ (pg/mL)						
		Guéris				Naïfs		
		Nombre d'individus	Médiane NS \pm IQR	Médiane Stimulé \pm IQR	Valeur de p	Nombre d'individus	Médiane NS \pm IQR	Médiane Stimulé \pm IQR
PHA	-	21	42,72 \pm 177,505	1949 \pm 1617	<0,0001	16	9,05 \pm 21,49	230,5 \pm 111,9
SLA	-	21	42,72 \pm 177,505	1777 \pm 1659	<0,0001	16	9,05 \pm 21,49	600,5 \pm 111,9
H2BI	H2BI	11	113,5 \pm 765,9	731 \pm 1757,42	ns	15	542 \pm 1103	960,5 \pm 111,9
PI	PI	6	103,5 \pm 429,22	77,25 \pm 346,9	ns	5	435 \pm 284,6	200,5 \pm 111,9
RI^R	RI	5	93,5 \pm 626,8	160,5 \pm 704,675	ns	5	325 \pm 361,1	280,5 \pm 111,9
P1	H2BI/PI	12	319,6 \pm 1051,37	922,9 \pm 1752,44	ns	16	527,3 \pm 1119,7	666,5 \pm 111,9
P2^R	H2BI/RI	9	787,9 \pm 1144,4	1250 \pm 1908,25	ns	14	575,2 \pm 1288,5	1480,5 \pm 111,9
P3^R	PI/RI	7	113,5 \pm 1149	202,1 \pm 635,5	ns	5	172 \pm 381,53	320,5 \pm 111,9
P4^R	H2BI/PI/RI	9	787,9 \pm 1144,4	1325 \pm 1994,2	ns	14	560,6 \pm 1288,5	1290,5 \pm 111,9
H2BII	H2BII	10	158,3 \pm 854,95	629,9 \pm 769	ns	16	527,3 \pm 1119,7	860,5 \pm 111,9
P11	P11	7	93,5 \pm 181	0 \pm 163,4	ns	6	248,5 \pm 384,92	130,5 \pm 111,9
R11	R11	7	93,5 \pm 181,96	1,27 \pm 184	ns	6	380 \pm 321,5	408,5 \pm 111,9
P5	H2BII/P11	13	245,6 \pm 962,75	821 \pm 1842,6	0,08	16	527,3 \pm 1119,7	1090,5 \pm 111,9
P6	H2BII/R11	9	113,5 \pm 1003,48	295,7 \pm 970,8	ns	6	248,5 \pm 399,12	560,5 \pm 111,9
P7	P11/R11	8	103,5 \pm 688,72	75,07 \pm 132,15	ns	5	172 \pm 381,53	270,5 \pm 111,9
P8	H2BII/P11/R11	12	319,6 \pm 999,5	999,3 \pm 1305,2	ns	15	542 \pm 1256	1130,5 \pm 111,9
P9	H2BI/H2BII	12	224,3 \pm 809,57	1049 \pm 1397,3	0,03	14	575,2 \pm 1091,3	1400,5 \pm 111,9
P10	PI/P11	19	175 \pm 756,9	568,1 \pm 1223	ns	16	527,3 \pm 1119,7	1140,5 \pm 111,9
P11^R	RI/R11	15	132 \pm 641	169,5 \pm 695	ns	7	325 \pm 352,2	370,5 \pm 111,9
P14^R	H2BI/PI/RI	18	189 \pm 769,95	1078 \pm 1540,8	0,01	16	527,3 \pm 1119,7	1510,5 \pm 111,9
P15	H2BII/PI/R11	20	189 \pm 724,65	640,9 \pm 899,4	0,04	15	542 \pm 1256	923,5 \pm 111,9
P16	H2BI/H2BII/PI/P11	19	175 \pm 756,9	1480 \pm 1507,7	0,001	16	527,3 \pm 1119,7	1260,5 \pm 111,9
P17^R	H2BI/H2BII/ RI/R11	16	210,3 \pm 799,82	1107 \pm 937	0,02	14	560,6 \pm 1288,5	1420,5 \pm 111,9
P18	H2BI/PI/R11	17	175 \pm 795,9	826,5 \pm 1536,5	0,04	16	527,3 \pm 1119,7	770,5 \pm 111,9
P19^R	H2BII/PI/RI	18	153,5 \pm 781,2	903 \pm 1187,7	0,01	15	542 \pm 1103	942,5 \pm 111,9
P20^R	PI/P11 /RI/R11	17	175 \pm 692,4	801 \pm 1994,3	0,01	15	542 \pm 1103	1940,5 \pm 111,9
P21^R	H2BI/H2BII/PI/P11/ RI/R11	18	153,5 \pm 781,2	1370 \pm 1369,6	0,0079	14	575,2 \pm 1073,7	1740,5 \pm 111,9

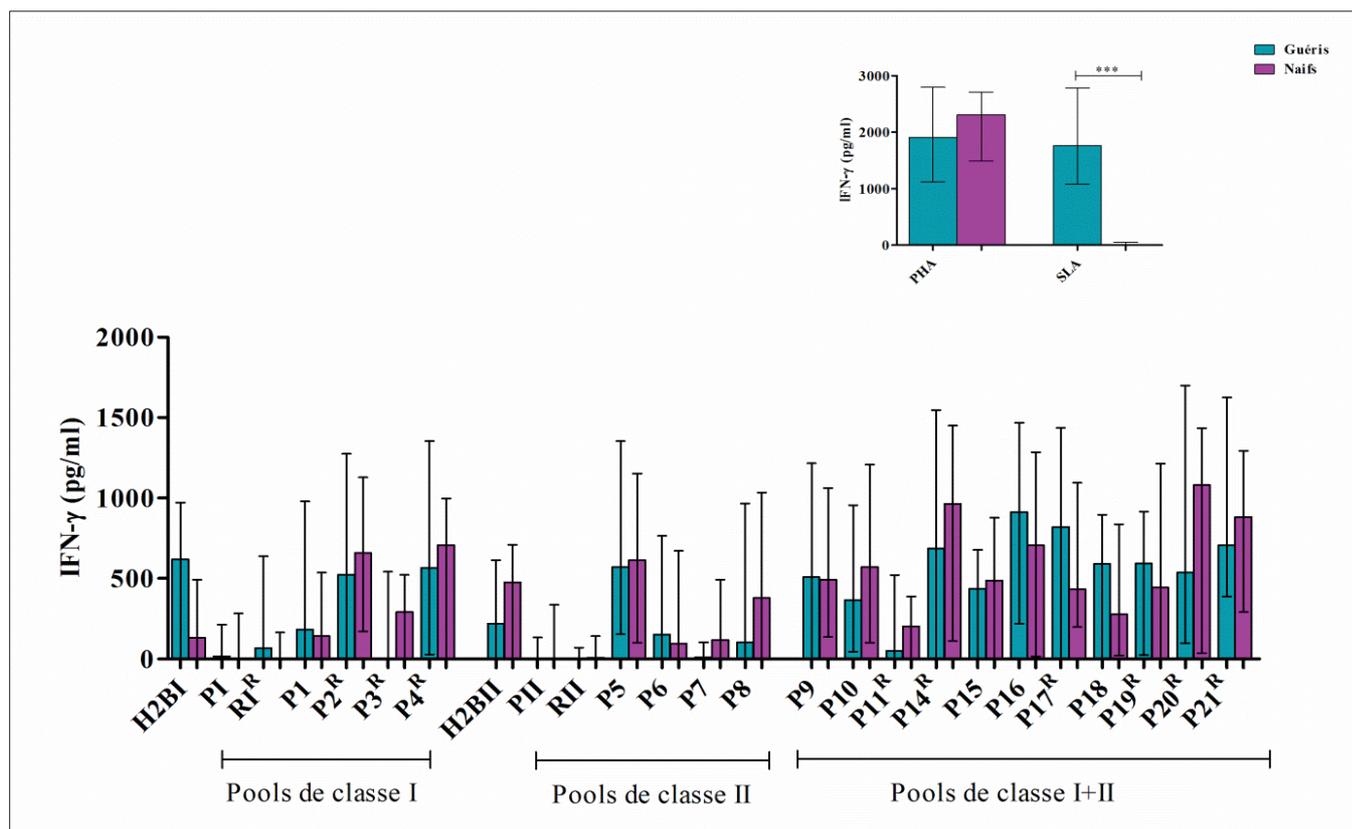


Figure 25. Taux d'IFN- γ induits, en réponse à une stimulation par les pools de peptides chez les individus guéris et naïfs, au cours des expériences préliminaires

L'IFN- γ a été quantifié par ELISA dans les surnageants de culture de PBMC d'individus guéris de LCZ ($n = 21$) ou naïfs ($n = 16$) stimulés par les pools de peptides ou les peptides H2BI et H2BII pendant 10 jours. Les peptides (individuels ou en pools) ont été utilisés à une concentration finale de $1 \mu\text{M}$. Les résultats sont exprimés en pg/ml. Les résultats sont exprimés en médiane d'IFN- γ (pg/ml) après déduction des valeurs des NS.

Suite à ces taux d'IFN- γ élevés dans les cultures NS, pouvant être dues à une concentration d'IL-2 trop élevée dans notre protocole de culture, nous avons effectué des expériences d'optimisation de la concentration d'IL-2.

Différentes concentrations d'IL-2 allant de $0,01\text{ng/ml}$ à 5ng/ml ont été évaluées, dans un protocole de culture de 10 jours, chez 5 individus guéris de LCZ ainsi que 3 individus naïfs (**Tableau 20 et Figure 26**). Les pools de peptides P16 et P17^R ($1\mu\text{M/peptide}$) ont été sélectionnés pour stimuler les PBMC, puisque ce sont ceux qui avaient induit les taux d'IFN- γ les plus élevés chez les individus guéris, en même temps que des taux plus faibles chez les naïfs (**Figure 25**). Le P21 (pool contenant l'ensemble des peptides) a été également sélectionné pour cette expérience d'optimisation.

Comme le montrent le **tableau 20** et la **figure 26**, des taux d'IFN- γ significativement élevés, ont été observés chez les individus guéris, mais pas chez les naïfs, pour les concentrations les plus basses en IL-2 (0,1 ; 0,05 et 0,01 ng/ml), en réponse aux pools P16 et P21^R.

Nous avons noté des taux importants d'IFN- γ dans les cultures NS (contrôles négatifs des pools de peptides), pour les concentrations les plus élevées en IL-2 (5, 2,5 et 1 ng/ml) (**Tableau 20 et Figure 26**).

Nous avons donc choisi la concentration de 0,1 ng/ml en IL-2, montrant les meilleurs résultats en termes de spécificité et d'intensité de réponse IFN- γ , pour évaluer l'immunogénicité des peptides et des pools peptidiques.

Tableau 20. Taux d'IFN- γ détectés chez des individus guéris et naïfs, après stimulation par les pools P16, P17^R et P21^R, en présence de différentes concentrations d'IL-2

Concentrations d'IL-2	Stimuli	Composition pools	Médiane IFN- γ (pg/mL) \pm IQR			
			Guéris (n=5)	Valeur de p	Naïfs (n=3)	Valeur de p
-	NS (contrôles positifs)	-	0 \pm 15,81	-	0 \pm 2,885	-
	PHA	-	1105 \pm 106	0,0112	933,7 \pm 295,7	ns
	SLA	-	1090 \pm 78	0,0112	42,05 \pm 65,45	ns
5ng/ml	NS	-	819,1 \pm 639,2	-	173,1 \pm 1144	-
	P16	H2BI/H2BII/PI/PII	901,5 \pm 245	ns	961,9 \pm 222,1	ns
	P17 ^R	H2BI/H2BII/RI/RII	975,8 \pm 382,6	ns	872,4 \pm 170,2	ns
	P21 ^R	H2BI/H2BII/PI/PII/RI/RII	913,1 \pm 299,1	ns	871,5 \pm 342,3	ns
2,5ng/ml	NS	-	676,6 \pm 668,5	-	320,4 \pm 995,5	-
	P16	H2BI/H2BII/PI/PII	1029 \pm 203,1	ns	870,2 \pm 105,4	ns
	P17 ^R	H2BI/H2BII/RI/RII	429,5 \pm 530,3	ns	809,8 \pm 377,9	ns
	P21 ^R	H2BI/H2BII/PI/PII/RI/RII	943,7 \pm 296,3	ns	651,8 \pm 639,8	ns
1ng/ml	NS	-	472,7 \pm 593,3	-	41,19 \pm 715,7	-
	P16	H2BI/H2BII/PI/PII	893,5 \pm 487,3	ns	911,1 \pm 302,5	ns
	P17 ^R	H2BI/H2BII/RI/RII	837,7 \pm 568,9	ns	575,7 \pm 85,8	ns
	P21 ^R	H2BI/H2BII/PI/PII/RI/RII	1031 \pm 587,7	ns	484,1 \pm 424	ns
0,1ng/ml	NS	-	8,797 \pm 26,013	-	5,167 \pm 83,31	-
	P16	H2BI/H2BII/PI/PII	667,7 \pm 543,1	0,0079	60,73 \pm 237,19	ns
	P17 ^R	H2BI/H2BII/RI/RII	44,64 \pm 261,2	ns	32,55 \pm 31,901	ns
	P21 ^R	H2BI/H2BII/PI/PII/RI/RII	380,4 \pm 816,2	0,0079	2,585 \pm 182,3	ns
0,05ng/ml	NS	-	10,02 \pm 128,051	-	1,447 \pm 8,674	-
	P16	H2BI/H2BII/PI/PII	361,8 \pm 613,3	0,0079	138,5 \pm 92,83	ns
	P17 ^R	H2BI/H2BII/RI/RII	39,92 \pm 232,12	ns	9,049 \pm 22,37	ns
	P21 ^R	H2BI/H2BII/PI/PII/RI/RII	161,6 \pm 663,27	ns	28,33 \pm 135,2575	ns
0,01ng/ml	NS	-	0 \pm 0,7197	-	0,1425 \pm 2,253	-
	P16	H2BI/H2BII/PI/PII	335 \pm 630,59	0,0079	17,16 \pm 32,81	ns
	P17 ^R	H2BI/H2BII/RI/RII	13,44 \pm 166,1	ns	0 \pm 0	ns
	P21 ^R	H2BI/H2BII/PI/PII/RI/RII	99,41 \pm 554,53	0,0079	0,8662 \pm 8,111	ns

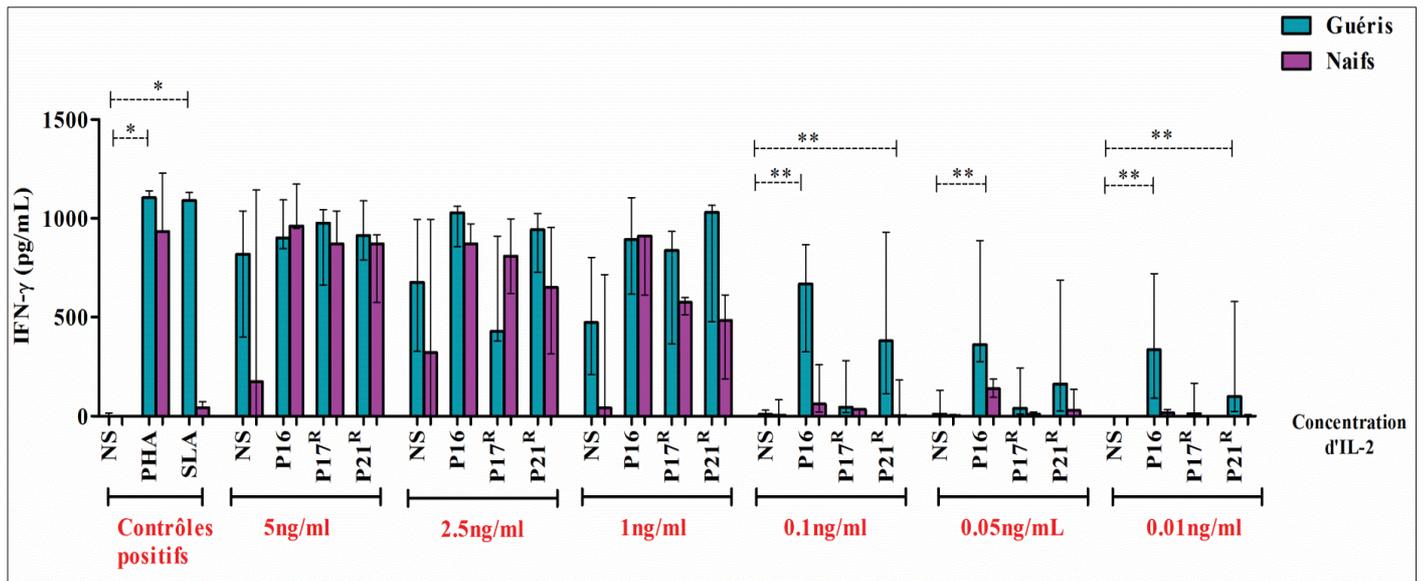


Figure 26. Taux d'IFN- γ induits, chez des individus guéris et naïfs, après stimulation par P16, P17^R et P21^R, en présence de différentes concentrations d'IL-2

Les différences significatives entre les cultures NS et stimulées sont indiquées par des astérisques (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) (test Mann-whitney)

II.1.1.2. Quantification des taux d'IFN- γ , en réponse à la stimulation par les pools de peptides, chez les individus guéris de LCZ

Il est à noter que, dans les résultats décrits ci-dessous, le peptide RABI.1 a été éliminé des pools peptidiques, en raison de sa toxicité.

Nous avons évalué la production d'IFN- γ en réponse à la stimulation par 11 peptides multi-épitopiques (H2BI, H2BII, PSAI.3, PSAI.4, PSAI.5, PSAII.6, PSAII.7, RABI.2, RABI.3, RABII.4, RABII.5) ainsi que par 25 pools de peptides multi-épitopiques, répartis comme suit : pools regroupant des peptides multi-épitopiques de classe I provenant d'une même protéine (PI, RI) ou de protéines différentes (P1, P2, P3, P4), pools regroupant des peptides multi-épitopiques de classe II provenant d'une même protéine (PII, RII) ou de protéines différentes (P5, P6, P7 et P8), pools regroupant des peptides multi-épitopiques de classe I et de classe II, issus d'une même protéine (P9, P10 et P11), pools regroupant des peptides multi-épitopiques de classe I et de classe II, issus de protéines différentes (P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20 et P21) chez des individus guéris de LCZ et des individus naïfs. La liste des pools avec les combinaisons peptidiques utilisées pour les expériences ci-dessous figure dans le **tableau 21**.

Tableau 21. Composition des pools de peptides multi-épitopiques après élimination du peptide RAB1.1

Protéine	H2B		PSA				RABGTPase				
Peptides	H2B I	H2B II	PSA I.3	PSA I.4	PSA I.5	PSA II.6	PSA II.7	RAB I.2	RAB I.3	RAB II.4	RAB II.5
Pools composés par des peptides affins aux HLA-I											
PI			x	x	x						
RI								x	X		
P1	x		x	x	x						
P2	x							x	x		
P3			x	x	x			x	x		
P4	x		x	x	x			x	x		
Pools composés par des peptides affins aux HLA-II											
P11						x	x				
R11										x	x
P5		x				x	x				
P6		x								x	x
P7						x	x			x	x
P8		x				x	x			x	x
Pools composés par des peptides affins aux HLA-I et HLA-II											
P9	x	x									
P10			x	x	x	x	x				
P11								x	x	x	x
P12	x					x	x				
P13	x	x				x	x				
P14	x					x	x	x	x		
P15		x		x	x					x	x
P16	x	x	x	x	x	x	x				
P17	x	x						x	x	x	x
P18	x			x	x					x	x
P19		x				x	x	x	x		
P20			x	x	x	x	x	x	x	x	x
P21	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Nous avons réalisé des comparaisons intra-groupe (NS versus stimulé), ainsi que des comparaisons intergroupes (guéris versus naïfs). Pour les comparaisons intergroupes, les valeurs des cultures NS ont été retranchées de celles des cultures stimulées.

a. Résultats observés chez les individus guéris de LCZ et chez les naïfs (analyse intra-groupe)

Nous avons commencé par analyser les réponses IFN- γ vis à vis des 11 peptides multi-épitopiques, chez 10 individus guéris de LCZ (**Figure 27, Tableau 22**).

Des taux élevés et significatifs d'IFN- γ ont été observés en réponse à la stimulation par la PHA et au SLA, chez tous les individus guéris (**Figure 27 A et B**). Des taux d'IFN- γ globalement faibles et non significatifs ont été observés, chez les individus guéris, en réponse à la stimulation par les peptides.

Nous avons, cependant, noté des taux légèrement plus élevés d'IFN- γ , en réponse aux peptides H2BI et H2BII, en comparaison avec les autres peptides (**Figure 27 A**). Une réponse

IFN- γ spécifique et significative a été détectée pour ces deux peptides, lorsqu'ils ont été analysés chez un plus grand nombre d'individus guéris (n=40), tandis qu'aucune réponse significative n'a été détectée chez les individus naïfs (n=12) (**Tableau 20 et Figure 27 B**).

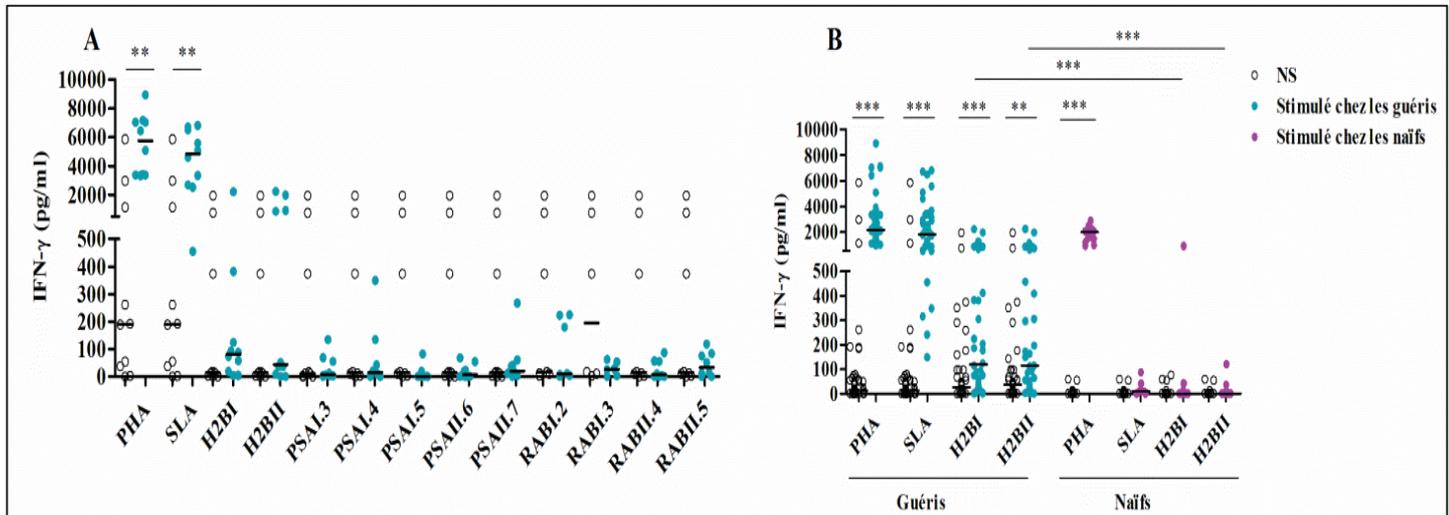


Figure 27. Taux d'IFN- γ détectés chez des individus guéris de LCZ, après stimulation par les peptides individuels (ELISA)

L'IFN- γ a été quantifié par ELISA dans des surnageants de culture de PBMC d'individus guéris de LCZ (n = 10) stimulés par les peptides individuels (1 μ M) pendant 10 jours (A). L'IFN- γ , en réponse aux peptides H2BI et H2BII, a aussi été évalué chez un nombre plus élevé d'individus guéris de LC (n = 40) ainsi que chez des individus sains (n = 12) (B). Les résultats sont exprimés en pg/ml. Les différences statistiquement significatives entre les cultures NS et stimulées et entre les groupe guéris et naïfs, sont indiquées par des astérisques (test wilcoxon et Mann-whitney, respectivement). Chaque point représente la réponse de chaque individu testé (moyenne des triplicates). Les barres horizontales représentent la valeur médiane d'IFN- γ (pg/ml).

Tableau 22. Taux d'IFN- γ détectés chez les individus guéris et naïfs, après stimulation par les peptides individuels

Peptides	Médiane IFN- γ (pg/ml)							
	Guéris				Naïfs			
	Nombre d'individus	Médiane NS \pm IQR	Médiane Stimulé \pm IQR	Valeur de p	Nombre d'individus	Médiane NS \pm IQR	Médiane Stimulé \pm IQR	Valeur de p
H2BI	10 40	14 \pm 466 25,3\pm93,7	81 \pm 173 119,6\pm788,9	ns 0,0025	12	0,03 \pm 44,4	0 \pm 33,9	ns
H2BII	10 39	14 \pm 466 36,36\pm93,16	44,4 \pm 1169 114\pm707,9	ns 0,0001	12	0 \pm 10,13	0 \pm 6,8	ns
PSAL3	9,0	12,4 \pm 562,43	7,06 \pm 58,66	ns	-	-	-	-
PSAL4	8,0	14,78 \pm 654,71	14,86 \pm 109,31	ns	-	-	-	-
PSAL5	8,0	14,78 \pm 654,71	1,72 \pm 14,91	ns	-	-	-	-
PSAIL6	10,0	14,04 \pm 466,4	7,27 \pm 30,96	ns	-	-	-	-
PSAIL7	10,0	14,04 \pm 466,47	20,25 \pm 37,34	ns	-	-	-	-
RABI.2	7,0	17,15 \pm 744,89	10,51 \pm 218,19	ns	-	-	-	-
RABI.3	6,0	195,6 \pm 1044,97	27,27 \pm 53,16	ns	-	-	-	-
RABII.4	8,0	14,78 \pm 654,71	7,03 \pm 56,53	ns	-	-	-	-
RABII.5	8,0	14,78 \pm 654,71	33,04 \pm 78,64	ns	-	-	-	-

Concernant les réponses IFN- γ observées chez les individus guéris, après stimulation par les pools de peptides, nous avons compartimenté les réponses en 3 catégories ; celles observées après stimulation par les pools contenant des peptides de classe I (issus des mêmes protéines ou de protéines différentes) (**Tableau 23, Figure 28 B**), celles observées après stimulation par les pools contenant des peptides de classe II (issus des mêmes protéines ou de protéines différentes) (**Tableau 23, Figure 28 C**) et celles observées après stimulation par les pools contenant un mélange de peptides de classe I et -II (issus des mêmes protéines ou de protéines différentes) (**Tableau 23, Figure 28 D**). Les nombres d'individus guéris analysés varient en fonction des conditions de stimulation et figurent dans le **tableau 23**. La variabilité dans le nombre d'individus analysés est due à des contraintes techniques, telles que le nombre de cellules/individu, les quantités de peptides etc.

Des taux d'IFN- γ significatifs ont été observés en réponse à la PHA et au SLA (**Tableau 23, Figure 28 A**), aux pools de classe I, **P1** (H2BI, PI) et **P4** (H2BI, PI, RI) (**Tableau 23, Figure 28 B**), aux pools de classe II, **P5** (H2BII, PII), **P6** (H2BII, RII), **P7** (PII, RII) et **P8** (H2BII, PII, RII) (**Tableau 23, Figure 28 C**) et aux pools de classe I et -II, **P9** (H2BI, H2BII), **P12** (H2BI, PII), **P13** (H2BI, H2BII, PII), **P14** (H2BI, PII, RI), **P15** (H2BII, PI, RII), **P16** (H2BI, H2BII, PI, PII), **P17** (H2BI, H2BII, RI, RII), **P18** (H2BI, PI, RII), **P19** (H2BII, PII, RI) et **P21** (H2BI, H2BII, PI, PII, RI, RII) (**Tableau 23, Figure 28 C**).

Il est à noter que les pools P12 (H2BI, PII) et P13 (H2BI, H2BII, PII), sont 2 combinaisons peptidiques rajoutées suite aux observations faites après les premières expériences post-optimisation, qui ont montré les taux les plus élevés d'IFN- γ pour les pools P21 (tous les peptides), P16 (H2BI, H2BII, PI, PII) et P14 (H2BI, PII, RI) et les taux les plus faibles pour les pools PI, RI et RII.

Pour P12 (H2BI, PII), nous avons regroupé les peptides en commun aux pools P21, P16 et P14, et pour **P13** (H2BI, H2BII, PII), le H2BII a aussi été rajouté puisqu'il fait partie, avec le H2BI, des peptides multi-épitopiques induisant les réponses IFN- γ les plus élevées.

Concernant les résultats observés chez les individus naïfs, des taux élevés et significatifs d'IFN- γ ont été observés en réponse à la stimulation par la PHA chez tous les individus (**Figure 28 E**). Aucune réponse significative n'a été observée, après stimulation par le SLA (**Figure 28 E**).

Aucun pool peptidique, à l'exception de P12, n'a induit des taux d'IFN- γ significatifs chez les individus naïfs (**Tableau 23, Figure 28 H**).

Tableau 23. Taux d'IFN- γ détectés chez des individus guéris et naïfs, après stimulation

Stimuli		Médiane IFN- γ (pg/ml)						
		Composition des pools de peptides	Guéris				Valeur de p	Nombre d'individus
			Nombre d'individus	Médiane NS \pm IQR	Médiane Stimulé \pm IQR			
Contrôles positifs	PHA	-	56	22 \pm 56,3	3003 \pm 2280	<0,0001	28	
	SLA	-	56	22 \pm 56,3	1812 \pm 2323,7	<0,0001	28	
Pools de peptides de classe I	P1	PI	14	23,01 \pm 56,74	37,73 \pm 72,51	ns	11	
	P2	RI	11	3,47 \pm 46,22	7,35 \pm 106,9	ns	9	
	P3	H2BI/PI	23	12,39 \pm 65,69	143,55 \pm 939,08	0,004	12	
	P4	H2BI/RI	23	10,31 \pm 46,98	41,98 \pm 269	ns	11	
	P5	PI/RI	12	24,8 \pm 64,03	37,54 \pm 230,28	ns	10	
	P6	H2BI/PI/RI	9	3,19 \pm 24	232,57 \pm 788,05	0,0039	11	
Pools de peptides de classe II	P7	P1I	16	14,54 \pm 45,29	35,35 \pm 140,85	ns	12	
	P8	R1I	16	38,87 \pm 61,80	26,93 \pm 108,96	ns	12	
	P9	H2BII/P1I	22	8,24 \pm 47,94	195,04 \pm 352,1	0,003	11	
	P10	H2BII/R1I	18	7,23 \pm 40,2	48,55 \pm 162,67	0,0052	12	
	P11	P1I/R1I	15	31,45 \pm 44,64	46,63 \pm 138,62	0,012	10	
	P12	H2BII/P1I/R1I	23	15,6 \pm 64,5	287,30 \pm 1177	<0,0001	12	
Pools de Peptides de classe I+ classe II	P13	H2BI/H2BII	23	33,5 \pm 64,7	584,4 \pm 1148	0,0003	12	
	P14	PI/P1I	19	12,39 \pm 46,55	11,27 \pm 57,87	ns	12	
	P15	RI/R1I	11	44,7 \pm 68,92	25,22 \pm 238,79	ns	10	
	P16	H2BI/P1I	23	37,1 \pm 57,4	777,7 \pm 1811	<0,0001	9	
	P17	H2BI/H2BII/P1I	23	12,4 \pm 65,5	946,5 \pm 1229,6	<0,0001	12	
	P18	H2BI/P1I/RI	23	12,4 \pm 65,5	730,8 \pm 1052,7	0,0002	12	
	P19	H2BII/P1I/R1I	18	14,54 \pm 46,99	113,41 \pm 373,49	0,0009	12	
	P20	H2BI/H2BII/P1I/P1I	23	12,4 \pm 53	1080 \pm 1249,5	<0,0001	12	
	P21	H2BI/H2BII/RI/R1I	11	3,19 \pm 12,21	180,26 \pm 555,98	0,001	12	
	P22	H2BI/P1I/R1I	20	9,61 \pm 62,54	64,69 \pm 653,98	0,01	12	
P23	H2BII/P1I/RI	10	3,22 \pm 20,33	101,62 \pm 457,06	0,01	12		
P24	PI/P1I/RI/R1I	11	3,19 \pm 12,21	6,35 \pm 24,28	ns	12		
P25	H2BI/H2BII/P1I/P1I/RI/R1I	23	15,6 \pm 93,4	1207 \pm 928,1	<0,0001	12		

Guéris

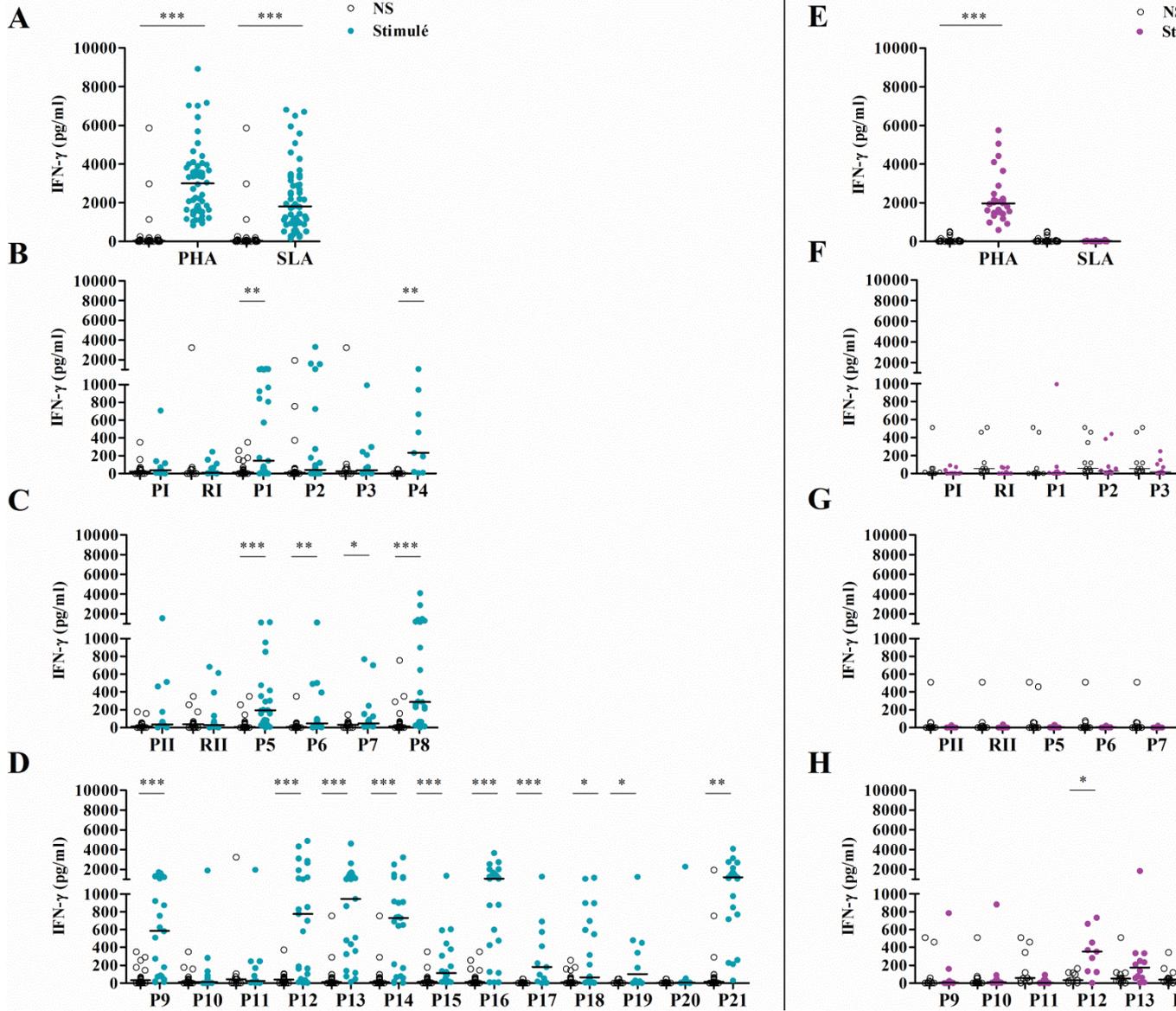


Figure 28. Taux d'IFN- γ détectés chez des individus guéris et naïfs, après stimulation par les de cII (C, G) ou de cII/cIII (D, H) (ELISA)

L'IFN- γ a été quantifié par ELISA dans les surnageants de culture de PBMC d'individus guéris de LC (n = 23) (A, B, C, D) ou d'individus naïfs (n = 12) (E, F, G, H) stimulés par PHA et SLA (10 μ g / ml) (A, E) ou par les pools de peptides (1 μ M / peptide) composés par les peptides de classe I (B, F), les peptides de classe II (C, G) ou les peptides de classe I et -II (D, H). Les résultats sont exprimés en pg/ml. Chaque point représente la réponse de chaque individu testé (moyenne des triplicates). Les barres horizontales représentent la valeur médiane d'IFN- γ (pg/ml). Les différences statistiquement significatives entre les cultures NS et stimulées sont indiquées par des astérisques (test wilcoxon). La significativité statistique a été attribuée à une valeur de p <0,05 (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001)

b. Comparaison des résultats observés chez les individus guéris et naïfs (analyse intergroupe)

Il est à noter que la comparaison des résultats observés chez les individus guéris et naïfs, n'a été effectuée que pour les pools ayant induit des taux d'IFN- γ significatifs chez les individus guéris. Comme attendu, des taux en IFN- γ ont été détectés en réponse au SLA, de façon significativement plus élevée, chez les individus guéris en comparaison avec les naïfs (**Figure 29 A**).

Concernant les réponses à la stimulation par les pools de peptides, nous avons montré des taux d'IFN- γ significativement plus élevés chez les individus guéris par rapport aux individus naïfs pour les pools de classe I, **P1** et **P4** (**Figure 29 B**), les pools de classe II, **P5**, **P6**, **P7** et **P8** (**Figure 29 C**) et les pools de classe I et -II, **P9**, **P13**, **P14**, **P15**, **P16**, **P17**, **P18**, **P19** et **P21** (**Figure 29 D**). Concernant le **P12**, aucune différence statistiquement significative n'a été démontrée dans les taux d'IFN- γ , observés entre les guéris et les naïfs (**Figure 29 D**).

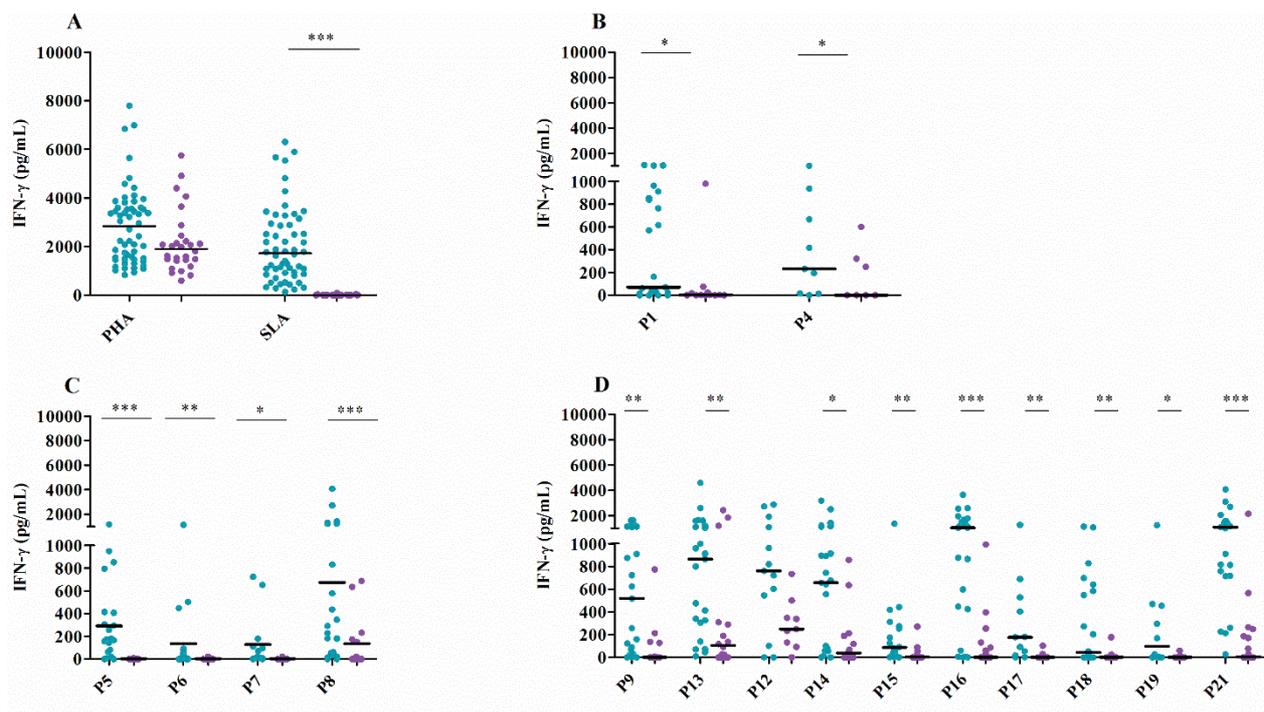


Figure 29. Comparaison entre les taux d'IFN- γ détectés chez des individus guéris et naïfs, après stimulation par les pools de peptides de classe I (B), de classe II (C) ou de classe I et -II (D) (ELISA)

L'IFN- γ a été quantifié par ELISA dans les surnageants de culture de PBMC d'individus guéris de LC et d'individus naïfs stimulés par PHA et SLA (10 μ g/ml) (A) ou par les pools de peptides (1 μ M / peptide) composés par les peptides de classe I (B), les peptides de classe II (C) ou les peptides de classe I et -II (1 μ M) (D). Les barres horizontales représentent la valeur médiane d'IFN- γ (pg/ml) après déduction des valeurs des NS. Les différences statistiquement significatives entre les cultures NS et stimulées sont indiquées par des astérisques (test Mann-withney). La significativité statistique a été attribuée à une valeur de $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

c. Comparaison des résultats observés chez les individus guéris, entre les différents pools peptidiques

Nous avons effectué une analyse statistique entre les différents pools induisant des taux d'IFN- γ significatifs chez les individus guéris (**Tableau 24**).

Tableau 24. Analyse statistique entre les différents pools de peptides, chez les individus guéris de LCZ

	Pools de peptides	P1	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P21	H2BI	H2BII
Pools de peptides	composition en peptides	H2BI/PI	H2BI/PI/RI	H2BII/PII	H2BII/RII	PII/RII	H2BII/PII/RII	H2BI/H2BII	H2BI/PII	H2BI/H2BII/PII	H2BI/PI/RI	H2BI/PI/RII	H2BI/H2BII/PI/PII	H2BI/H2BII/RI/RII	H2BI/PI/RII	H2BI/PII/RI	H2BI/H2BII/PI/PII/RII	H2BI	H2BII
P1	H2BI/PI		ns	ns	ns	ns	ns	0,09	0,04	0,003	ns	ns	0,002	ns	ns	ns	<0,0001	ns	ns
P4	H2BI/PI/RI	ns		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,03	ns	ns	ns	0,001	ns	ns
P5	H2BII/PII	ns	ns		0,04	ns	ns	ns	ns	0,001	ns	ns	0,001	ns	ns	ns	<0,0001	ns	ns
P6	H2BII/RII	ns	ns	0,04		ns	0,0006	0,0005	0,002	<0,0001	0,004	ns	0,005	ns	ns	ns	<0,0001	ns	ns
P7	PII/RII	ns	ns	ns	ns		0,007	0,01	0,06	<0,0001	0,01	ns	<0,0001	ns	ns	ns	<0,0001	ns	ns
P8	H2BII/PII/RII	ns	ns	ns	0,0006	0,007		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,002	ns	ns
P9	H2BI/H2BII	0,09	ns	ns	0,0005	0,01	ns		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,002	ns	0,02
P12	H2BI/PII	0,04	ns	ns	0,002	0,06	ns	ns		ns	ns	0,01	ns	ns	0,02	ns	ns	ns	0,07
P13	H2BI/H2BII/PII	0,003	ns	0,001	<0,0001	<0,0001	ns	ns	ns		ns	0,0003	ns	0,02	0,001	0,008	ns	0,02	0,0001
P14	H2BI/PII/RI	ns	ns	ns	0,004	0,01	ns	ns	ns	ns		0,02	ns	ns	0,02	ns	0,003	ns	0,01
P15	H2BI/PI/RII	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,01	0,0003	0,02		0,008	ns	ns	ns	<0,0001	ns	ns
P16	H2BI/H2BII/PI/PII	0,002	0,03	0,001	0,005	<0,0001	ns	ns	ns	ns	ns	0,008		0,061	0,001	0,01	ns	0,01	0,002
P17	H2BI/H2BII/RI/RII	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,02	ns	ns	0,001		ns	ns	0,0003	ns	ns
P18	H2BI/PI/RI	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,02	0,001	0,02	ns	0,001	ns		ns	<0,0001	ns	ns
P19	H2BII/PII/RI	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,008	ns	ns	0,01	ns	ns		0,0005	ns	ns
P21	H2BI/H2BII/PI/PII/RI/RII	<0,0001	0,001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,002	0,002	ns	ns	0,003	<0,0001	ns	0,0003	<0,0001	0,0005		<0,00001	<0,0001
H2BI	H2BI	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,02	ns	ns	0,01	ns	ns	ns	<0,0001		ns
H2BII	H2BII	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,02	0,07	0,0001	0,01	ns	0,002	ns	ns	ns	<0,0001	ns	

Cette analyse nous a permis de classer nos pools peptidiques en termes d'intensité de réponse IFN- γ (pg/ml), comme suit (**Tableau 25**):

Tableau 25. Taux d'IFN- γ induit par les pools de peptides classé par ordre décroissant


Pools de peptides	Composition	Médiane±IQR
P21	H2BI/H2BII/PI/PII/RI/RII	1207±928,1
P16	H2BI/H2BII/PI/PII	1080±1249,5
P13	H2BI/H2BII/PII	946,5±1229,6
P12	H2BI/PII	777,7±1811
P14	H2BI/PII/RI	730,8±1052,7
P9	H2BI/H2BII	584,4±1148
P8	H2BII/PII/RII	287,30±1177
P4	H2BI/PI/RI	232,57±788,05
P5	H2BII/PII	195,04±352,1
P17	H2BI/H2BII/RI/RII	180,26±555,98
P1	H2BI/PI	143,55±939,08
H2BI	H2BI	119,6±788,9
H2BII	H2BII	114±707,9
P15	H2BII/PI/RII	113,41±373,49
P19	H2BII/PII/RI	101,62±457,06
P18	H2BI/PI/RII	64,69±653,98
P7	PII/RII	46,63±138,62

Les pools induisant les taux d'IFN- γ les plus élevés sont les pools **P21** (Médiane±IQR NS vs Stim: 15±93 vs 1207±928), **P16** (12±53 vs 1080±1249), **P13** (12±65 vs 946±1229), **P12** (37±57 vs 777±1811), **P14** (12±65 vs 730±1052), **P9** (33±64 vs 584±1603) et **P8** (15±64 vs 287±1177) ($p < 0.0003$).

De façon intéressante, aucune différence statistiquement significative n'a été observée dans les taux d'IFN- γ induits par le **P21** contenant la totalité de nos peptides (H2BI, H2BII, PI, PII, RI, RII), **P16** (H2BI, H2BII, PI, PII) et **P13** (H2BI, H2BII, PII) (**Tableau 24**). Ces pools contiennent en commun les peptides **H2BI**, **H2BII**, **PSAII.6**, **PSAII.7**, nous permettant de suggérer que ces derniers seraient suffisants pour induire des taux d'IFN- γ aussi importants que ceux induits par le P21 contenant l'ensemble des peptides.

Les pools PI, RI et RII, ne semblent pas nécessaires à l'induction de taux élevés d'IFN- γ . Les arguments en faveur de cette constatation sont l'incapacité des pools P10 (PI, PII), P11 (RI, RII) et P20 (PI, PII, RI, RII) à induire des taux significatifs d'IFN- γ (**Tableau 23, Figure 28**). De plus, parmi les pools contenant PI, RI ou RII, les pools P15 (H2BII, **PI**, **RII**), P17 (H2BI,

H2BII, **RI**, **RII**) et P18 (H2BI, **PI**, **RII**), induisent des taux d'IFN- γ significativement plus faibles que ceux induits par **P13**, lequel n'en contient pas.

Par ailleurs, il n'y a pas de différences significatives entre les taux d'IFN- γ induits par **P13** (H2BI, H2BII, PII) et **P9** (H2BI, H2BII), permettant de suggérer que les peptides H2BI et H2BII pourraient constituer la plus petite combinaison, associée à des taux élevés d'IFN- γ (**Tableau 24**). Il est à rappeler que, parmi les peptides individuels, seuls les peptides **H2BI** (Médiane \pm IQR NS vs Stim: 25.35 \pm 93.71 vs 119.6 \pm 788.9) et **H2BII** (36.36 \pm 93.16 vs 114.8 \pm 707.9) ($p < 0.0025$) ont été capables d'induire des taux élevés et significatifs d'IFN- γ après stimulation des PBMC des individus guéris (**Tableau 22 et Figure 27**).

Il est intéressant de noter que tous les pools de peptides produisant de l'IFN- γ d'une façon significative, à l'exception de P7, contiennent en commun des peptides affins pour les molécules HLA-I et/ou HLA-II issus de la protéine H2B.

II.1.2. Analyse de la réponse IL-10

Des taux élevés et significatifs d'IL-10 ont été observés en réponse à la stimulation par la PHA chez les individus guéris ($n=16$) et naïfs ($n=10$) (**Figure 30 A et F**). L'IL-10 n'a pas été détectée de façon significative en réponse aux peptides multi-épitopiques (sauf pour H2BII chez les naïfs) ou aux pools peptidiques. Cependant, une baisse significative des taux d'IL-10 dans les cultures stimulées par **PII** (Médiane \pm IQR NS vs Stim: 12 \pm 22 vs 5 \pm 20), **P6** (12 \pm 18 vs 3 \pm 7), **P8** (12 \pm 23 vs 3 \pm 13), **P10** (14 \pm 25 vs 9 \pm 20), **P13** (47 \pm 80 vs 6 \pm 24), **P14** (47 \pm 20 vs 9 \pm 16) et **P18** (12 \pm 17 vs 4 \pm 215) ($p < 0.01$) a été observée par rapport aux cultures non stimulées, chez les individus guéris (**Figure 30 D et E**).

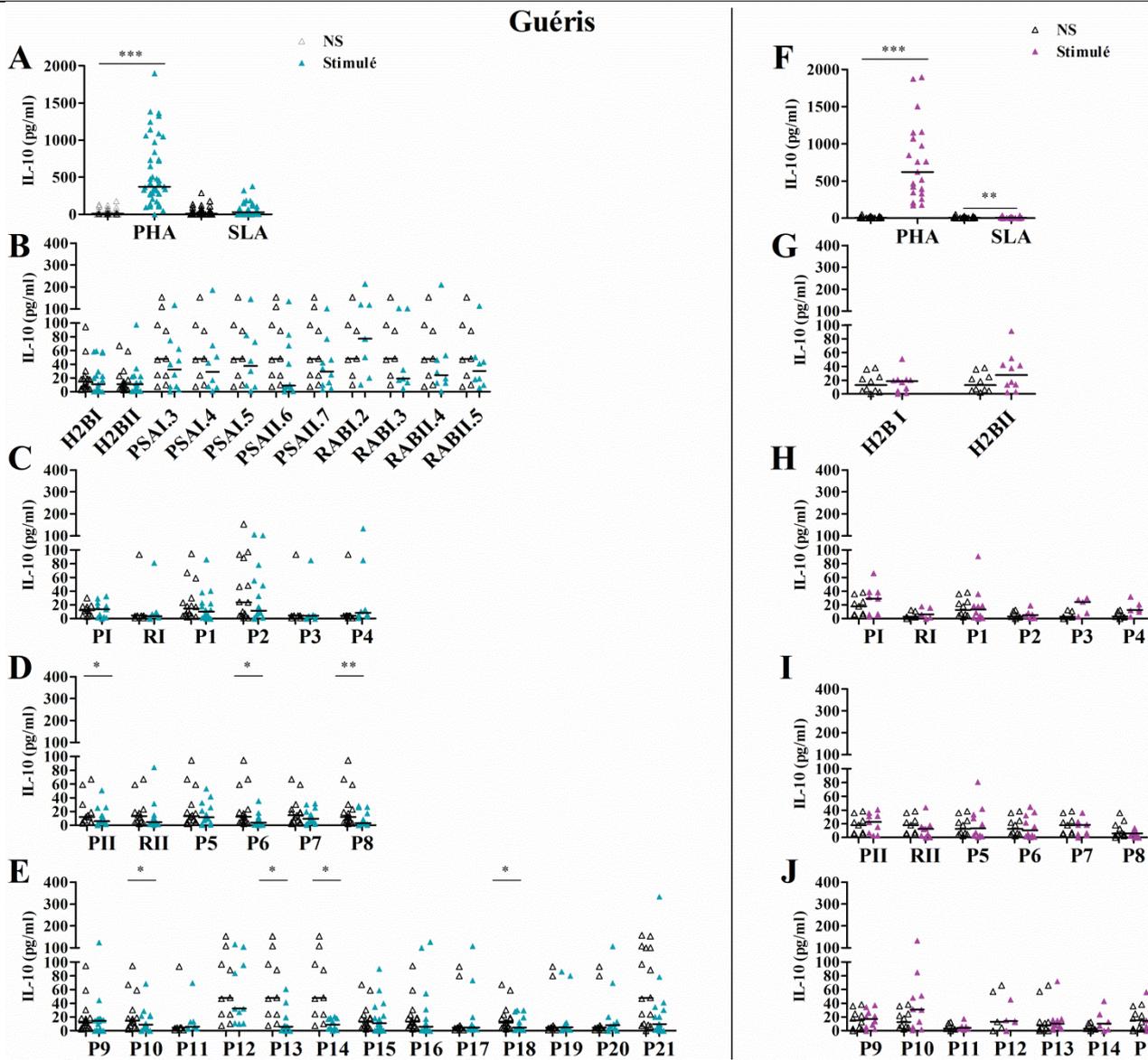


Figure 30. Taux d'IL-10 détectés après stimulation par les pools de peptides et par les peptides individuels chez des individus guéris et naïfs (ELISA)

L'IL-10 a été quantifié par ELISA dans les surnageants de culture de PBMC d'individus guéris de LCZ (n = 16) (**B, C, D et E**) ou d'individus naïfs (n = 10) (**G, H, I et J**) stimulés par PHA et SLA (10 µg / ml) (**A, F**), par les peptides individuels (**B, G**) ou par les pools de peptides (1 µM/peptide) composés par les peptides de classe I (**C, H**), les peptides de classe II (**D, I**) ou les peptides de classe I et -II (**E, J**). Les résultats sont exprimés en pg/ml. Les barres horizontales représentent la valeur médiane d'IFN-γ (pg/mL). Les différences statistiquement significatives entre les cultures NS et stimulées sont indiquées par des astérisques (test wilcoxon). La significativité statistique a été attribuée à une valeur de p <0,05 (* p <0,05, ** p <0,01).

II.2. Enumération par ELISPOT des LT spécifiques des pools de peptides

Nous avons sélectionné 6 pools de peptides induisant les taux d'IFN-γ les plus élevés par ELISA, à savoir, le **P8, P9, P13, P14, P16 et P21**, et ce, dans le but de caractériser la réponse immunitaire, de manière plus approfondie. Le pool **P12** n'a pas été sélectionné, puisqu'il a induit une réponse IFN-γ, de façon similaire chez les individus guéris et naïfs, permettant de suggérer que cette réponse ne serait pas spécifique de l'infection.

Nous avons évalué la capacité des pools de peptides à activer les cellules T spécifiques de *Leishmania*, par un test ELISPOT. Nous avons énuméré les LT spécifiques produisant de l'IFN-γ, en réponse à la stimulation par les pools **P8, P9, P13, P14, P16 et P21**, par ELISPOT, chez des individus guéris de LCZ (**Tableau 26**).

Les résultats ont été exprimés en SFU (Spots Forming units)/10⁶PBMC (Moyenne SFU d'un triplicate de culture, pour un individu et Médiane SFU de l'ensemble des individus pour le groupe de guéris) (**Tableau 26**).

Tableau 26. Production de l'IFN- γ par les PBMCs d'individus guéris de LCZ, en réponse aux pools P8, P9, P13, P14, P16 et P21, évaluée par ELISPOT.

Stimuli	Composition en peptides	Nombre d'individus	Médiane NS (SFU/10 ⁶ PBMC)±IQR	Médiane Stim (SFU/10 ⁶ PBMC)±IQR	Valeur de p
PHA	-	16	13±22	3704±3669	0,0005
SLA	-	16	13±22	551±1034	0,0005
P8	H2BII/PII/RII	8	8±24	857±893	0,007
P9	H2BI/H2BII	11	10±27	95±1392	0,02
P13	H2BI/H2BII/PII	5	17±44	160±2739	ns
P14	H2BI/PII/RI	6	20±31,25	135±125,8	0,03
P16	H2BI/H2BII/PI/PII	8	8,5±22,75	550±1933,5	0,02
P21	H2BI/H2BII/PI/PII/RI/RII	11	10±27	542±762	0,001

La **figure 31** montre une image représentative d'un triplicat de culture NS ou stimulés par la PHA, le SLA ou les pools P8 ou P21, chez un individu guéri.

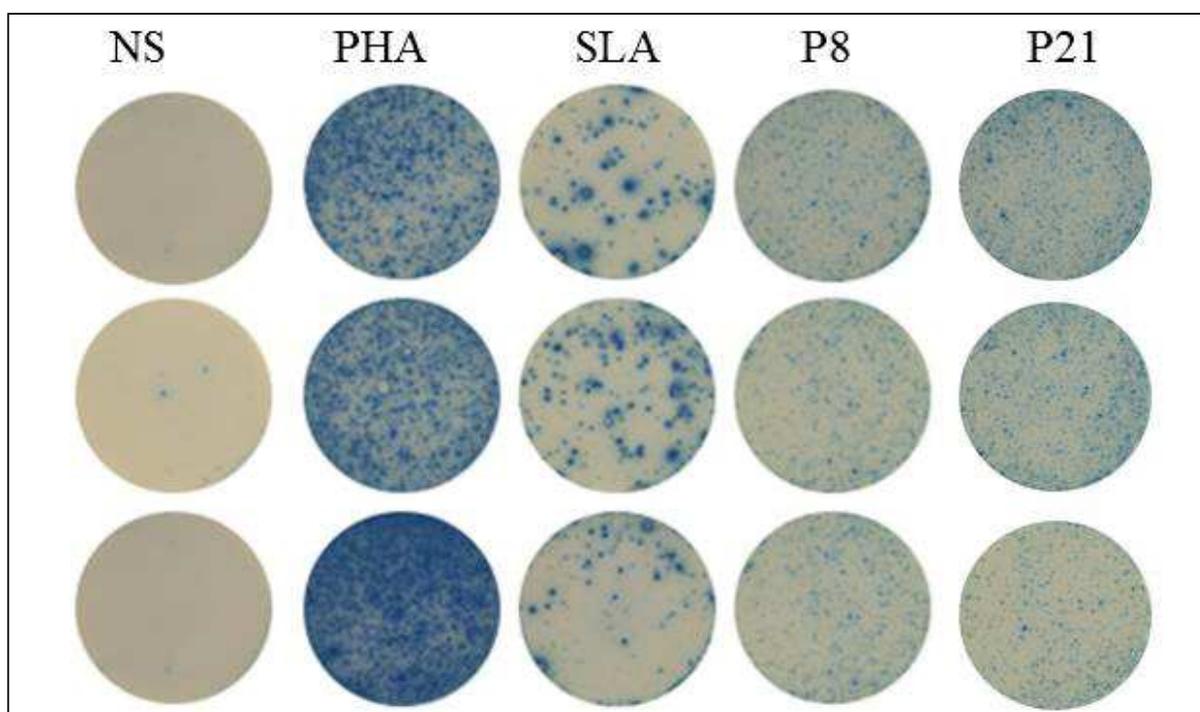


Figure 31. Evaluation de la production d'IFN- γ par ELISPOT chez un individu guéris de LCZ (Expérience représentative)

Image représentative d'un triplicata de culture, après stimulation par le pool P8 et P21 chez un individu guéri

Un nombre significatif de LT produisant de l'IFN- γ a été observé après stimulation des PBMC par la PHA et le SLA (**Tableau 26, Figure 32**).

Nous avons montré des différences significatives entre les nombres de LT spécifiques producteurs d'IFN- γ observés dans les cultures NS par rapport aux cultures stimulées par **P8** (Médiane SFU/10⁶±IQR NS vs Stim : 8±24 vs 857±893), **P9** (10±27 vs 95±1392), **P14** (20±31,25 vs 135±125,8) **P16** (8,5±22,75 vs 550±1933,5) et **P21** (10±27 vs 542±762) (**Tableau 26, Figure 32**).

Le P13 a induit un nombre élevé mais non significatif de LT producteurs d'IFN- γ . Ce résultat pourrait être dû à la variabilité des réponses observées et au faible échantillonnage (seulement 5 individus ont pu être analysés), dans ce cas.

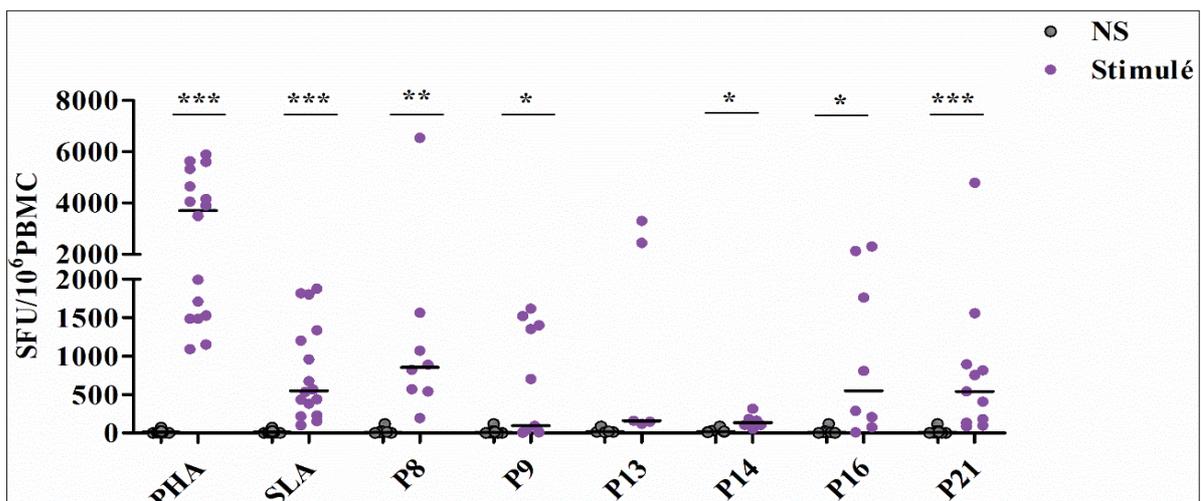


Figure 32. Evaluation de la production de l'IFN- γ par ELISPOT, après stimulation par les pools P8, P9, P13, P14, P16 et P21, chez des individus guéris de LCZ

Les PBMC issus des individus guéris de LCZ (n = 11) ont été restimulés par les pools de peptides sélectionnés comme décrit dans la partie matériel et méthodes.

Les cultures stimulées par la PHA et le SLA et les cultures NS représentent, respectivement les contrôles positifs et les contrôles négatifs. Les résultats sont exprimés en SFU/10⁶ PBMC. Les barres horizontales représentent la valeur médiane. Les différences statistiquement significatives entre les cultures NS et stimulées sont indiquées par des astérisques (test wilcoxon). * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001

Parmi les individus guéris de LCZ analysés en ELISPOT, un typage HLA a été effectué pour cinq d'entre eux (chez ces individus, la réponse IFN- γ n'a pu être analysée qu'en réponse à la stimulation par P8, P9, P16 et P21) (**Tableau 27**). Pour tenter d'analyser les réponses en

termes de fréquence de LT producteurs d'IFN- γ en réponse aux pools de peptides, en même temps que le typage HLA de l'individu, nous avons exprimé les réponses IFN- γ de la manière suivante : Une réponse IFN- γ est considérée comme positive si elle est supérieure au seuil défini par la valeur moyenne observée dans les cultures NS plus 2 déviation standard (Moy NS (SFU/10⁶PBMC) + 2xDS). Une réponse IFN- γ positive a été observée en réponse aux P8, P9, P16 et P21 chez 4/5 individus testés, permettant de valider les prédictions, *in silico*, de nos épitopes (**Tableau 27**). Chez ces 4 individus (CCL58, CCL60, CCL61, CCL62), les allèles HLA-I ou II, pour lesquels, au moins un épitope est affins, sont présents.

En revanche, aucune réponse IFN- γ n'a été détectée chez l'individu CCL64, après stimulation par P9 (H2BI et H2BII). Ce donneur n'exprime pas les allèles HLA-I auxquels les épitopes H2BI sont affins, mais possède les allèles HLA-II pour lesquels les épitopes H2BII ont une forte affinité. La réponse positive observée après stimulation par P8, P16 et P21, chez cet individu, pourrait être induite par les épitopes affins aux molécules HLA-II dérivés de la protéine PSA, qui sont communs entre ces pools de peptides.

Tableau 27. Typage HLA et réponse IFN- γ , détectée par ELISPOT, chez les in

A-Typage HLA				
Individus guéris de LC	CCL58	CCL60	CCL61	CCL62
HLA-A	A*23:01 A*24:02	A*03:01 A*24:01	A*02:05 A*03:01	A*24:02 A*29:02
HLA-B	B*08:01 B*49:01	B*35:08 B*39:06	B*35:08 B*49:01	B*15:03 B*39:06
HLA-DRB	DRB1*07:01 or DRB1*07:79 DRB1*15:01	DRB1*07:01 or DRB1*07:79 DRB1*11:01	DRB1*11:01 DRB1*15:01	DRB1*07:01 DRB1*11:01
HLA-DPB	DPB*04:01 DPB1*17:01	DPB1*13:01 DPB1*13:01 or DPB1*107:01 or DPB1*518:01 or DPB1*519:01	DPB*04:01 or DPB*350:01 or DPB1*702:01 DPB1*13:01	DPB1*13:01 DPB1*17:01
B- réponses IFN-γ induites par les pools de peptides (Moyenne SFU/10⁶ PBMC\pmSD)				
NS ^a	0 \pm 0	7 \pm 12	7 \pm 12	17 \pm 15
PHA	5895 \pm 1676	1095 \pm 205	5337 \pm 1072	3497 \pm 115
SLA	440 \pm 113	535 \pm 92	435 \pm 64	1817 \pm 242
NS ^b /(Seuil de positivité)	10 \pm 0/(10)	7 \pm 6/(19)	0 \pm 0/(0)	0 \pm 0/(0)
P8	ND	6550\pm679	1073\pm81	1565\pm106
P9	1620\pm820	1405\pm488	43\pm75	10\pm14
P16	2303\pm267	1765\pm7	10\pm0	207\pm112
P21	1560\pm495	815\pm177	4790\pm2927	87\pm40

^aCultures non stimulées, contrôle négatif pour les cultures stimulées par PHA and SLA

^bCultures non stimulées, contrôle négatif pour les cultures stimulées par les pools de peptides.

II.3. Dosage des taux de TNF- α et de GrB induits par les pools de peptides

Un test CBA a été réalisé pour doser d'autres cytokines associées à la protection contre l'infection par *Leishmania*, à savoir le TNF- α et le GrB.

Le TNF- α et le GrB ont été évalués pour deux pools de peptides, le P21 (contenant la totalité des peptides) et P13 (**Tableau 28 et 29, Figure 33**).

Du TNF- α a été détecté à des taux significatifs (comparaison entre cultures stimulées et NS), chez les individus guéris et naïfs, après stimulation par la PHA et seulement chez les individus guéris, en réponse à la stimulation par le SLA (**Tableau 28, Figure 33 A et C**).

Des taux élevés et significatifs de TNF- α ont été observés chez les individus guéris, après stimulation par P13 (Médiane \pm IQR NS vs Stim: 1,4 \pm 2,1 vs 6,55 \pm 9,675) et P21 (0 \pm 1,9 vs 10,8 \pm 13,7) (**Tableau 28, Figure 33 A**). Il est intéressant de noter qu'aucune réponse TNF- α significative n'a été observée chez les individus naïfs, en réponse à ces pools (**Tableau 28, Figure 33 C**).

Tableau 28. Taux de TNF- α détectés chez des individus guéris et naïfs, après stimulation par P13 et P21 (CBA)

TNF- α (pg/mL)									
Pools de peptides	Composition	Guéris				Naïfs			
		Nombre d'individus	Médiane NS \pm IQR	Médiane Stimulé \pm IQR	Valeur de p	Nombre d'individus	Médiane NS \pm IQR	Médiane Stimulé \pm IQR	Valeur de p
PHA	-	10	7,7 \pm 11,075	907 \pm 693	0,002	7	9 \pm 25,13	641,8 \pm 889	0,01
SLA	-	10	7,7 \pm 11,075	103,8 \pm 89,62	0,002	7	9 \pm 25,13	2,4 \pm 3,02	ns
P13	H2BI/H2BII/PII	9	1,4 \pm 2,1	6,55 \pm 9,675	0,003	7	1,9 \pm 10,13	4,4 \pm 11,28	ns
P21	H2BI/H2BII/PI/PII/RI/RII	11	0 \pm 1,9	10,8 \pm 13,7	0,001	7	1,9 \pm 10,13	5,43 \pm 3,12	ns

Concernant les réponses GrB, des taux élevés et significatifs de GrB, ont été détectés en réponse à la PHA, chez les individus guéris et naïfs, et en réponse au SLA, seulement chez les individus guéris (**Tableau 29, Figure 33 B et D**).

Le P13 a induit des taux significatifs de GrB chez les individus guéris (7,2 \pm 17,5 vs 158,6 \pm 896,4), mais aussi chez les naïfs (0 \pm 5,74 vs 102,9 \pm 1008,3) (**Tableau 29, Figure 33 B et D**). L'analyse statistique a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les 2 groupes. Par ailleurs, le pool P21 n'a pas induit de taux significatifs de GrB chez les guéris (**Tableau 29, Figure 33 B**).

Tableau 29. Taux de GrB détectés chez des individus guéris et naïfs, après stimulation par P21 et P13 (CBA)

Granzyme B (pg/mL)									
Pools de peptides	Composition	Guéris				Naïfs			
		Nombre d'individus	Médiane NS ±IQR	Médiane Stimulé ±IQR	Valeur de p	Nombre d'individus	Médiane NS ±IQR	Médiane Stimulé ±IQR	Valeur de p
PHA	-	8	10,95±7,055	11386±4585	0,007	6	93,52±1460	19375±8195	0,03
SLA	-	8	10,95±7,055	868,3±1025	0,007	6	93,52±1460	2,87±99,08	0,3
P13	H2BI/H2BII/PII	7	7,2±17,5	158,6±896,4	0,01	7	0±5,74	102,9±1008,3	0,03
P21	H2BI/H2BII/PI/PII/RI/RII	9	6,7±13,95	8,6±153,8	0,07	7	0±5,74	0±14,78	0,7

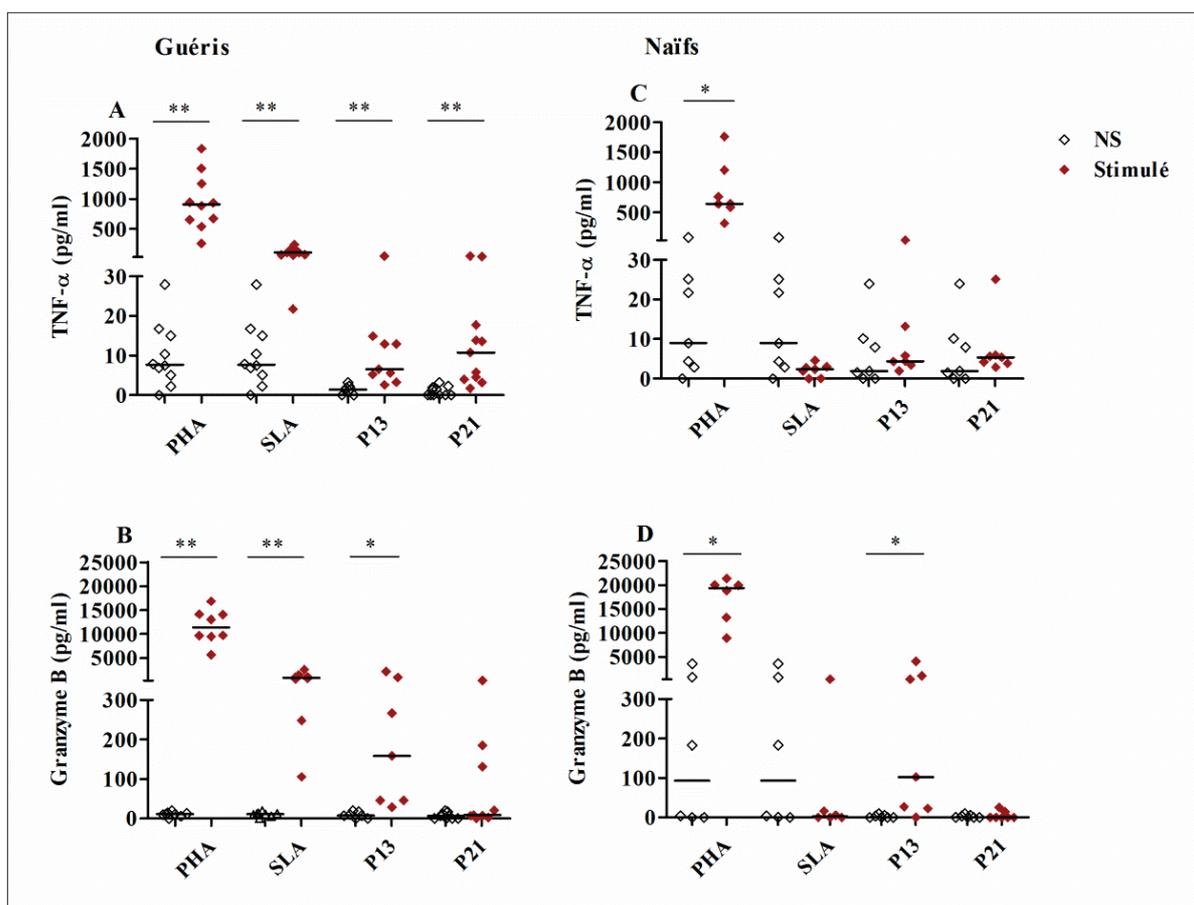


Figure 33. Analyse des taux de TNF-α (A et C) et de GrB (B et D) induits chez des individus guéris et naïfs, après stimulations par P21 et P13 (CBA).

Le TNF-α et le GrB ont été quantifiés par CBA dans des surnageants de culture de PBMC d'individus guéris de LC (n = 11) ou d'individus naïfs (n = 7), stimulés par PHA, SLA, P13 ou P21. Les différences statistiquement significatives entre les cultures NS et stimulées sont indiquées par des astérisques (test wilcoxon). * p < 0,05, ** p < 0,01.

II.4. Caractérisation phénotypique des populations lymphocytaires T spécifiques des peptides multi-épitopiques

Nous avons analysé les pourcentages des cellules T CD4⁺ productrices d'IFN- γ ou de GrB, des cellules T CD8⁺ productrices d'IFN- γ ainsi que des cellules T CD4⁺ polyfonctionnelles productrices des 3 cytokines, IFN- γ , IL-2 et TNF- α . Les pourcentages des cellules T mémoires (TCM/TEM) ont été également évalués.

Les cellules ont été restimulées par les pools de peptides sélectionnés (**P8, P9, P13, P14, P16** et **P21**), puis un marquage membranaire suivi d'un marquage intracellulaire, ont été effectués.

L'acquisition des données a été effectuée en utilisant un cytomètre en flux FACS canto II et l'analyse des données a été réalisée avec le logiciel FlowJo 7.6 (TreeStar, Ashland OR).

II.4.1. Caractérisation des populations lymphocytaires T CD4⁺ et T CD8⁺ productrices de cytokines

II.4.1.1. Fréquence des LT CD4⁺ productrices d'IFN- γ et de GrB

Les cellules T ont été identifiées, au sein de la population des lymphocytes totaux, par l'expression du marqueur CD3. Les T CD4⁺ ont été distingués au sein de la population LT par l'expression des marqueurs CD3 et CD4. Parmi la population T CD4⁺, nous avons identifié les cellules spécifiques sécrétrices d'IFN- γ ou de GrB (**Figure 34**).

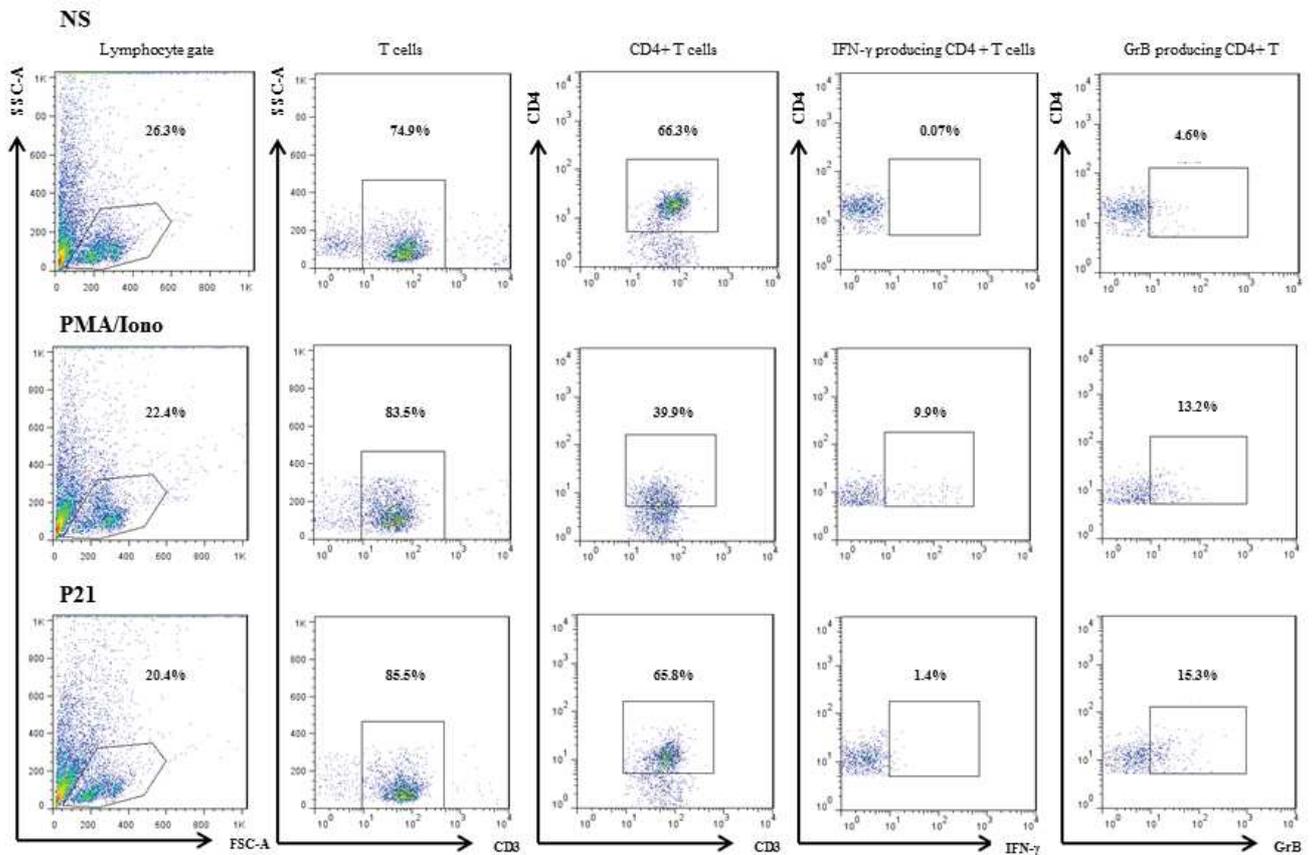


Figure 34. Analyse par cytométrie en flux, des cellules T CD4+ sécrétrices d'IFN-γ ou de GrB, après stimulation par la PMA/Iono et le P21, chez un individu guéri de LCZ (Expérience représentative)

Comme le montrent le **tableau 30** et la **figure 35**, la stimulation par le SLA s'est accompagnée d'une augmentation significative des pourcentages des populations T CD4+ productrices d'IFN-γ et CD4+ productrices de GrB.

Nous avons observé des augmentations significatives des pourcentages des cellules T CD4+ productrices d'IFN-γ en réponse à tous les pools de peptides, **P8** (Médiane±IQR NS vs Stim : $0,28 \pm 0,74$ vs $0,79 \pm 1,9$), **P9** ($0,39 \pm 0,6$ vs $1,62 \pm 2,5$), **P13** ($0,17 \pm 0,62$ vs $4,21 \pm 6,10$), **P14** ($0,22 \pm 0,78$ vs $1,11 \pm 1,13$), **P16** ($1,08 \pm 1,3$ vs $3,06 \pm 4,11$) et **P21** ($0,17 \pm 0,6$ vs $1,26 \pm 3,12$) (**Tableau 30, Figure 35 A**) ($p \leq 0,0092$). Une augmentation des pourcentages des cellules T CD4+ productrices de GrB a aussi été observée en réponse aux pools **P8** ($1,47 \pm 3,68$ vs $4,27 \pm 12,09$), **P9** ($1,47 \pm 3,68$ vs $3,71 \pm 6,14$), **P16** ($1,47 \pm 3,68$ vs $4,15 \pm 11,22$) et **P21** ($1,47 \pm 3,68$ vs $6,4 \pm 12,10$) ($p \leq 0,03$) (**Tableau 30, Figure 35 B**).

Nous avons également évalué le pourcentage de la population T CD4+ sécrétrices d'IFN-γ et de GrB parmi les T CD4+ totaux. Une augmentation significative de cette population a été observée après stimulation par le P21 ($1,7 / 3,1$; $0,1 / 0,5$) ($p = 0,01$). Aucune corrélation n'a été observée entre les cellules T CD4+ IFN-γ+ et les cellules T CD4+ GrB +.

Tableau 30. Pourcentages des LT CD4+ producteurs d'IFN- γ et de LT CD4+ producteurs de GrB, en réponse à une stimulation par les pools de peptides P8, P9, P13, P14, P16 et P21, chez des individus guéris de LCZ

Stimuli	Composition en peptides	CD3+ CD4+ IFN- γ +				CD3+ CD4+ Granzyme B+			
		Nb individus	Médiane NS \pm IQR	Médiane Stimulé \pm IQR	Valeur de p	Nb individus	Médiane NS \pm IQR	Médiane Stimulé \pm IQR	Valeur de p
PMA/Iono		29	0,43 \pm 1,08	16 \pm 20,75	<0,0001	8	1,47 \pm 3,68	4,28 \pm 9,7	0,007
SLA	-	29	0,43 \pm 1,08	2,06 \pm 2,9	<0,0001	8	1,47 \pm 3,68	4,48 \pm 12,10	0,02
P8	H2BII/PII/RII	17	0,28 \pm 0,74	0,79 \pm 1,9	0,0092	8	1,47 \pm 3,68	4,27 \pm 12,09	0,03
P9	H2BI/H2BII	16	0,39 \pm 0,6	1,62 \pm 2,5	0,0005	8	1,47 \pm 3,68	3,71 \pm 6,14	0,01
P13	H2BI/H2BII/PII	21	0,17 \pm 0,62	4,21 \pm 6,10	<0,0001	5	2,6 \pm 3,13	10,8 \pm 18,04	ns
P14	H2BI/PII/RI	16	0,22 \pm 0,78	1,11 \pm 1,13	0,0009	5	2,6 \pm 3,13	2,63 \pm 7,47	ns
P16	H2BI/H2BII/PI/PII	14	1,08 \pm 1,3	3,06 \pm 4,11	0,0002	8	1,47 \pm 3,68	4,15 \pm 11,22	0,01
P21	H2BI/H2BII/PI/PII/RI/RII	21	0,17 \pm 0,6	1,26 \pm 3,12	<0,0001	8	1,47 \pm 3,68	6,4 \pm 12,10	0,02

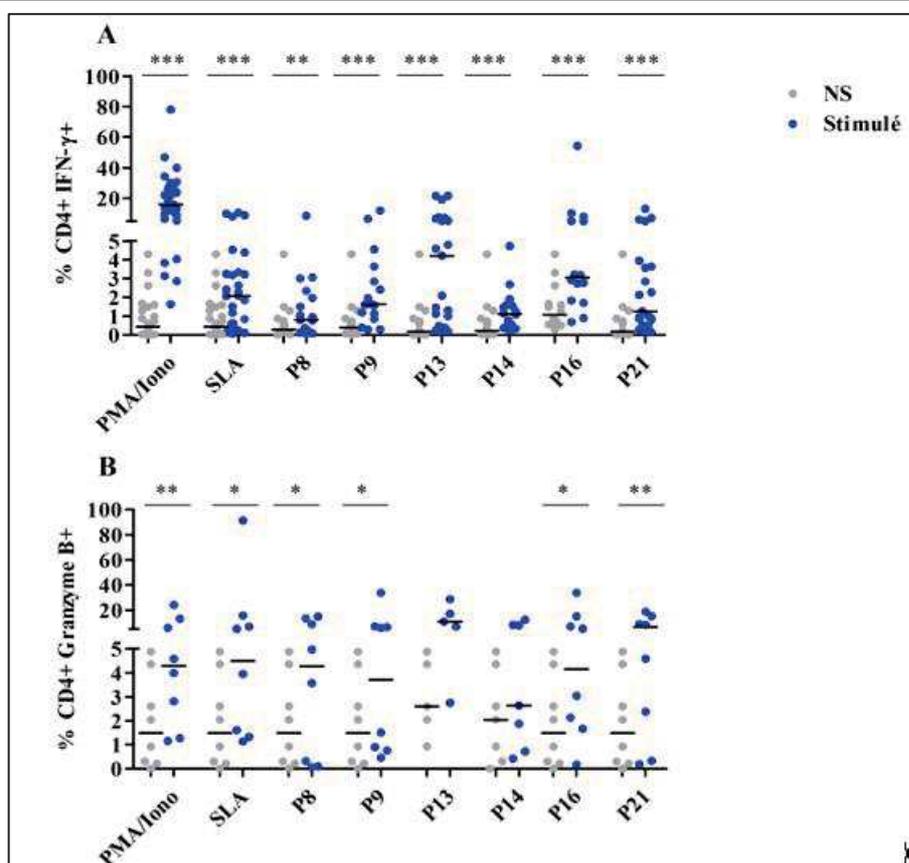


Figure 35. Pourcentages des populations LT CD4+ producteurs d'IFN- γ et de LT CD4+ producteurs GrB, après stimulation par les pools P8, P9, P13, P14, P16 et P21, chez des individus guéris de LCZ (Cytométrie en flux)

Les PBMC issus d'individus guéris de LCZ, préalablement stimulés par les pools de peptides sélectionnés (1 μ M/peptide) pendant 10 jours, ont été restimulés par les mêmes pools de peptides (1 μ M / peptide) en présence des anticorps de costimulation anti-CD49d / anti-CD28 (1 μ g/ml). Pour la détection intracellulaire d'IFN- γ (n = 21) et de GrB (n = 9), les cellules ont été traitées avec du Golgistop pendant 6 h de culture, fixées et perméabilisées. Les résultats représentent les pourcentages des populations de cellules T CD4+IFN- γ + (A) et CD4+GrB+ (B). Les barres horizontales représentent les valeurs des médianes. La significativité statistique a été attribuée à une valeur de p <0,05 (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001).

II.4.1.2. Fréquence des LT CD8+ productrices d'IFN- γ

Nous avons évalué la production d'IFN- γ par les cellules T CD8+ spécifiques des pools de peptides sélectionnés, chez des individus guéris de LCZ. Comme le montrent le **tableau 31** et la **figure 36**, la stimulation par la PMA/Iono et par le SLA s'est accompagnée d'une augmentation significative des pourcentages des populations T CD8+ productrices d'IFN- γ .

Nous avons observé une augmentation significative des pourcentages des cellules T CD8+ productrices d'IFN- γ en réponse aux pools de peptides **P8** (Médiane des % de cellules \pm IQR NS vs Stim: 2.01 \pm 1.48 vs 2.54 \pm 2.69), **P9** (2.01 \pm 1.48 vs 2.66 \pm 2.86), **P13** (2.18 \pm 0.94 vs 6.13 \pm 3.83), **P16** (2.01 \pm 1.48 vs 3.32 \pm 4.85) et **P21** (2.01 \pm 1.48 vs 4.6 \pm 7.07), ($p \leq 0.03$).

Tableau 31. Pourcentages des LT CD8+ producteurs d'IFN- γ en réponse à une stimulation par les pools de peptides, P8, P9, P13, P14, P16 et P21, chez des individus guéris de LCZ

Stimuli	Composition en peptides	CD3+ CD8+ IFN- γ +			
		Nb individus	Médiane NS \pm IQR	Médiane Stimulé \pm IQR	Valeur de p
PMA/Iono	-	9	2 \pm 1,48	19,9 \pm 35,425	0,003
SLA	-	9	2 \pm 1,48	3,28 \pm 2,04	0,02
P8	H2BII/PII/RII	9	2,01 \pm 1,48	2,54 \pm 2,69	0,01
P9	H2BI/H2BII	9	2,01 \pm 1,48	2,66 \pm 2,865	0,01
P13	H2BI/H2BII/PII	6	2,185 \pm 0,943	6,135 \pm 3,837	0,03
P14	H2BI/PII/RI	8	2,09 \pm 1,403	2,36 \pm 1,84	ns
P16	H2BI/H2BII/PI/PII	9	2,01 \pm 1,48	3,32 \pm 4,855	0,003
P21	H2BI/H2BII/PI/PII/RI/RII	9	2,01 \pm 1,48	4,6 \pm 7,075	0,01

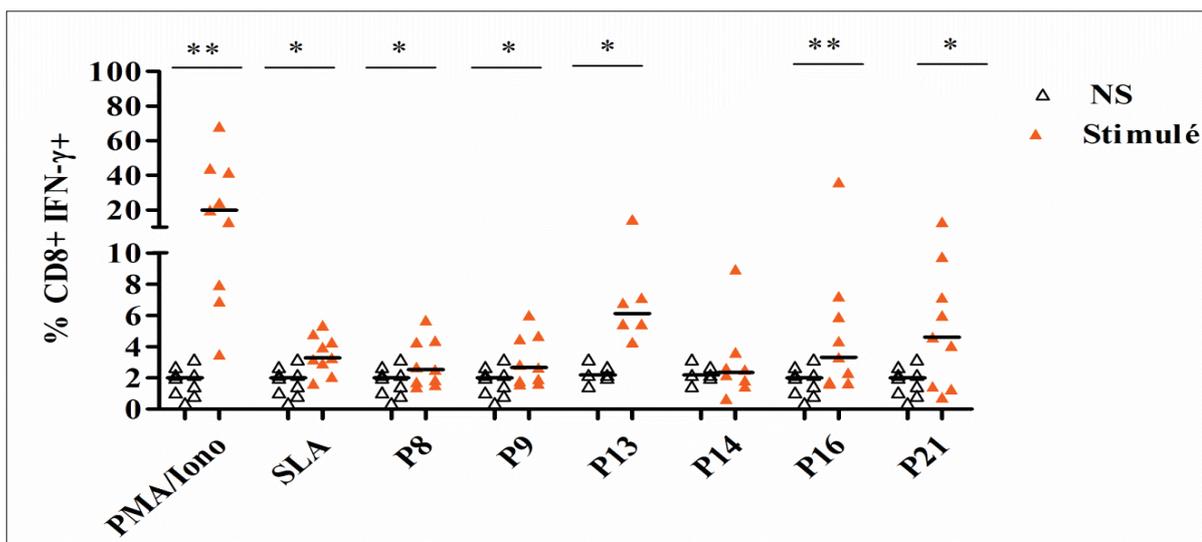


Figure 36. Pourcentages des populations LT CD8+ productrices d'IFN- γ , après stimulation par les pools P8, P9, P13, P14, P16 et P21, chez des individus guéris de LCZ (Cytométrie en flux)

Les PBMC issus d'individus guéris de LCZ ($n = 9$), préalablement stimulés par les pools de peptides sélectionnés ($1 \mu\text{M}$ / peptide) pendant 10 jours, ont été restimulés par les mêmes pools de peptides ($1 \mu\text{M}$ / peptide) en présence des anticorps de costimulation anti-CD49d/anti-CD28. Pour la détection intracellulaire d'IFN- γ , les cellules ont été traitées avec le Golgistop pendant 6 h de culture, fixées et perméabilisées. Les barres horizontales représentent les valeurs des médianes des pourcentages de TC8+ IFN- γ +. La significativité statistique a été attribuée à une valeur de $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

II.4.1.3. Caractérisation de la réponse lymphocytaire T CD4+ polyfonctionnelle

Il a été démontré que la qualité de la réponse immunitaire, définie par la production simultanée de l'IFN- γ , du TNF- α et de l'IL-2 par les LT CD4+, pourrait constituer un corrélât de protection contre l'infection par *Leishmania* (Darrah *et al.*, 2007).

Afin d'évaluer l'activation de cette population de LT polyfonctionnels, par les pools de peptides, nous avons effectué un marquage membranaire (CD3, CD4) et intracellulaire (IFN- γ , TNF- α et IL-2) des PBMCs issus d'individus guéris, après stimulation par la PMA/Iono, le SLA ou les pools de peptides P8, P9, P13, P14, P16 et P21.

Les cellules T ont été identifiées, au sein des lymphocytes totaux, par l'expression du marqueur CD3 et les cellules T CD4+ ont été identifiées au sein de la population T, par l'expression des marqueurs CD3 et CD4. Nous avons commencé par identifier les cellules sécrétrices d'une seule cytokine (IFN- γ , IL-2 ou TNF- α), parmi la population T CD4+ (Figure 37). Pour l'identification des T CD4+ monofonctionnelles (productrices d'une seule cytokine), bifonctionnelles (productrices de deux cytokines) ou polyfonctionnelles (productrices de trois cytokines), nous avons utilisé la méthode de « boolean gating », stratégie permettant la sélection des populations de cellules sur la base de la logique «ET» et

«NON». Cela nous permet d'identifier des populations de cellules produisant les cytokines 'a' et 'b', mais pas 'c' et ainsi de suite.

7 populations cellulaires distinctes productrices de cytokines ont été déterminées, **3 cytokines** : IFN- γ +IL-2+TNF- α + ; **2 cytokines** : IFN- γ +IL-2-TNF- α +, IFN- γ -IL-2+TNF- α +, IFN- γ -IL-2+TNF- α + ; **1 cytokine** : IFN- γ +IL-2-TNF- α -, IFN- γ -IL-2+TNF- α -, IFN- γ -IL-2-TNF- α + (Figure 37).

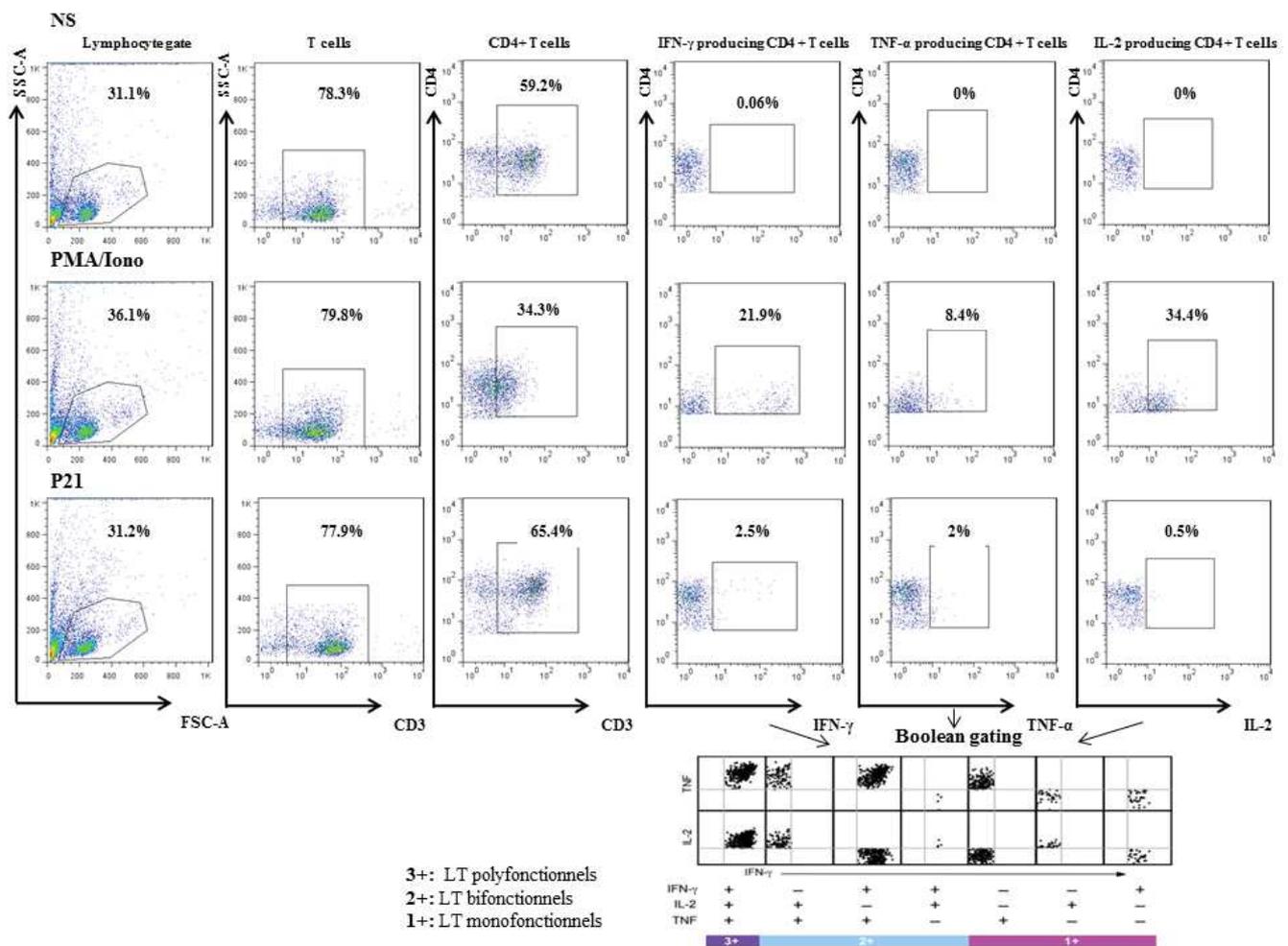


Figure 37. Caractérisation de la polyfonctionnalité des populations LT CD4+ par cytométrie en flux

La stimulation par la PMA a induit une augmentation significative des pourcentages des cellules T CD4+ polyfonctionnelles sécrétrices d'IFN- γ , d'IL-2 et de TNF- α , (Tableau 32, Figure 38). Cependant la stimulation par le SLA et les pools de peptides n'a pas induit une augmentation de cette population chez les individus guéris.

Une augmentation significative des pourcentages des cellules T bifonctionnelles (IFN- γ +TNF- α + et IL-2+TNF- α +) et monofonctionnelles (IFN- γ + et TNF- α +), a été détectée en réponse aux pools de peptides P13, P14 et P21 (p<0.04) (Tableau 32, Figure 38).

La stimulation par le P9 a induit une augmentation significative des pourcentages de cellules T CD4+ bifonctionnelles IFN- γ + /TNF- α + et monofonctionnelles IFN- γ + et TNF- α + (**Figure 38**). Cependant, nous n'avons détecté aucun changement dans les pourcentages de ces populations en réponse au P16, probablement en raison du faible nombre d'individus analysés. P21 était le seul pool à induire une augmentation significative de la population LT CD4+ sécrétrice d'IL2.

Tableau 32. Pourcentages des LT CD4+ polyfonctionnels, en réponse à une stimulation par les pools de peptides P9, P13, P14 et P21, chez des individus guéris de LCZ

Phénotype des TCD4+	PMA				SLA				P9			
	Nb d'individus	NS±IQR	Stim±IQR	Valeur de p	Nb d'individus	NS±IQR	Stim±IQR	Valeur de p	Nb d'individus	NS±IQR	Stim±IQR	Valeur de p
IFN-g+ TNF-a+ IL-2+	20	0±0	0,866±1,8347	0,0009	20				7			
IFN-g+ TNF-a+ IL-2-		0,0155±0,0685	1,139±1,64	0,0001		0,023±0,09325	0,0535±0,2755	0,02		0,049±0,07	0,293±0,806	0,03
IFN-g+ TNF-a- IL-2+		0±0	2,09±4,3712	0,0001								
IFN-g+ TNF-a- IL-2-		0±0	1,305±2,7722	0,0004		0±0	0,0145±0,1333	0,002				
IFN-g- TNF-a+ IL-2+		0,034±0,4755	4,23±10,247	0,0003		0,0615±0,8735	0,4085±2,935	0,0001		0,074±0,198	1,12±1,18	0,04
IFN-g- TNF-a+ IL-2-		0,128±0,15675	1,116±1,367	0,0001		0,1575±0,251	0,3955±1,408	0,01		0,148±0,234	3,54±5,854	0,01
IFN-g- TNF-a- IL-2+		0,039±0,0725	3,66±14,3585	0,0001								
Phénotype des TCD4+	P13				P14				P21			
	Nb d'individus	NS±IQR	Stim±IQR	Valeur de p	Nb d'individus	NS±IQR	Stim±IQR	Valeur de p	Nb d'individus	NS±IQR	Stim±IQR	Valeur de p
IFN-g+ TNF-a+ IL-2+	15				8				15			
IFN-g+ TNF-a+ IL-2-		0±0,049	0,338±0,718	0,0017		0±0,03175	0,0885±0,1103	0,02		0±0,049	0,395±0,585	0,0001
IFN-g+ TNF-a- IL-2+												
IFN-g+ TNF-a- IL-2-		0±0	0,063±0,342	0,0039		0±0	0,0825±0,2248	0,02		0±0	0,168±0,259	0,0002
IFN-g- TNF-a+ IL-2+		0±0,074	0,148±0,566	0,0005		0±0	0,0825±0,2543	0,02		0±0,074	0,16±0,304	0,0001
IFN-g- TNF-a+ IL-2-		0,122±0,148	0,841±1,189	0,0004		0,0445±0,1073	0,1615±0,4018	0,04		0,122±0,148	0,641±3,625	< 0,0001
IFN-g- TNF-a- IL-2+										0,041±0,074	0,101±0,177	0,0419

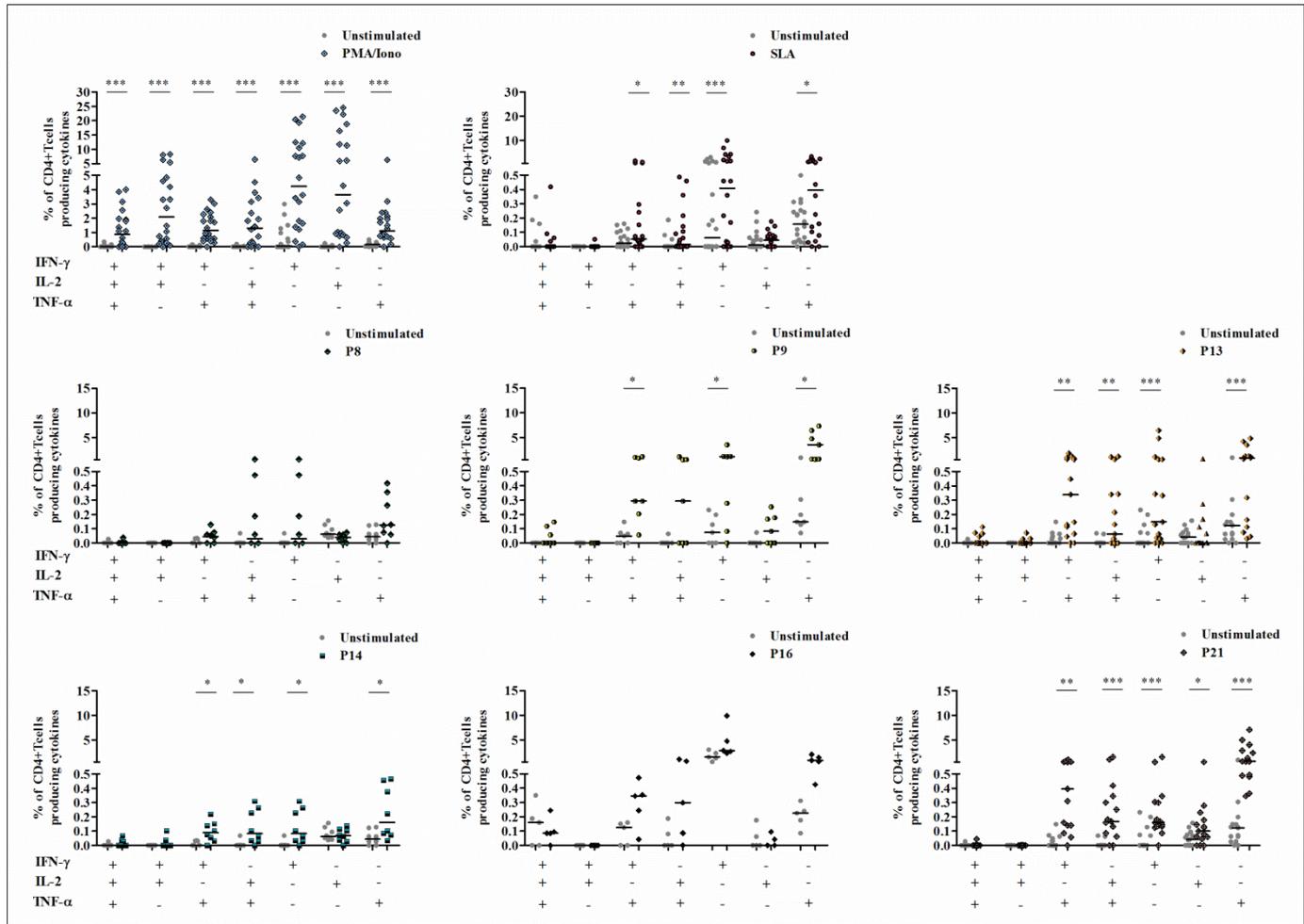


Figure 38. Pourcentages des LT CD4+ polyfonctionnels, après stimulation par les pools P8, P9, P13, P14, P16 et P21, chez des individus guéris de LCZ (cytométrie en flux)

Les PBMC issus d'individus guéris de LC (5 à 15 individus), préalablement stimulés par les pools de peptides sélectionnés (1 μ M / peptide) pendant 10 jours, ont été re-stimulés pendant une nuit avec les mêmes pools de peptides (1 μ M / peptide) en présence des anticorps de costimulation anti-CD49d /anti-CD28 (1 μ g / ml). Pour la détection intracellulaire des cytokines, les cellules ont été traitées avec du Golgistop pendant 6 h de culture, fixées et perméabilisées. Les données ont été analysées par le logiciel FlowJo. La méthode « Boolean gating » a été utilisée pour identifier les cellules monofonctionnelles, bifonctionnelles et multifonctionnelles. La fréquence des cellules T CD4+ exprimant chacune des sept combinaisons possibles d'IFN- γ , d'IL-2 et de TNF- α , a été déterminée. Les barres horizontales représentent les valeurs médianes. La significativité statistique a été attribuée à une valeur de $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

II.4.2. Caractérisation de la réponse T mémoire centrale (TCM) et T mémoire effectrice (TEM)

Il est à rappeler que les cellules T mémoires circulantes sont divisées en cellules T mémoires centrales (TCM) et cellules T mémoires effectrices (TEM), sur la base de leurs fonctions effectrices, leur capacité proliférative, leur potentiel migratoire et l'expression de certains marqueurs de surface (Sallusto *et al.*, 1999; Farber *et al.*, 2014).

Nous avons utilisé les marqueurs CD45RO et CCR7 (récepteur pour les chimiokines) pour les distinguer. Les TCM et les TEM expriment le CD45RO, mais seuls les TCM expriment le CCR7.

Nous avons réalisé un marquage membranaire (CD3, CD4, CD8, CD45RO et CCR7) des PBMC issus d'individus guéris de LCZ, après leur stimulation par le SLA (contrôle positif) ou les pools de peptides. Le nombre de cellules pour certains individus a été un facteur limitant, ce qui explique la variabilité dans le nombre d'individus selon les conditions de stimulation.

Le pourcentage des populations lymphocytaires T CD4⁺ et T CD8⁺ mémoires (TCM et TEM) a été déterminé, respectivement, parmi les populations CD3⁺CD4⁺ et CD3⁺CD8⁺ (Figure 39 et 40, Tableau 33 et 34).

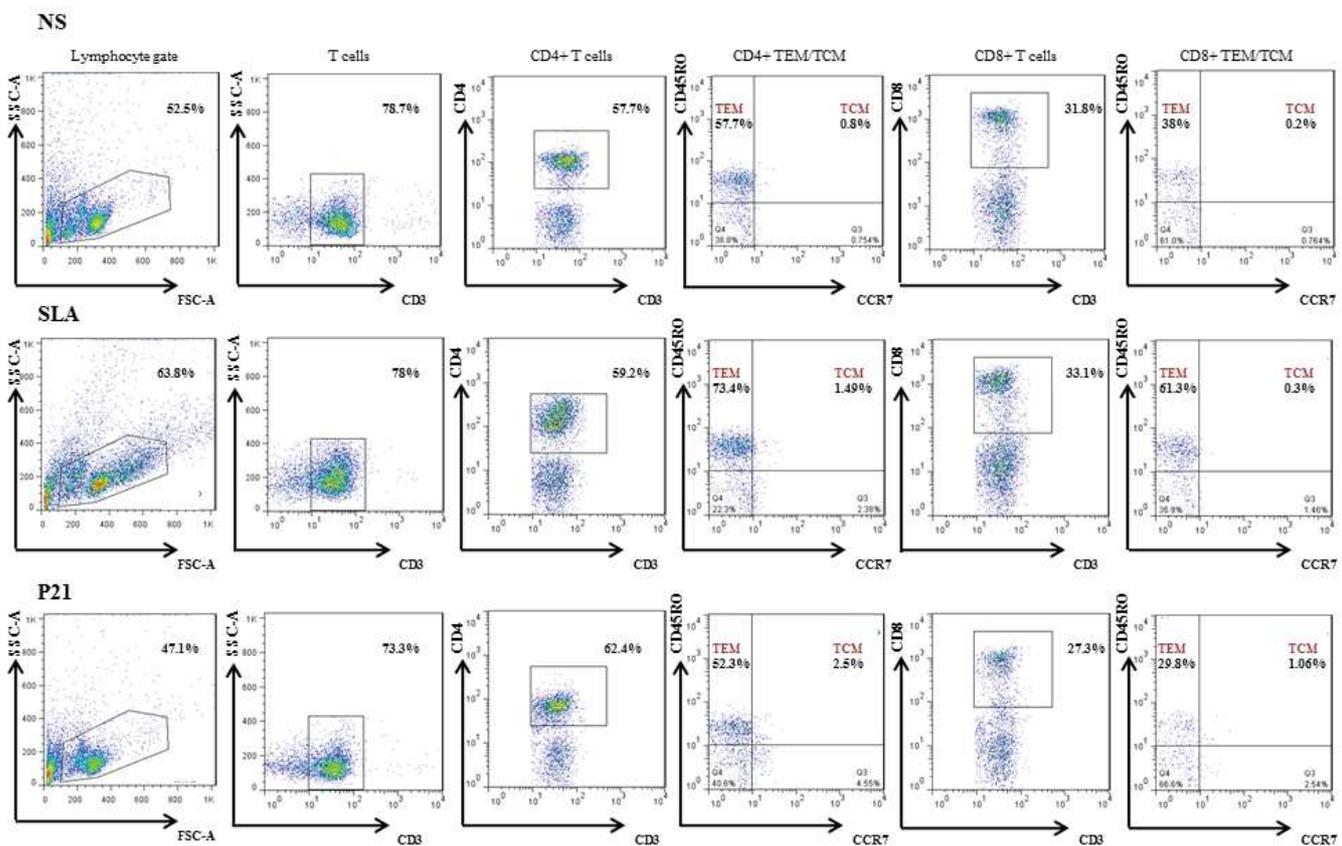


Figure 39. Schéma montrant l'analyse effectuée par cytométrie de flux, des cellules TCM et TEM, après stimulation par le SLA et le P21 chez un individu guéri de LCZ

Nous avons montré des augmentations significatives des pourcentages de cellules TCM et TEM, parmi les populations T CD3⁺CD4⁺ et T CD3⁺CD8⁺, dans les cultures stimulées par le SLA (Tableau 33 et 34, Figure 40).

Une augmentation significative du pourcentage de cellules TCM CD4+, a été observée dans les cultures stimulées par le **P8** (Médiane des % de cellules \pm IQR dans les cultures NS vs Stim: $0,34\pm 0,15$ vs $1,13\pm 1,36$), **P13** ($0,4 \pm 0,8$ vs $2,07\pm 2,08$), **P14** ($0,34\pm 0,15$ vs $2,01\pm 0,94$) et **P21** ($0,4 \pm 0,8$ vs $2,96\pm 1,22$), ($p < 0,008$) (**Tableau 33, Figure 40 A**).

Cependant, aucune augmentation significative de la fréquence des TCM CD4+ n'a été détectée en réponse aux pools P9 et P16 (**Tableau 33, Figure 40 A**).

Par ailleurs, les pools de peptides analysés n'ont pas induit une augmentation de la fréquence des pourcentages des cellules TEM CD4+ (**Tableau 34, Figure 40 B**).

Concernant l'induction des T CD8+ mémoires par les pools de peptides, nous avons montré des augmentations significatives des pourcentages des TCM CD8+ dans les cultures stimulées par **P8** ($0,06\pm 0,06$ vs $0,31\pm 0,36$), **P13** ($0,06\pm 0,23$ vs $0,51\pm 1,34$), **P14** ($0,06\pm 0,06$ vs $0,36\pm 0,47$) et **P21** ($0,06\pm 0,23$ vs $0,94\pm 1,31$), ($p < 0,04$) (**Tableau 34, Figure 40 C**).

Tableau 33. Pourcentages des populations TCM et TEM CD4+, en réponse à une stimulation par les pools P8, P9, P13, P14, P16 et P21, chez des individus guéris de LCZ

Stimuli	Composition en peptides	CD3+CD4+CD45RO+CCR7+ (TCM)				CD3+CD4+CD45RO+CCR7- (TEM)			
		Nb individus	Médiane NS \pm IQR	Médiane Stimulé \pm IQR	Valeur de p	Nb individus	Médiane NS \pm IQR	Médiane Stimulé \pm IQR	Valeur de p
SLA	-	20	0,37 \pm 0,92	0,8 \pm 2	0,002	20	44,95 \pm 24,57	59,85 \pm 15,73	0,0002
P8	H2BII/PII/RII	8	0,34 \pm 0,15	1,13 \pm 1,36	0,008	8	35,05 \pm 16,92	34,4 \pm 13,7	ns
P9	H2BI/H2BII	7	1,94 \pm 1,06	2,44 \pm 1,81	ns	7	56,9 \pm 15,6	53,7 \pm 15,7	ns
P13	H2BI/H2BII/PII	11	0,41 \pm 0,8	2,07 \pm 2,8	0,002	11	41,3 \pm 30,2	44,2 \pm 21,1	ns
P14	H2BI/PII/RI	8	0,34 \pm 0,15	2,01 \pm 0,94	0,007	8	35,05 \pm 16,92	29,45 \pm 20,52	ns
P16	H2BI/H2BII/PI/ PII	5	0,25 \pm 0,24	0,4 \pm 0,65	ns	5	42,2 \pm 12,8	47,3 \pm 28,25	ns
P21	H2BI/H2BII/PI/ PII/RI/RII	11	0,41 \pm 0,8	2,34 \pm 1,4	0,001	11	41,3 \pm 30,2	36,2 \pm 23,4	ns

Tableau 34. Pourcentages des populations TCM et TEM CD8+, en réponse à une stimulation par les pools P8, P9, P13, P14, P16 et P21, chez des individus guéris de LCZ

Stimuli	Composition en peptides	CD3+CD8+CD45RO+CCR7+ (TCM)				CD3+CD8+CD45RO+CCR7- (TEM)			
		Nb individus	Médiane NS \pm IQR	Médiane Stimulé \pm IQR	Valeur de p	Nb individus	Médiane NS \pm IQR	Médiane Stimulé \pm IQR	Valeur de p
SLA	-	20	0,05 \pm 0,24	0,25 \pm 0,83	0,002	20	28,9 \pm 23	43,15 \pm 28,32	0,0003
P8	H2BII/PII/RII	8	0,06 \pm 0,06	0,31 \pm 0,36	0,04	8	26,95 \pm 23,97	25,35 \pm 18,32	ns
P9	H2BI/H2BII	7	0,53 \pm 0,51	0,85 \pm 1,2	ns	7	44,5 \pm 22,4	35,7 \pm 23,7	ns
P13	H2BI/H2BII/PII	11	0,06 \pm 0,23	0,51 \pm 1,34	0,03	11	35,3 \pm 23,2	34,3 \pm 18	ns
P14	H2BI/PII/RI	8	0,06 \pm 0,06	0,36 \pm 0,47	0,03	8	26,95 \pm 23,97	22,3 \pm 9,35	ns
P16	H2BI/H2BII/PI/ PII	5	0,049 \pm 0,23	0,086 \pm 0,46	ns	5	20,5 \pm 11,45	29,3 \pm 21,7	ns
P21	H2BI/H2BII/PI/ PII/RI/RII	11	0,06 \pm 0,23	0,94 \pm 1,31	0,001	11	35,3 \pm 23,2	28 \pm 16	ns

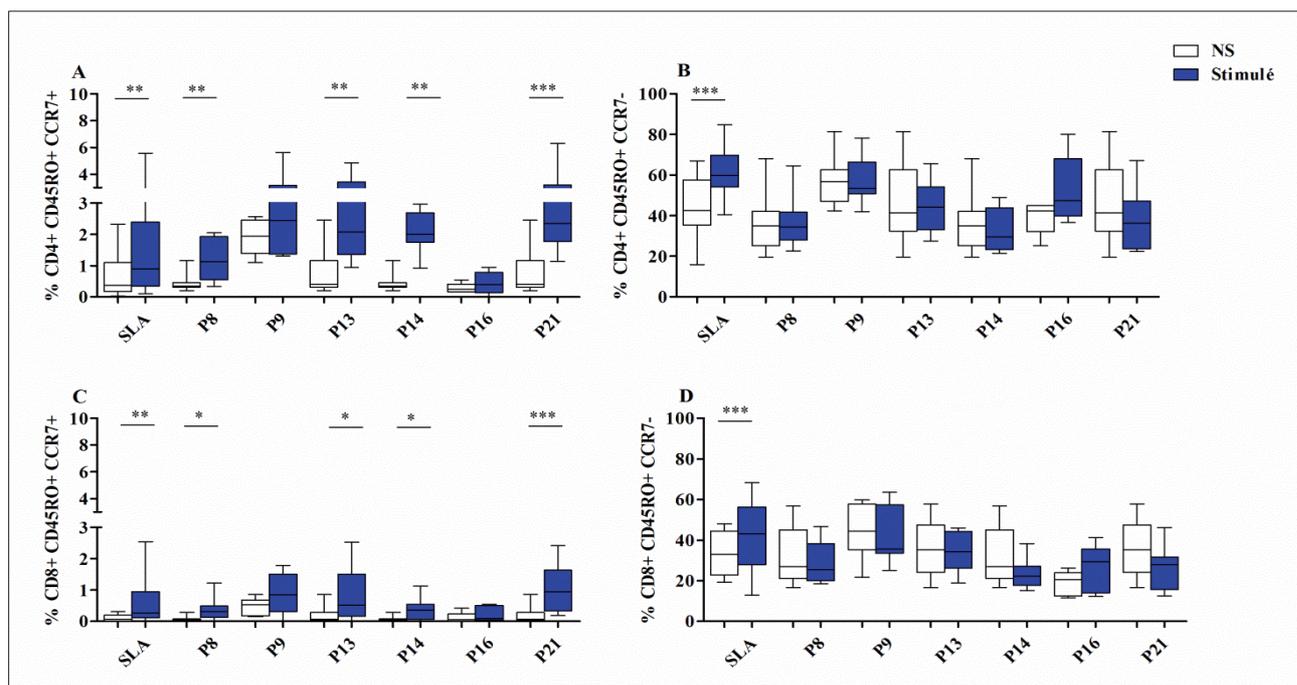


Figure 40. Pourcentages des populations TCM (A et C) et TEM (B et D), parmi les cellules T CD4+ (A et B) et T CD8+ (C et D), après stimulation par les pools, P8, P9, P13, P14, P16 et P21, chez des individus guéris de LCZ (cytométrie en flux)

Les PBMC issus des individus guéris de LC (n = 11), préalablement stimulés par les pools de peptides sélectionnés (1 μ M/peptide) pendant 10 jours, ont été re-stimulés pendant une nuit par les mêmes pools de peptides (1 μ M/peptide) en présence des anticorps anti-CD49d/anti-CD28 (1 μ g/ml). Les pourcentages des TCM CD4+CD45RO+CCR7+ (A) et CD8+CD45RO+ CCR7+ (C) et des TEM CD4+ CD45RO+CCR7- (B) et CD8+CD45RO+CCR7- (D) ont été analysés par le logiciel FlowJo. La significativité statistique a été attribuée à une valeur de $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

III. Evaluation de la fréquence des cellules T spécifiques des peptides multi-épitopiques, préexistantes dans le répertoire T des individus sains non infectés par *Leishmania* (N-Fr).

Cette partie a été réalisée au laboratoire UMR-177 INTERTRYP sous la direction du Pr. Jean Loup Lemesre et du Dr Rachel Bras-Gonçalves, à l'IRD et a eu pour objectif d'évaluer l'immunogénicité des peptides multi-épitopiques et leur capacité à activer les LT naïfs chez des sujets sains non infectés par *Leishmania*.

L'activation des LT naïfs comme moyen de prédiction de l'immunogénicité des peptides vient d'études montrant que l'amplitude de la réponse T spécifique est corrélée en partie avec la fréquence des cellules T naïves préexistantes et spécifiques des épitopes dans le répertoire T (Moon *et al.*, 2007; Castelli *et al.*, 2013).

Afin de prédire l'immunogénicité de nos peptides multi-épitopiques chez les individus naïfs, des tests d'activation des LT naïfs, *in vitro* (priming *in vitro*) ont été réalisés. Le priming est

le premier contact des cellules T naïves avec l'Ag, qui mène à l'activation, l'expansion et la différenciation des cellules T naïves en cellules effectrices (Mempel *et al.*, 2004).

Il est à souligner que, cette partie du travail est considérée comme étant préliminaire, en raison de la lourdeur des protocoles expérimentaux et des difficultés d'optimisation que nous avons rencontré.

Nous avons analysé l'activation des LT CD8⁺ par des CD pulsés avec les peptides multi-épitopiques, chez 3 individus naïfs. L'activation des LT CD4⁺ a également été envisagée mais n'a pas pu être réalisée au cours de cette thèse.

Par ailleurs, nous avons utilisé le pool complet contenant le peptide RABI.1 (P21^R) pour la stimulation des LT CD8⁺ puisque les résultats ayant montré la toxicité de ce peptide ont été obtenus après nos expériences. Des expériences de stimulation par le P21 (sans le RABI.1) sont actuellement en cours à l'IRD.

Des LT CD8⁺ naïfs hautement purifiés ont été stimulées par des CD matures pulsées avec les peptides multi-épitopiques, en présence des cytokines IL-21, IL-15 et IL-7. Cette méthode appelée 'Antigen-specific activation and Cytokine facilitated Expansion of humans CD8 T cells (ACE-CD8), a été développée par Wolf et al (Wolf *et al.*, 2014).

Ce protocole est effectué en 2 étapes:

- 1- La génération des CD immatures à partir des monocytes mis en culture en présence de GM-CSF et d'IL 4 (cytokines de différenciation), maturées en présence de LPS et l'IFN- γ (facteurs de maturation) et pulsées avec les peptides multi-épitopiques.
- 2- La purification des LT CD8⁺ naïves et leur stimulation par les CD pulsées avec les peptides, en présence de l'IL-21, IL-7 et IL-15, cytokines impliquées dans le maintien de la capacité proliférative des cellules T et dans l'amplification de la réponse immunitaire spécifique.

III.1. Evaluation des marqueurs de surface sur des CD générées à partir des monocytes.

Les CD immatures ont été générées, *in vitro*, à partir des monocytes, soit après adhérence au plastique, soit après isolement de ces derniers à l'aide du kit Miltenyi.

Les monocytes sont caractérisés par l'expression du marqueur CD14 alors que les CD immatures et matures en sont dépourvus (Collin *et al.*, 2013). Les CD sont caractérisées par une expression des molécules de costimulation CD86 et HLA-DR (Tomiyama *et al.*, 2004).

La maturation des CD s'accompagne d'une augmentation de l'expression des marqueurs CD86 et HLA-DR (Tomiyama *et al.*, 2004). Les CD immatures sont spécialisées dans la

capture de l'Ag et dans son apprêtement, alors que les CD matures perdent cette fonction et deviennent spécialisées dans la sensibilisation et l'activation des LT naïfs.

Afin de mettre en évidence la génération et la maturation des CD, l'expression des marqueurs CD14, CD86 et HLA-DR, a été évaluée. Un marquage membranaire a aussi été effectué sur les cellules adhérentes au plastique et sur les monocytes, avant leur différenciation en CD.

Une expression de CD14 sur les cellules adhérentes a été observée avant l'ajout des cytokines de différenciation (**Figure 41 A**). Une perte de l'expression de ce marqueur a été observée après 2 jours de cultures en présence de GM-CSF et IL-4 (CD immatures) (**Figure 41 B**). Un pourcentage élevé des cellules non adhérentes (contaminantes) a été détecté, ce qui nous a incité à augmenter les lavages dans les expériences suivantes.

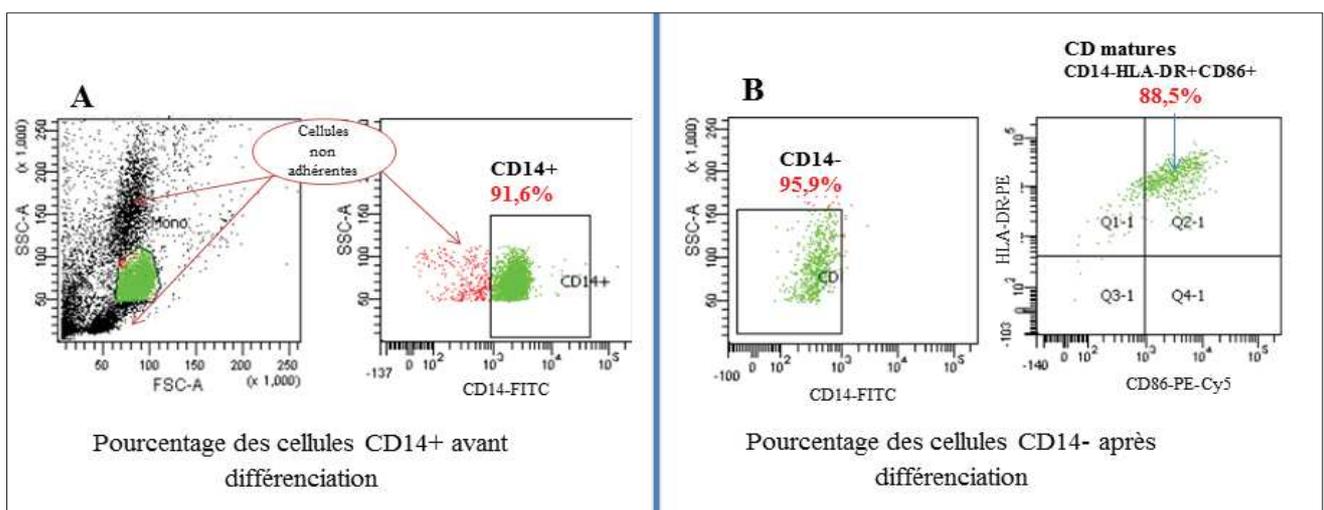


Figure 41. Expression des marqueurs CD14, CD86 et HLA-DR sur les CD générées à partir des cellules adhérentes au plastique

Une expression de CD14 a aussi été observée sur les monocytes isolés par le kit Miltenyi, à partir des PBMC (**Figure 42 B**). Le pourcentage des cellules exprimant le CD14+ au sein de la population des monocytes était de 91,4%. 92,4% des monocytes CD14+ exprimaient les molécules HLA-DR. L'expression de CD86 n'a pas été observée dans la population CD14+ après la purification (**Figure 42 C**). Cependant, le pourcentage des monocytes parmi les « all Events » était égal à 29,3%.

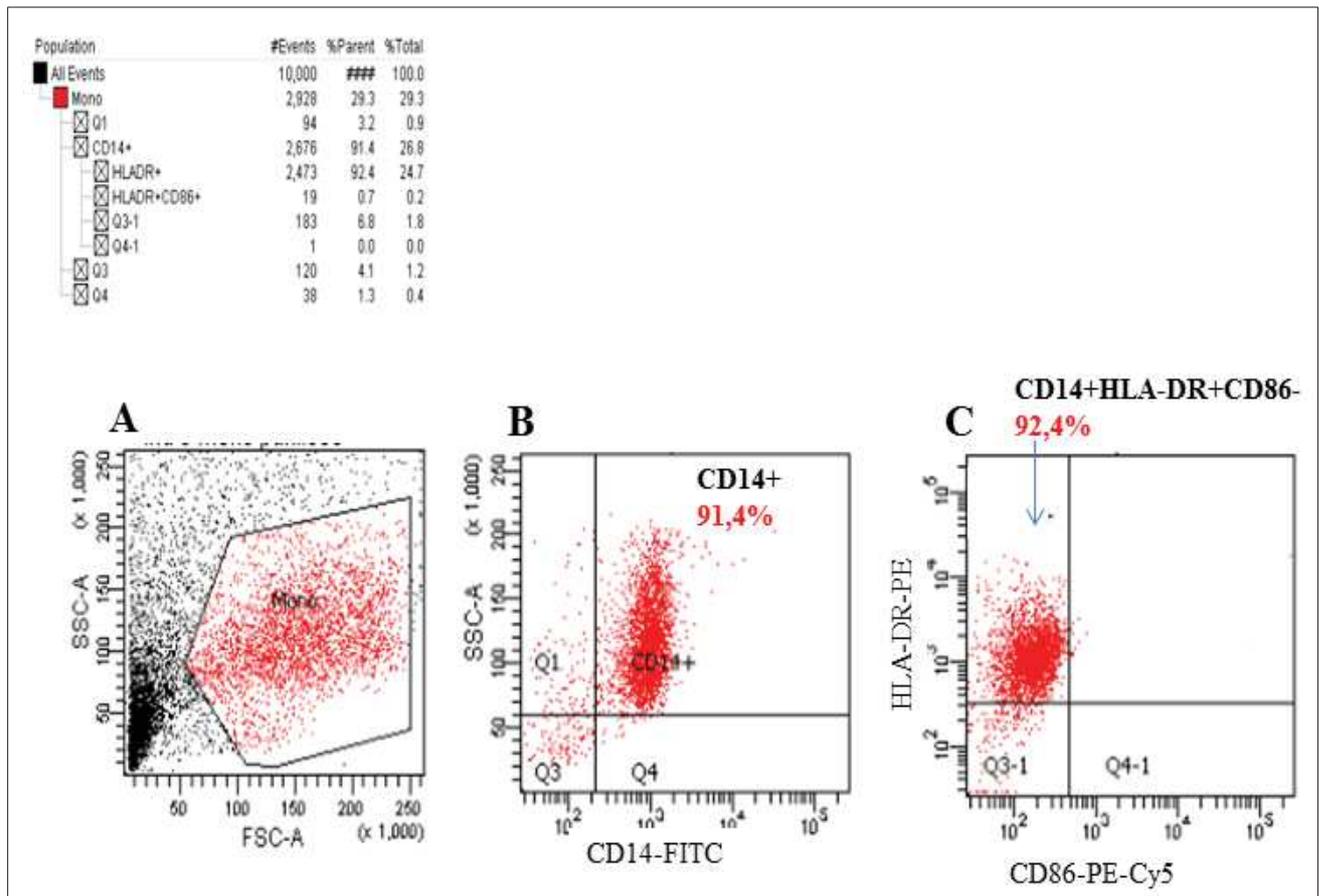


Figure 42. Pourcentages des cellules CD14+ et des cellules HLADR+CD86- après isolement des monocytes par le kit Miltenyi

Après la différenciation des monocytes en CD immatures (CD14-), une augmentation de la population HLA-DR+ CD86+ a été observée parmi la population CD14- (% des cellules CD14- HLA-DR+ CD86- : 15.1%) (**Figure 43 A**). Après maturation des CD immatures (en présence de LPS et d'IFN- γ), une augmentation des molécules HLA-DR et CD86 a été détectée à la surface des cellules CD14- (% des cellules CD14- HLA-DR+ CD86+ : 81.9%) (**Figure 43 B**). Une augmentation du pourcentage de cette population cellulaire a aussi été observé après maturation et incubation avec les pools de peptides CEF et P21^R (72,2 et 62,5%, respectivement) (**Figure 43 C et D**).

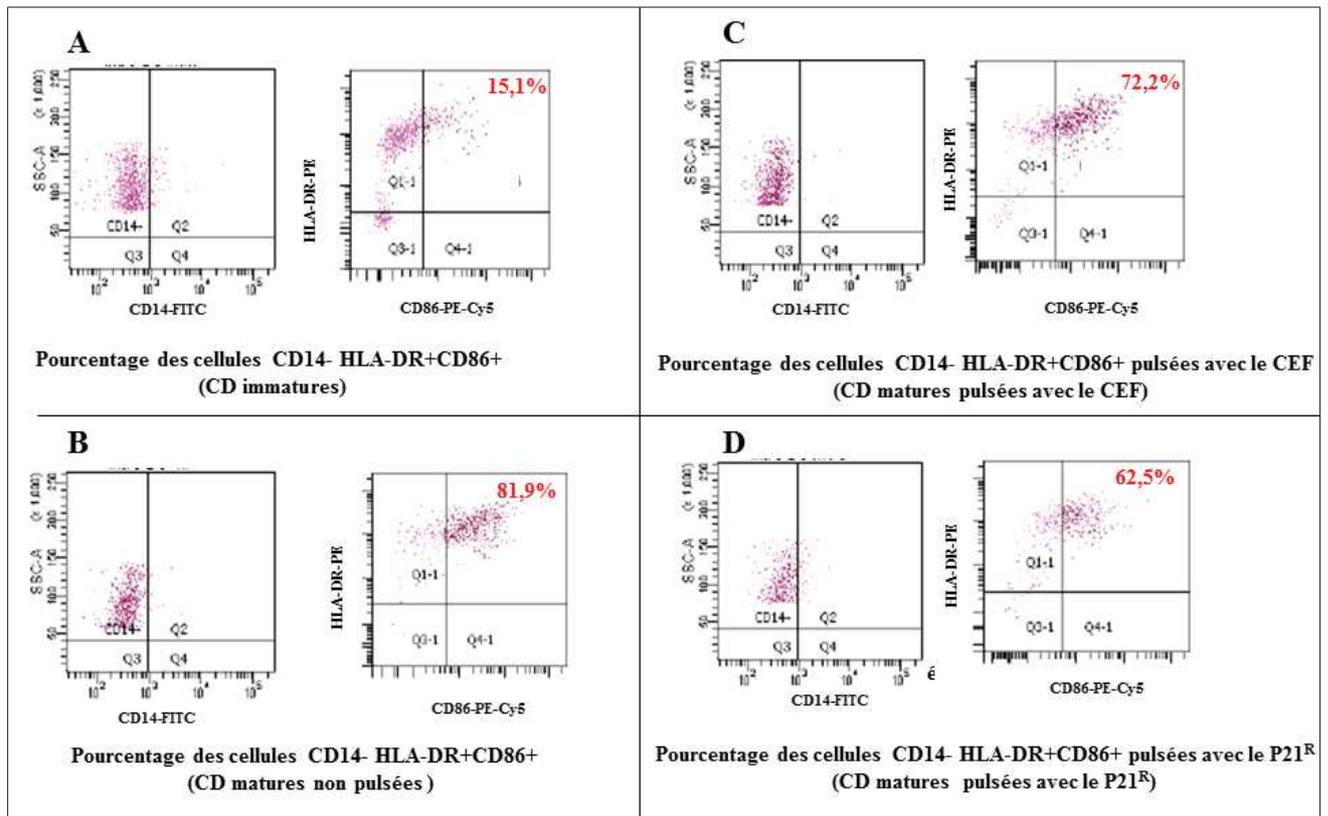


Figure 43. Analyse des marqueurs CD14, HLA-DR et CD86 sur les CD immatures, matures et pulsées par les pools de peptides CEF et P21^R.

III.2. Evaluation des marqueurs de surface des cellules T CD8+ naïves purifiées

Les LT CD8+ naïves ont été purifiées à partir des PBMC issus du sang périphérique chez 3 individus sains (N-Fr), par sélection positive en utilisant le kit « Naïve CD8 T cell isolation Kit miltenyi».

Le rendement en cellules T CD8+ naïves, a été évalué par le marquage membranaire de ces dernières, avant et après purification, avec des Ac anti-CD3, anti-CD8, anti-CD62L, anti-CCR7 et anti-CD45RO (**Figure 44**).

14.4% des PBMC étaient des cellules T CD3+CD8+ (T CD8 totales), parmi lesquelles, 66.1 % étaient des T CD8+ naïves (CD3+CD8+CCR7+CD62L+). 95.3% des cellules T CD8+ exprimaient ces marqueurs, après purification.

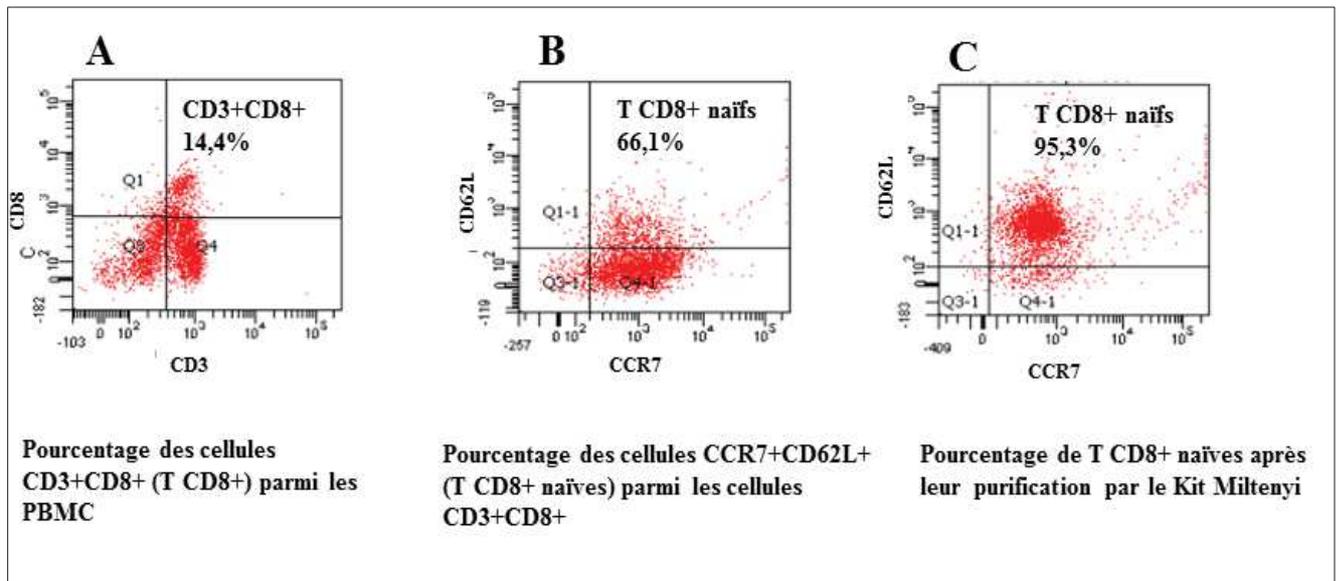


Figure 44. Pourcentage de LT CD8+ naïves avant et après purification

III.3. Analyse des marqueurs membranaires des cellules T CD8+, après coculture avec les CD matures pulsées avec le P21^R (Cytométrie en flux)

Les cellules T CD8+ naïves humaines constituent généralement entre 3 à 6% des PBMC et sont caractérisées par une forte expression des marqueurs CD45RA, CD62L, CD27, CCR7 et CD11a en plus de l'expression des marqueurs CD3 et CD8. Les LT CD8+ mémoires ou activées expriment le marqueur CD45RO. Il a été rapporté que les cellules T naïves stimulées par des CD pulsées avec des peptides, avaient un phénotype caractéristique des cellules effectrices/mémoires (Wolf et al., 2014). Elles expriment à leur surface le marqueur CD45RO (marqueur caractéristique des T mémoires), tout en maintenant un certain niveau d'expression du marqueur CD45RA (marqueur caractéristique des T naïves). Les marqueurs CD62L et CCR7 diminuent au fur et à mesure que la cellule prolifère (Wolf et al., 2014).

Un marquage membranaire (CD3, CD8, CD45RO, CD62L et CCR7) a été effectué sur les cellules T CD8+, chez 3 individus, après leur coculture avec des CD pulsées avec les pools de peptides CEF ou P21^R. Une analyse par cytométrie en flux a été effectuée.

Le **Tableau 35**, résume la variation de l'expression des différents marqueurs au sein de la population T CD8+ initialement naïve, après leur coculture avec des CD pulsées avec les peptides.

Tableau 35. Variation de l'expression des différents marqueurs sur les cellules T CD8+ naïves après leur coculture avec des CD pulsées avec les pools de peptides CEF ou P21^R

	Stimuli	%TCD8 naïfs: CD62L+CCR7+	% TCD8+ exprimant le CD45RO
N-Fr 3	TCD8+DC-(NS)	95,2	88,7
	TCD8+DC ^{CEF}	28,9	71
	TCD8+DC ^{P21R}	57,8	75,1
N-Fr 4	TCD8+DC-(NS)	89,8	38,7
	TCD8+DC ^{CEF}	93,8	37,1
	TCD8+DC ^{P21R}	95,5	23,3
N-Fr 5	TCD8+DC-(NS)	92,7	41,3
	TCD8+DC ^{CEF}	88,3	44,3
	TCD8+DC ^{P21R}	90,3	36,5

Nous avons noté une baisse des pourcentages des cellules T CD8+ naïves (CD62L+/CCR7+), après coculture avec les CD pulsées avec les peptides CEF ou P21^R (par rapport aux cocultures avec des CD non pulsées), chez 2 individus (N-Fr 3, N-Fr 5) (**Tableau 35**). Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation des % de cellules T CD8+ CD45RO+, après coculture avec les CD pulsées avec les peptides.

III.4. Analyse de la fréquence des cellules T CD8+ productrices d'IFN- γ , après coculture avec les CD matures pulsées avec le P21^R (ELISPOT).

La fréquence des T CD8+ producteurs d'IFN- γ , après coculture avec les CD pulsées avec les peptides CEF ou P21^R, a été déterminée chez 3 individus naïfs (N-Fr 3, 4 et 5) (**Figure 45**). Les cultures des T CD8+ naïves, préalablement sensibilisées par les CD pulsées avec P21^R, ont été récupérées, lavées, placées dans les plaques ELISPOT et restimulées, pendant 20h, avec les PBMC pulsés avec le P21^R. Un typage sérologique des molécules HLA-I a été réalisé chez ces individus (**Tableau 36**).

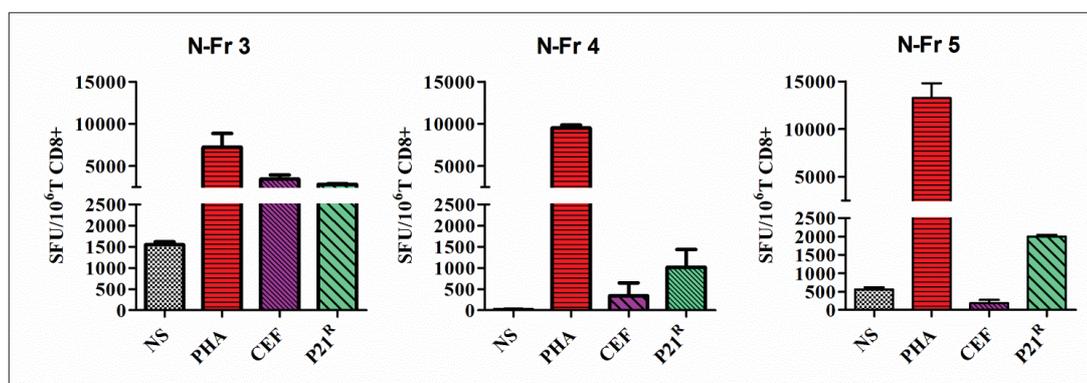


Figure 45. Fréquence de cellules T CD8+ productrices d'IFN- γ , après stimulation par les CD pulsées avec CEF ou P21^R, chez 3 individus sains

Un nombre important des cellules T CD8⁺ sécrétrices d'IFN- γ a été observé dans les cultures de LT CD8⁺ naïves stimulées par la PHA chez les 3 individus testés. Une augmentation de la fréquence de LT CD8⁺ producteurs d'IFN- γ a été détectée, après coculture avec des CD pulsées avec le pool CEF chez seulement deux individus, N-Fr 3 (moy SFU/10⁶ LTCD8⁺±DS des cultures NS vs stimulé, 1552±115,0 vs 3422±896,4) et N-Fr 4 (17,50±3.5 vs 340±438,4) (**Figure 45**). Une augmentation des LT CD8⁺ producteurs d'IFN- γ , a aussi été observée après coculture avec des CD pulsées avec le P21^R, chez les trois individus testés (N-Fr3 : 1552±115,0 vs 2842±127.9 ; N-Fr 4 : 17,50±3.5 vs 1020±586 ; N-Fr 5 : 558±92 vs 2002±68) (**Figure 45**). Il est intéressant de noter que le typage HLA a révélé que tous les individus testés exprimaient au moins un allèle HLA-I ayant une forte affinité pour les peptides au sein du P21^R (**Tableau 36**).

Tableau 36. Typage HLA

	Typage	Supertypes
N-Fr 3	A1/A10 B8/B18	A01, B08 et B44
N-Fr 4	A1/A2/ B70/B35	A01, A02, B7 et B27
N-Fr 5	A1/A2 B18/B70	A01, A02, B27 et B44

Discussion

Les leishmanioses posent un vrai problème de santé publique, au niveau mondial, avec 14 millions de personnes atteintes. Elles font partie des maladies infectieuses négligées qui affectent les populations les plus pauvres et dont la prise en charge reste compliquée et inadaptée au contexte socio-économique de nombreux pays (**Burza et al., 2018**).

Au cours des dernières décennies, la maladie n'a cessé de se répandre pour atteindre des zones non endémiques (**Global Burden of Disease Study, 2015**).

Plusieurs stratégies de lutte ont été mises en place afin de limiter la propagation du parasite impliquant, le diagnostic précoce et le traitement efficace des cas, la lutte anti-vectorielle, la gestion de l'environnement et le contrôle des réservoirs domestiques (**Desjeux, 2004**). Toutefois, aucune de ces stratégies n'a été en mesure de réduire efficacement le nombre de cas infectés, par conséquent l'élaboration de nouvelles stratégies de prévention de la maladie est devenue une priorité absolue (**Working Group on Research Priorities for Development of Leishmaniasis et al., 2011**). La possibilité de contrôler les leishmanioses par la vaccination, est suggérée par le fait que, dans la plupart des cas, la guérison des individus infectés par le parasite *Leishmania* s'accompagne de la mise en place d'un état de résistance à une seconde infection. À ce jour et malgré de nombreuses recherches, aucun vaccin contre les leishmanioses humaines n'a pu être mis au point.

Le développement d'un vaccin efficace se heurte à plusieurs difficultés parmi lesquelles, la variabilité des réponses immunitaires induite par les différentes espèces de *Leishmania*, l'absence d'un modèle animal adéquat reproduisant *in vivo* tous les aspects de la leishmaniose humaine et l'incapacité à définir des corrélats de protection précis. Un vaccin idéal contre les leishmanioses devrait regrouper plusieurs caractéristiques indispensables telles que la capacité à induire une réponse immunitaire à médiation cellulaire persistante et protectrice contre les différentes espèces de *Leishmania*, avoir une bonne sécurité d'emploi et une production à faible coût.

Les premiers essais de vaccination ont été réalisés avec des vaccins de première génération incluant les parasites atténués ou tués. Bien que ces vaccins offrent un vaste répertoire d'antigènes parasitaires favorisant une protection significative contre l'infection, ils présentent un risque de réversion de souches atténuées vers des formes virulentes. Les vaccins de seconde génération, constitués de protéines parasitaires recombinantes ou natives, de parasites génétiquement modifiés ou encore de peptides, sont actuellement les plus utilisés, en raison de leur capacité à stimuler une réponse immunitaire spécifique. Cependant, les essais cliniques, chez l'homme, ne sont décrits que pour très peu d'entre eux. Le candidat vaccin Leish-111f ou LEISH-F1, est le seul pour lequel des essais cliniques de phase II, ont été rapportés

(Llanos-Cuentas *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2010; Chakravarty *et al.*, 2011; Gillespie *et al.*, 2016). Il s'agit d'une protéine de fusion constituée de trois molécules de *Leishmania*: TSA (*L. major* homologue of eukaryotic thiol-specific antioxydant), LmSTI1 (*L. major* stress-inducible protein-1) et LeIF (*L. braziliensis* elongation and initiation factor). Il a été démontré que ce candidat vaccin, formulé avec l'adjuvant MPL-SE, pouvait traiter de façon efficace des patients atteints de LC ou de LMC (Llanos-Cuentas *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2010; Chakravarty *et al.*, 2011).

Les vaccins à base de peptides constituent une alternative très intéressante aux protéines recombinantes et leur potentiel immunogène a été rapporté au cours d'études précliniques et cliniques pour le traitement et la protection contre des maladies virales, parasitaires et le cancer (Purcell *et al.*, 2007). Cette approche vaccinale basée sur la vaccinologie inverse, utilise des outils de la bio-informatique pour identifier, au sein de séquences protéiques du pathogène, des épitopes potentiellement immunogènes. Les vaccins peptidiques sont donc constitués de fragments peptidiques de petite taille, potentiellement capables d'induire une réponse immunitaire adéquate et spécifique contre le pathogène, ce qui pourrait être associé à certains avantages comme la facilité de production, la stabilité et la sécurité d'emploi. Cependant, l'un des principaux inconvénients des vaccins peptidiques réside dans le fait que ces derniers peuvent être faiblement immunogènes à cause de leur petite taille. L'utilisation de combinaisons peptidiques pour générer des réponses immunes plus importantes ainsi que l'utilisation d'adjuvants peuvent contourner ces problèmes.

Les travaux décrivant des épitopes T dans le cadre de la leishmaniose humaine, sont peu nombreux et ont surtout concerné des épitopes T affins aux molécules HLA-I (Seyed *et al.*, 2011; Naouar *et al.*, 2016; Amit *et al.*, 2017). L'identification de candidats vaccins peptidiques demeure donc d'un grand intérêt dans le domaine de la vaccination contre la leishmaniose humaine.

Le contrôle de l'infection par *Leishmania* étant basé aussi bien sur des réponses T CD4+ que T CD8+, la recherche de candidats vaccins peptidiques contre la leishmaniose humaine devrait donc être orientée vers l'identification d'épitopes affins aux molécules HLA-I et HLA-II, capables d'induire les deux types de réponses immunes, dans le but d'assurer la mise en place d'une réponse protectrice équilibrée et efficace.

Ce travail de thèse a démarré dans le cadre d'un projet de recherche collaboratif (JEA1 VACLEISH) entre une équipe de l'IRD (JL Lemesre, R. Bras-Gonçalves, Labo UMR177 INTERTRYP) et l'IPT (A. Garnaoui, Labo de Parasitologie Médicale, Biotechnologies et Biomolécules) ayant pour objectif l'identification de candidats vaccins peptidiques contre la

leishmaniose humaine. Des épitopes T affins pour les molécules HLA-I et -II les plus fréquentes dans la population mondiale, ont été identifiés, *in silico*, et des peptides multi-épitopiques affins à des molécules HLA-I et HLA-II, ont été conçus par Y Messaoudi (Master Immunologie Fondamentale et Appliquée, intitulé « Conception de peptides multi-épitopiques à partir de protéines de *Leishmania* et analyse préliminaire de leur immunogénicité chez l'homme »).

Dans le cadre de cette thèse, nous avons évalué la capacité de ces peptides multi-épitopiques à induire une réponse immunitaire T CD4⁺ et T CD8⁺, *in vitro*, sur des PBMC issus d'individus ayant développé une immunité protectrice contre une infection par *L. major*, vivant dans des zones de la Tunisie où la LCZ est endémique. L'immunogénicité des peptides multi-épitopiques a aussi été évaluée chez des individus naïfs.

L'identification des épitopes d'intérêt est généralement faite à partir de protéines cibles, déjà elles-mêmes décrites comme candidats vaccin ou à partir de protéomes de certaines espèces de *Leishmania*, en utilisant des algorithmes de prédiction de l'affinité de liaison aux molécules HLA les plus représentées dans la population mondiale, afin d'assurer une bonne couverture vaccinale (Silva *et al.*, 2016; Dikhit *et al.*, 2017a; Dikhit *et al.*, 2018b).

L'identification des épitopes T utilisés au cours de ce travail, a été réalisée à partir des protéines candidates H2B, LmlRAB et PSA. Lors d'études antérieures réalisées par l'IPT et l'IRD, il a été rapporté que les protéines H2B (Histone de *L. major*), LaPSA-38S (Promastigote Surface Antigen de *L. amazonensis*) et LmlRAB (RAB GTPase de *L. major*), pouvaient constituer des candidats vaccin potentiel contre la leishmaniose humaine (Chamakh-Ayari *et al.*, 2014). Ces protéines sont présentes dans les stades amastigote et promastigote, possèdent un degré de conservation élevé parmi les espèces de *Leishmania* et sont capables de conférer une protection significative chez la souris et chez le chien et d'induire, *in vitro*, une réponse cellulaire associée à la protection, chez des individus immuns à la leishmaniose (Handman *et al.*, 1995; Iborra *et al.*, 2004; Chenik *et al.*, 2006a; Chenik *et al.*, 2006b; Meddeb-Garnaoui *et al.*, 2010; Chamakh-Ayari *et al.*, 2014; Petitdidier *et al.*, 2016; Chamakh-Ayari *et al.*, 2017). Elles sont impliquées dans l'organisation et la fonction de l'ADN dans le noyau des cellules eucaryotes pour H2B, dans la résistance à la lyse par le complément et dans les interactions avec les macrophages pour la PSA, et dans la maturation des phagosomes et la régulation des voies de sécrétion pour les protéines RAB de *Leishmania*.

L'étape d'identification des épitopes T affins aux molécules HLA-I et -II a été réalisée, *in silico*, à l'aide de plusieurs algorithmes accessibles en ligne NetMHC 3.2, NetMHCII 2.2, IEDB, NetCHOP 3.1 et PAMProC II).

Les molécules HLA-I et II sont caractérisées par un polymorphisme très élevé, rendant difficile le développement de vaccin peptidique associés à une large couverture vaccinale (<http://hla.alleles.org>). Cette difficulté a été contournée par la possibilité de regrouper plusieurs molécules HLA en supertypes HLA (Sette et Sidney, 1999). Ces derniers sont constitués de groupes de molécules HLA pouvant lier des peptides similaires, donnant lieu à un certain chevauchement dans les répertoires des peptides liés à ces molécules (del Guercio *et al.*, 1995; Sidney *et al.*, 1995; Sidney *et al.*, 2008). Le nombre d'épitopes peut ainsi être considérablement réduit, en utilisant des peptides ayant des affinités de liaison à des supertypes HLA plutôt qu'à des molécules HLA individuelles. Dans ce contexte, il a été démontré qu'avec seulement quelques épitopes affins à plusieurs supertypes HLA, il était possible d'obtenir une couverture globale de plus de 90% (Sette et Sidney, 1999).

Concernant les peptides utilisés au cours de ce travail, 12 supertypes HLA-I (A01, A01/103, A01/124, A02, A03, A24, B07, B08, B27, B44, B58 et B62) et 5 supertypes HLA-II (main DR, DR4, DRB3, main DP et DP2) ont été sélectionnés pour identifier, *in silico*, les épitopes T qui leurs sont affins. Ces supertypes, considérés ensemble, pourraient assurer une couverture globale de la population, estimée à plus de 90% (Sidney *et al.*, 2008; Greenbaum *et al.*, 2011). Une stratégie peptidique multi-épitopiques, consistant à relier les séquences d'épitopes sélectionnés, ayant une affinité pour plusieurs supertypes HLA, a été adoptée.

Les vaccins peptidiques multi-épitopiques présentent de nombreux avantages par rapport aux vaccins mono-épitopiques, ils sont plus longs donc plus immunogènes, peuvent contenir plusieurs épitopes affins à plusieurs molécules HLA-I et -II, permettant ainsi d'éviter le problème de restriction par le système HLA et d'activer à la fois les cellules TCD4+ et TCD8+.

Au total, 11 peptides multi-épitopiques de 18 à 40 aa ont été conçus, composés de 4 à 20 épitopes/peptide, ayant une affinité faible à forte, à au moins 3/12 supertypes HLA-I et 3/5 supertypes HLA-II les plus fréquents. Il est intéressant de noter que la combinaison de ces peptides multi-épitopiques, permettrait d'élargir les affinités de liaison à tous les supertypes HLA-I et HLA-II analysés, ce qui pourrait optimiser la couverture vaccinale.

Par ailleurs, ces peptides sont caractérisés par des niveaux d'homologie de séquence allant de 33 à 100% avec les différentes espèces de *Leishmania*, condition indispensable à la protection croisée. D'autre part, ces peptides présentent une faible homologie de séquence

avec les protéines humaines réduisant ainsi le risque de réactions croisées avec les antigènes de l'hôte.

La plupart des travaux sur les vaccins peptidiques anti-*Leishmania* se sont intéressés aux épitopes affins aux molécules HLA-I. Certains d'entre eux se sont focalisés sur l'identification d'épitopes ayant des affinités de liaison à un seul supertype HLA-I, parmi les plus fréquents dans certaines populations, comme le supertype HLA-A02 (Seyed *et al.*, 2011; Naouar *et al.*, 2016; Dikhit *et al.*, 2018a). D'autres travaux ont identifié des épitopes affins à plusieurs supertypes HLA-I (Saffari et Mohabatkar, 2009; Seyed *et al.*, 2011; Naouar *et al.*, 2016; Amit *et al.*, 2017; Dikhit *et al.*, 2017a; Vijayamahantesh *et al.*, 2017; Dikhit *et al.*, 2018b). Les travaux portant sur l'identification des épitopes affins aux molécules HLA-II sont moins nombreux puisque leur prédiction est plus difficile et moins précise que celle des épitopes affins aux molécules HLA-I. Cela est dû à la complexité de la structure des molécules HLA-II, aboutissant à un répertoire de liaison peptidique plus vastes que celui des molécules HLA-I (Elfaki *et al.*, 2012; Dikhit *et al.*, 2017b; Joshi *et al.*, 2019). Par ailleurs, peu de travaux ont décrit, à la fois, la prédiction d'épitopes affins aux molécules HLA-I et -II (Silva *et al.*, 2016; Barbosa Santos *et al.*, 2017; Dias *et al.*, 2018).

Dans ce travail, nous avons utilisé des peptides multi-épitopiques contenant plusieurs épitopes affins à des molécules HLA-I ou HLA-II, lesquels pourraient induire des réponses aussi bien T CD4⁺ que des réponses T CD8⁺, toutes deux déterminantes pour la mise en place d'une réponse immune protectrice. Bien que les peptides multi-épitopiques présentent plusieurs avantages, rares sont les études qui ont adopté cette stratégie pour l'identification de candidats vaccins peptidiques anti-*Leishmania*. A notre connaissance, une seule étude a décrit l'identification et la conception de peptides multi-épitopiques dans le modèle de la leishmaniose expérimentale murine (Agallou *et al.*, 2014). Ainsi, des peptides multi-épitopiques de 20 à 30 aa, contenant de 3 à 5 épitopes affins aux molécules CMH-I ou -II, mais aussi des épitopes affins à plusieurs supertypes HLA-I et HLA-II humains, ont été conçus à partir de quatre protéines de *Leishmania* à savoir la cystéine peptidase A (CPA), l'histone H1, KMP-11 et *Leishmania* eukaryotic initiation factor (Leif) (Agallou *et al.*, 2014). Dans le but de valider les prédictions effectuées *in silico*, de nos peptides mutli-épitopiques, nous avons évalué leur immunogénicité et leur capacité à induire une réponse cellulaire T spécifique, *in vitro*, chez des individus guéris d'une LC due à *L. major*. Les peptides multi-épitopiques ont été utilisés individuellement ou sous forme de pools peptidique, pour stimuler les PBMC, pendant une culture de 10 jours, en présence d'IL-2. Les pools peptidiques ont été constitués de sorte à avoir des pools de peptides de classe I ou de classe II issus d'une même

protéine ou de protéines différentes, ou des pools de peptides de classe I **et** de classe II issus d'une même protéine ou de protéines différentes. Nous avons analysé, dans un premier temps, les réponses cytokiniques (IFN- γ et IL-10 analysés par ELISA et GrB et TNF- α analysés par CBA), lesquelles ont été comparées à celles observées chez un groupe d'individus naïfs, utilisés comme contrôles.

Il est bien établi que l'IFN- γ est une cytokine indispensable au contrôle de la multiplication du parasite, et est principalement produite par les cellules Th1. Parallèlement à son rôle bien établi dans le contrôle de la leishmaniose expérimentale murine, cette cytokine est généralement détectée à des taux significativement élevés dans des cultures de PBMC issus d'individus ayant développé une immunité protectrice contre *L. major*, après stimulation, *in vitro*, par des antigènes de *Leishmania* (Kima et Soong, 2013; Naouar *et al.*, 2014; Kammoun-Rebai *et al.*, 2016).

Nous avons détecté des taux significatifs d'IFN- γ en réponse à des pools composés par des peptides affins aux molécules HLA-I, HLA-II ou HLA-I et -II (2 sur 6; 4 sur 6; 10 sur 13 pools analysés, respectivement) chez des individus guéris de LC. De façon intéressante, aucune production d'IFN- γ n'a été détectée chez les sujets naïfs, en réponse à ces pools à l'exception du pool P12, suggérant ainsi que les réponses observées en réponse aux pools peptidiques sont spécifiques du parasite *Leishmania*. Il est aussi intéressant de noter que les taux d'IFN- γ induits par le P21, composé par les onze peptides, étaient similaires à ceux induits par le SLA, argument en faveur de la forte réponse IFN- γ induite par ce pool peptidique.

Concernant les réponses IFN- γ observées après stimulation avec les peptides multi-épitopiques utilisés individuellement, nous avons noté que, parmi ces peptides, seuls H2BI et H2BII ont été capables d'induire des taux significatifs d'IFN- γ chez les individus guéris de LC. D'autre part, tous les pools de peptides induisant des taux significatifs d'IFN- γ , à l'exception de P7, possèdent en commun des peptides affins aux molécules HLA-I et /ou HLA-II dérivés de la protéine H2B. Il est à rappeler que l'immunogénicité et la capacité à conférer une protection significative, de la protéine H2B de *Leishmania* a été démontrée aussi bien chez la souris (Chenik *et al.*, 2006) que chez le hamster (Baharia *et al.*, 2014). Par ailleurs, sa capacité à induire, *in vitro*, des réponses T significatives à prédominance Th1 (induction d'IFN- γ et de TNF- α), a aussi été décrite chez des individus guéris de LC ou de LV (Meddeb-Garnaoui *et al.*, 2010; Baharia *et al.*, 2014).

Par ailleurs, nous avons constaté que la plupart des pools contenant, à la fois, des épitopes affins aux molécules HLA-I et des épitopes affins aux molécules HLA-II, étaient capables d'induire des quantités plus élevées d'IFN- γ que ceux contenant uniquement des épitopes

affins aux molécules HLA-I ou des épitopes affins aux molécules HLA-II. Ces résultats soulignent l'importance d'inclure, à la fois, des épitopes inducteurs de réponses T CD4⁺ et T CD8⁺, dans un vaccin peptidique. En accord avec nos résultats, d'autres études ont révélé l'importance d'inclure, dans un même composé peptidique, des épitopes affins aux molécules HLA-I et -II pour l'induction d'une réponse immunitaire plus équilibrée. Dans des modèles de leishmanioses expérimentales murines analysant des protection croisées, il a été rapporté, que la combinaison des domaines F3 (inducteur de réponse T CD4⁺ associée à la protection contre l'infection murine par *L. infantum*) et F1 (inducteur de réponse T CD8⁺ associée à la protection contre l'infection murine par *L. amazonensis*), dérivés de la protéine NH36 (Nucleoside hydrolase de *L. donovani*), était associée à une protection plus efficace que celle induite par ces 2 domaines utilisés séparément (Nico *et al.*, 2014; Alves-Silva *et al.*, 2017; Alves-Silva *et al.*, 2019). Les auteurs ont suggéré que l'amélioration de la protection par l'utilisation des 2 domaines en tandem, sous forme de chimère, était probablement due à la modulation de réponses pro-inflammatoires exacerbées, par des capacités régulatrices de la chimère. Par ailleurs, les épitopes T CD4⁺ et T CD8⁺ responsables des activités pro-inflammatoires et régulatrices de ces domaines, ont aussi été identifiés (Alves-Silva *et al.*, 2019).

Parallèlement à l'IFN- γ , nous avons aussi analysé une autre cytokine pro-inflammatoire, le TNF- α , un cofacteur d'activation des macrophages. Des taux significatifs et spécifiques de TNF- α , ont été observés en réponse au P21, chez les individus guéris. Le TNF- α joue un rôle important au cours de la LC, il agit en synergie avec l'IFN- γ pour activer les macrophages à détruire les parasites (Liew *et al.*, 1990), mais sa présence a aussi été démontrée dans les lésions de patients atteints de LC (Melby *et al.*, 1994). Concernant la capacité de peptides de *Leishmania* à induire la production de TNF- α , il a récemment été rapporté que la stimulation de PBMC issus d'individus guéris de LV avec un domaine central (F2) de NH36, contenant deux épitopes affins aux molécules HLA-DR les plus fréquentes dans la population humaine, s'accompagnait de la production de TNF- α (Barbosa Santos *et al.*, 2017).

La production de l'IL-10 a aussi été évaluée dans ce travail. Cette cytokine anti-inflammatoire joue un rôle dans la persistance du parasite et, par suite, dans l'exacerbation de la maladie, mais aussi dans la régulation des réponses inflammatoires excessives (Louzir *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2018). Nous n'avons détecté la présence d'IL-10 à des taux significatifs, ni après stimulation par les pools de peptides, ni après stimulation par les peptides individuels (à l'exception de H2BII) chez les individus guéris de LC. Nous avons, cependant noté des taux significativement plus bas d'IL-10 dans les cultures stimulées par

certaines pools par rapport aux cultures NS. Les protéines recombinantes à partir desquelles les peptides ont été dérivés (H2B, PSA et LmIRAB), étaient quant à elles, capables d'induire des taux élevés d'IL-10 chez des individus immuns à la LC ([Meddeb-Garnaoui et al., 2010](#); [Chamakh-Ayari et al., 2014](#); [Chamakh-Ayari et al., 2017](#)). Il semble donc que, à l'inverse des protéines recombinantes dont ils dérivent, les peptides ont un effet inhibiteur de la production d'IL-10. La baisse des taux d'IL-10 observée dans les cultures stimulées par certains pools pourrait être expliquée par la capacité de ces derniers à induire la production d'IFN- γ , connu pour ses effets inhibiteurs de la production d'IL-10 ([Hu et al., 2006](#)). Etant donné le rôle de l'IL-10 dans la régulation de réponses inflammatoires excessives, la capacité à inhiber la production de cette cytokine de certains de nos pools de peptides, pourrait ne pas être bénéfique pour l'hôte ([Anderson et al., 2007](#)).

Un effet de régulation négative de certains peptides issus des protéines KMP-11 ou GP63, a également été rapporté ([Elfaki et al., 2012](#); [Agallou et al., 2014](#)).

L'ensemble des résultats décrits ci-dessus nous permettent de suggérer que les pools de peptides multi-épitopiques utilisés au cours de notre étude, sont capables d'induire une réponse immunitaire à dominance Th1, chez les individus guéris d'une LC.

Certaines études ont rapporté des taux élevés d'IFN- γ parallèlement à de faibles taux d'IL-10, en réponse à une stimulation avec des épitopes affins aux molécules HLA-I ou HLA-II, utilisés séparément ou sous forme de pools, dérivés de différentes protéines de *Leishmania*, incluant les cystéines protéinase, LmsTI-1, TSA, LeIF, LPG-3 (Lipophosphoglycan), *L. donovani* 3-ectonucleotidase ou encore PDI (proteine disulfide isomérase), chez des individus guéris de LC ou de LV ([Seyed et al., 2011](#); [Dikhit et al., 2017a](#); [Vijayamahantesh et al., 2017](#); [Joshi et al., 2019](#)).

Par contre, seules quelques études se sont intéressées à l'identification simultanée des peptides affins aux molécules HLA-I et -II. Ainsi, Barbosa Santos et collaborateurs ont récemment identifié des épitopes affins à plusieurs molécules HLA-I et HLA-DR, à partir de la protéine NH36 et ont montré leur capacité à induire la production d'IFN- γ , mais à des taux faibles, chez des sujets asymptomatiques ayant une IDR+ au test à la leishmanine ([Barbosa Santos et al., 2017](#)). Une autre étude a identifié, au sein du protéome de *L. braziliensis*, des épitopes ayant une forte affinité aux molécules HLA-I et -II, les plus représentées dans la population mondiale ([Silva et al., 2016](#)). Leur capacité à induire la prolifération des LT chez des individus guéris de LC, a été décrite tandis que leur capacité à induire la production de cytokines n'a pas été évaluée ([Silva et al., 2016](#)).

Dans le modèle de la leishmaniose expérimentale murine, des peptides multi-épitopiques contenant des épitopes dérivés de protéines de *L. infantum* et ayant une forte affinité à la fois pour les molécules CMH-I et -II, et dans lesquels des épitopes affins aux molécules HLA ont aussi été inclus, ont été décrits (Agallou *et al.*, 2014). Leur capacité à induire des quantités élevées d'IFN- γ , en même temps que de faibles taux d'IL-10, a été démontrée dans les surnageants de cultures de splénocytes de souris immunisées (Agallou *et al.*, 2014).

Plus récemment, il a été rapporté que des protéines chimériques recombinantes composées d'épitopes T murins et humains affins aux molécules CMH-I et -II étaient capables d'induire des rapports IFN- γ /IL-10 élevés chez des souris immunisées ainsi que chez des sujets traités d'une LV (Martins *et al.*, 2017; Dias *et al.*, 2018). Une réponse immunitaire protectrice, induite par ces protéines, a été aussi observée chez les souris vaccinées (Martins *et al.*, 2017; Dias *et al.*, 2018).

Il est aussi à noter que certains auteurs ont identifié des peptides affins aux molécules HLA-I ou -II qui n'étaient pas capables d'induire la production d'IFN- γ chez des sujets guéris de LC ou de LV (Elfaki *et al.*, 2012; Naouar *et al.*, 2016).

Les différences observées entre nos résultats et certains résultats de la littérature rapportant soit une faible capacité soit une incapacité à induire la production d'IFN- γ , peuvent être expliqués par le fait que les épitopes synthétiques, vu leur petite taille, ne sont pas suffisamment immunogènes lorsqu'ils sont utilisés seuls. Dans notre étude, nous avons utilisé des peptides multi-épitopiques, qui sont de plus grande taille et seraient, de ce fait, plus immunogènes.

Une autre caractéristique des peptides utilisés dans ce travail est le rajout d'une queue palmitoylée, dans le but d'améliorer leur immunogénicité (Baier *et al.*, 2000; Loing *et al.*, 2000). Le rôle d'adjuvant et l'innocuité des peptides palmitoylés ont été évaluées au cours de divers essais cliniques (Livingston *et al.*, 1997; Gahery-Segard *et al.*, 2000). Il a été rapporté que les lipopeptides étaient capables de stimuler la réponse immunitaire et étaient associés à une faible toxicité (Bartlett *et al.*, 2018).

Nous avons, dans un second temps, entrepris d'analyser, de manière plus approfondie, la réponse cellulaire induite par certains de nos pools de peptides.

Le nombre de PBMC étant un facteur limitant, nous avons été obligés de choisir, parmi les 25 pools analysés en ELISA, ceux induisant les taux les plus élevés d'IFN- γ , à savoir les pools P21, P16, P13, P14, P8 et P9. Nous avons effectué un test ELISPOT pour évaluer la fréquence des cellules T productrices d'IFN- γ et nous avons analysé l'implication de différentes

populations cellulaires productrices de cytokines, à savoir les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ productrices d'IFN- γ et/ou de GrB, les cellules T CD4⁺ multifonctionnelles et les cellules T mémoires, par cytométrie en flux.

Le test ELISPOT nous a permis de valider la capacité des pools de peptides sélectionnés, à activer les LT producteurs d'IFN- γ de façon spécifique chez des individus guéris de LC. Cependant, pour le P13, bien que nous ayons observé une augmentation de la fréquence des cellules T productrices d'IFN- γ chez les individus guéris (par rapport aux cultures NS), celle-ci n'était pas statistiquement significative, probablement à cause du faible nombre d'individus testés (N=5). Ce résultat mérite d'être confirmé sur un plus grand nombre d'individus.

L'utilisation du test ELISPOT, entre autres, pour énumérer les cellules T spécifiques d'Ag, sécrétrices de cytokines et son utilité dans l'identification et la validation d'épitopes T en tant que composants de candidats vaccins contre les maladies infectieuses, ont été rapportées ([Lima-Junior et al., 2017](#)). Dans le contexte des travaux sur la vaccination peptidique anti-*Leishmania*, les études utilisant le test ELISPOT pour valider l'immunogénicité d'épitopes T issus des protéines de *Leishmania* chez l'homme, sont peu fréquentes ([Seyed et al., 2011](#); [Das et al., 2014](#)).

Dans le but d'analyser l'expression des molécules HLA pour lesquels les épitopes T sont affins, chez les individus analysés, nous avons effectué un typage HLA chez cinq volontaires parmi le groupe d'individus guéris de LC testés en ELISPOT. Le but du typage HLA a été d'évaluer la production d'IFN- γ chez ces individus en prenant en considération l'expression des allèles HLA, nécessaires à la reconnaissance et à la présentation des épitopes aux LT. Nous avons observé des réponses positives (en termes de SFU/10⁶ PBMC), aux pools de peptides P8, P9, P16 et P21, chez 4/5 personnes, validant ainsi l'utilisation des méthodes *in silico* pour la prédiction d'épitopes à partir de nos protéines. Ces pools contiennent plusieurs épitopes ayant une affinité forte à faible pour les différents allèles HLA-I et HLA-II exprimés par chacun de ces individus. Cependant, une réponse négative a été observée chez un individu, probablement en raison de l'absence de molécules HLA auxquels les épitopes sont affins ou encore, à cause de l'absence de génération des épitopes sélectionnés *in silico*, lors du processus de la dégradation des protéines au cours de l'infection naturelle. Il a été rapporté précédemment, dans d'autres études, que certains épitopes ayant une affinité aux molécules HLA n'induisent pas obligatoirement la stimulation des LT ([Castelli et al., 2007](#); [Seyed et al., 2011](#); [Hamze et al., 2017](#)).

Concernant l'analyse des différentes populations cellulaires T activées par nos peptides multi-épitopiques, il est admis que les LT CD4⁺ et LT CD8⁺ produisant de l'IFN- γ sont

primordiales pour l'élimination du parasite *Leishmania* (Ajdary *et al.*, 2000; Bottrel *et al.*, 2001; Nateghi Rostami *et al.*, 2010a; Khamesipour *et al.*, 2012; da Silva Santos et Brodskyn, 2014; Kaushal *et al.*, 2014). Un candidat vaccin idéal devrait donc être capable d'induire aussi bien l'activation des LT CD4+ que celle des LT CD8+.

Nous avons démontré que les pools de peptides sélectionnés étaient capables d'induire une augmentation significative des pourcentages de cellules T CD4+ et T CD8+ productrices d'IFN- γ , à l'exception du pool P14, chez des individus guéris de LC. Ces résultats suggèrent que les peptides analysés contiennent des épitopes T qui sont naturellement processés et présentés au système immunitaire au cours de l'infection par *Leishmania*.

Certaines études ont montré que des épitopes T affins aux molécules HLA-I ou HLA-II dérivés de protéines de *L. major* ou de *L. donovani*, utilisés seuls ou combinés sous forme de pools, étaient capables d'activer des LT CD8+ ou CD4+ spécifiques producteurs d'IFN- γ , chez des individus guéris de LC ou LV (Seyed *et al.*, 2011; Dikhit *et al.*, 2017a; Dikhit *et al.*, 2017b; Vijayamahantesh *et al.*, 2017; Dikhit *et al.*, 2018b). À notre connaissance, aucune étude réalisée chez l'homme n'a décrit la détection de ces deux populations lymphocytaire en réponse à une stimulation par des peptides ayant une affinité à la fois pour HLA-I et -II.

Cependant, dans le modèle de la leishmaniose expérimentale murine, Agallou et collaborateurs ont conçu des peptides multi-épitopiques contenant des épitopes affins aux molécules CMH-I et -II, capables d'induire l'activation des LT CD4+ et des LT CD8+ producteurs d'IFN- γ chez des souris immunisées (Agallou *et al.*, 2014). Plus récemment, il a été rapporté que la vaccination de souris avec un candidat vaccin constitué d'une chimère composée par des domaines F1 et F3 issus de la protéine NH36 de *L. donovani*, contenant respectivement, des épitopes induisant des réponses T CD8+ et T CD4+ associées à la protection, étaient plus efficace que la vaccination avec les domaines utilisés séparément (Alves-Silva *et al.*, 2017; Alves-Silva *et al.*, 2019).

Nous avons aussi évalué la capacité des peptides multi-épitopiques à activer les cellules T productrices de GrB, une protéase pro-apoptotique qui a été associée à un bon pronostic chez des patients atteints de LC et de LV mais qui a aussi été détectée dans des lésions tissulaires (Bousoffara *et al.*, 2004; Kaushal *et al.*, 2014; Kaushal *et al.*, 2016; Egui *et al.*, 2018). Il est à rappeler que nous n'avons pas détecté la présence du GrB dans les surnageants de cultures des PBMC issus des individus guéris de LC, stimulés par le pool P21 contenant l'ensemble des peptides multi-épitopiques, (analyse par CBA). Nous avons, cependant, montré une

augmentation significative du pourcentage de LT CD4⁺ producteurs de GrB après stimulation par les pools de peptides P8, P9, P16 et P21, chez les individus guéris de LC. La différence de résultats entre les deux tests pourrait être due aux conditions de stimulation utilisées pour chacun des tests. En effet, nous avons effectué une re-stimulation des PBMC par les pools de peptides pour détecter les cellules productrices de GrB alors qu'une seule stimulation avait été réalisée pour la détection du GrB dans les surnageants de culture.

Les LT CD4⁺ cytotoxique ont été décrits dans plusieurs infections virales chez l'homme ([Appay et al., 2002](#); [van Leeuwen et al., 2004](#); [Aslan et al., 2006](#); [Phetsouphanh et al., 2017](#)). Dans le cas de l'infection par *Leishmania*, des études ont rapporté une augmentation de la fréquence des cellules T CD4⁺ produisant du GrB en réponse aux protéines excrétées/sécrétées de *L. major* ou au SLA, respectivement chez des individus guéris de LC due à *L. major* ou chez des individus asymptomatiques vivant dans une zone d'endémie pour l'infection par *L. panamensis* ([Naouar et al., 2014](#); [Egui et al., 2018](#)).

D'une manière intéressante, nous avons précédemment montré que la protéine LmlRAB, à partir de laquelle certains de nos peptides sont dérivés, était capable d'induire des taux significatifs de GrB chez des individus guéris de LC ([Chamakh-Ayari et al., 2017](#)).

Une production significative de GrB a aussi été décrite après stimulation par le parasite vivant chez des individus en phase active ou guéris de LC ([Boussoffara et al., 2004](#); [Boussoffara et al., 2018](#)), ou par des protéines sécrétées/excrétées de *L. major*, chez des individus guéris de LC ([Naouar et al. 2014](#)) ou encore après stimulation par la protéine LACK chez des individus guéris d'une infection par *L. infantum* ([Naouar et al., 2016](#); [Fernandez et al., 2018](#)).

Des taux élevés de GrB ont également été détectés dans des surnageants de culture de PBMC stimulés par des épitopes T affins à la molécule HLA-A*0201, issus des protéines excrétées/sécrétées de *L. major* ou par une combinaison de 9 épitopes dérivés des protéines LeIF et TSA (thiol-specific antioxidant) affins à différentes molécules HLA-I, respectivement, chez des individus guéris de LC ou de LV ([Naouar et al., 2016](#); [Dikhit et al., 2018a](#)). Cependant le phénotype des cellules productrices de GrB n'a pas été déterminé au cours de ces études.

Très récemment, il a été rapporté que le GrB pouvait constituer un bon corrélât de protection contre des formes sévères de LC ([Boussoffara et al., 2018](#)).

Nous avons aussi montré dans notre travail, un pourcentage élevé de LT CD4⁺ produisant simultanément l'IFN- γ et le GrB, en réponse à une stimulation par le pool P21.

Une forte corrélation a été rapportée entre la production d'IFN- γ et celle du GrB, en réponse aux protéines sécrétées/excrétées de *Leishmania* (Boussoffara *et al.*, 2018). Une expression simultanée du GrB et de l'IFN- γ par des LT CD8⁺ a été également décrite chez des individus guéris de LC due à *L. panamensis*, en réponse à une stimulation par du SLA (Egui *et al.*, 2018). Les cellules T CD8⁺ exprimant le GrB, ont été impliquées dans l'aggravation des lésions cutanées dues à *L. braziliensis* (Santos Cda *et al.*, 2013).

Pour des raisons techniques, nous n'avons malheureusement pas pu analyser l'activation des T CD8⁺ produisant du GrB en réponse à la stimulation par nos peptides.

D'autres sous populations cellulaires T jouent un rôle important dans le contrôle de l'infection par *Leishmania*, c'est le cas des cellules T multifonctionnelles, produisant simultanément de l'IFN- γ , du TNF- α et de l'IL-2 (Darrah *et al.*, 2007; Seder *et al.*, 2008; Macedo *et al.*, 2012; Barbosa Santos *et al.*, 2017; Egui *et al.*, 2018). Dans notre étude, l'analyse multiparamétrique, par cytométrie en flux, a révélé que les pools de peptides P13, P14 et P21 étaient capables d'induire une augmentation significative des fréquences des LT CD4⁺ bi-fonctionnels, produisant de l'IFN- γ et du TNF- α ainsi que des LT CD4⁺ produisant de l'IL-2 et du TNF- α , confirmant ainsi leur capacité à induire la production de cytokines ayant un rôle clé dans le contrôle de l'infection. Cependant, aucune augmentation n'a été observée dans les fréquences de LT CD4⁺ multifonctionnels produisant simultanément l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-2.

Dans le modèle de la leishmaniose expérimentale murine, des auteurs ont démontré des augmentations des fréquences des LT CD4⁺ et CD8⁺ produisant du TNF- α et de l'IFN- γ , en réponse à une stimulation par des épitopes T dérivés de la protéine NH36 ou d'un peptide dérivé de la protéine PEPCK (glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase), respectivement chez des souris infectées ou immunisées (Mou *et al.*, 2015; Alves-Silva *et al.*, 2017; Alves-Silva *et al.*, 2019).

Certaines études ont démontré le rôle protecteur des LT multifonctionnels contre certaines infections chez l'homme, comme le HIV (Kannanganat *et al.*, 2007; Duvall *et al.*, 2008) alors que d'autres ont suggéré que cette population de T polyfonctionnelles ne constituait pas un corrélat de protection, comme c'est le cas pour la vaccination anti-tuberculose (Lewinsohn *et al.*, 2017). Dans le cas de la leishmaniose, il a été démontré que le degré de la protection contre l'infection murine par *L. major*, était dépendant de la fréquence des cellules T CD4⁺ produisant simultanément l'IFN- γ , l'IL-2 et le TNF- α (Darrah *et al.*, 2007). Chez l'homme, des différences dans les fréquences des T multifonctionnelles ont été décrites entre individus guéris de LC due à *L. braziliensis* vs *L. amazonensis*, permettant aux auteurs de suggérer que

cette population de T CD4+ pourrait expliquer, du moins en partie, les différences dans la pathogénicité de ces 2 infections (**Macedo et al., 2012**). Une augmentation de la fréquence des T CD4+ IL-2+TNF- α +IFN- γ + a été décrite en réponse à un domaine de la protéine NH36, chez des sujets guéris d'une infection par *L. donovani* et chez des asymptomatiques (**Barbosa Santos et al., 2017**). 2 études ont, cependant, apporté des données remettant en cause le fait que ces cellules T polyfonctionnelles puissent constituer un corrélât de protection, l'une démontrant une réduction de la fréquence de ces cellules après traitement de LC humaine (**Lakhal-Naouar et al., 2015**) et l'autre montrant que la fréquence de ces cellules étaient plus élevée chez des patients en phase active que chez des individus guéris d'une infection par *L. panamensis* (**Egui et al., 2018**). Ces données pourraient être en accord avec l'absence de cellules T multifonctionnelle (production d'IFN- γ , IL-2 et TNF- α) en réponse à nos peptides multi-épitopiques.

Aucune étude n'a, à notre connaissance, examinée à ce jour la polyfonctionnalité des LT en réponse à des peptides affins aux molécules HLA, dans le contexte de la leishmaniose humaine.

La dernière partie de ce travail de thèse concernant l'analyse de l'immunogénicité de nos peptides multi-épitopiques chez des individus ayant développé une immunité contre la leishmaniose, a été consacrée à l'évaluation de la capacité de ces peptides à activer les cellules T mémoires.

La réponse mémoire développée au cours des leishmanioses reste jusqu'à présent mal élucidée. Les mécanismes impliquant la génération des T mémoires ainsi que leur maintien au cours de la guérison sont toujours mal connus. Cependant plusieurs études ont apporté des arguments en faveur de leur implication au cours des leishmanioses humaines (**Khamesipour et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Keshavarz Valian et al., 2013; Pereira-Carvalho et al., 2013**).

Nous avons démontré, dans ce travail, une augmentation significative du pourcentage des cellules T CD4+ et CD8+ mémoires centrales ou TCM, exprimant les marqueurs CD45RO et CCR7+, chez des individus guéris de LC, en réponse aux pools P8, P13, P14 et P21. Cependant, nous n'avons détecté aucun changement dans la fréquence des populations mémoires effectrices ou TEM (CD45RO+CCR7-).

Les TCM seraient impliquées dans les réponses secondaires et la protection à long terme, alors que les TEM interviendraient au cours des processus impliqués dans la protection immédiate (**Lanzavecchia et Sallusto, 2005**). L'utilisation de PBMC issus d'individus guéris

d'une LC (détection d'une réponse secondaire) dans notre système d'étude, pourrait donc expliquer le fait que nous ayons détecté des TCM plutôt que des TEM, ces dernières étant plutôt impliquées dans la protection immédiate (**Lanzavecchia et Sallusto, 2005**).

Par ailleurs, les mêmes pools de peptides (à l'exception du pool P13) ont été également capables d'induire des taux significatifs d'IFN- γ lorsqu'ils ont été analysés par ELISPOT. Il est utile de rappeler que nous avons effectué un « cultured ELISPOT » (Stimulation des PBMC pendant 10 jours puis une seconde stimulation en plaque ELISPOT, a été effectuée pendant 24h) et non un « *ex vivo* ELISPOT » consistant à stimuler les PBMC sur une courte durée. Le test « cultured ELISPOT » utilisé dans notre travail pourrait refléter les TCM plutôt que les TEM, qui sont des cellules à demi-vie plus courte que les TCM et qui sont plutôt détectées par le test ELISPOT standard, le « *ex vivo* ELISPOT ».

Il a été rapporté que, à l'inverse des réponses détectées par le test « *ex-vivo* ELISPOT », qui sont de courte durée, celles détectées par le test « cultured ELISPOT » seraient plutôt des réponses TCM nécessitant une re-stimulation antigénique pour développer des fonctions effectrices (**Reece et al., 2004; Calarota et Baldanti, 2013**). Par ailleurs, il a été démontré que les réponses T n'étaient plus détectées par le test « cultured ELISPOT » après une déplétion préalable des cellules TCM (**Todryk et al., 2009**).

Il a été démontré dans le modèle murin de leishmaniose que, contrairement aux cellules TEM, les TCM étaient maintenues en absence du parasite et qu'elles étaient capables de conférer une protection à la réinfection, suggérant que ces cellules devraient être la cible des vaccins inactivés (parasites tués, protéines recombinantes ou sous unitaires), utilisés contre les maladies infectieuses nécessitant une immunité à médiation cellulaire (**Zaph et al., 2004**). Des cellules TCM ont été aussi identifiées, après stimulation par le SLA, chez des individus guéris de LC, suggérant ainsi que ces cellules sont générées au cours de la leishmaniose humaine (**Keshavarz Valian et al., 2013; Glennie et Scott, 2016**).

Dans la dernière partie de ce travail de thèse, nous avons tenté d'évaluer la capacité des peptides multi-épitopiques à stimuler le répertoire T naïf des individus sains non infectés par *Leishmania* (N-Fr). L'activation des lymphocytes T naïfs comme moyen de prédiction de l'immunogénicité des peptides vient d'études montrant que l'amplitude de la réponse T spécifique d'un épitope donné, est corrélée en partie avec la fréquence des cellules T naïves préexistantes et spécifiques de cet épitope, dans le répertoire T naïf (**Moon et al., 2007; Castelli et al., 2013**).

Il est établi que l'immunodominance et l'immunogénicité d'un peptide sont dictés par plusieurs facteurs incluant un processing efficace des protéines et une stabilité du complexe HLA-peptide (Prlic *et al.*, 2006; Henrickson *et al.*, 2008). Il a, cependant, été démontré que l'immunogénicité et l'immunodominance d'un peptide étaient aussi dépendantes de la fréquence des cellules T naïves qui lui sont spécifiques (Moon *et al.*, 2007). Une étude publiée par Castelli et collaborateurs en 2013, a eu pour objectif de comprendre la raison pour laquelle l'un des peptides composant le vaccin Lipo5 (constitué de 5 peptides affins aux molécules HLA-DR, dérivés de protéines du VIH), stimulait fortement les lymphocytes T chez des individus vaccinés et dominait la réponse des autres peptides constituant ce vaccin. Ces auteurs ont démontré que l'immunodominance de ce peptide n'était pas associée à une meilleure capacité de liaison aux molécules HLA, mais plutôt à une fréquence plus élevée de précurseurs de cellules T naïves CD4⁺ chez des individus sains (Castelli *et al.*, 2013).

Dans ce contexte, il a été rapporté que l'utilisation des tests prédictifs d'activation des LT naïfs, *in vitro*, permettrait de prédire l'immunogénicité et, de ce fait, l'efficacité d'un vaccin (Moon *et al.*, 2007; Castelli *et al.*, 2013).

Nous avons détecté, par ELISPOT, une production d'IFN- γ par les LT CD8⁺, en réponse à des CD pulsées avec le pool P21^R contenant l'ensemble des peptides. Ce résultat suggère donc la capacité de cette combinaison peptidique à stimuler la sécrétion d'IFN- γ chez des individus sains, attestant de la présence de LT spécifiques dans le répertoire des cellules T naïves.

Ces résultats, bien qu'ils soient considérés comme préliminaires, n'en demeurent pas moins prometteurs et des expériences d'optimisation avec le P21 sont actuellement en cours à l'IRD. A notre connaissance, aucune étude n'a été décrite, à ce jour, pour mettre en évidence l'activation du répertoire T naïf humain par des candidats vaccins peptidiques contre la leishmaniose.

Il est aussi à rappeler que nous étions confrontés à quelques problèmes techniques relatifs (i) à la pureté des cellules isolées (monocytes et LT CD8⁺ naïfs) et pour lesquels des optimisations sont en cours à l'IRD et (ii) au choix des peptides utilisés comme contrôle positif (mix CEF). Ce mix est constitué de 23 peptides viraux de classe I issus des virus les plus communs à la population humaine, à savoir le cytomégalovirus (CMV), le virus d'Epstein Barr (EBV) et le virus de la grippe. Ce mix stimule donc les LT CD8⁺ qui ont été déjà sensibilisés par ces virus (T effecteurs/mémoires), alors que dans notre système d'étude, nous avons utilisé une population T CD8⁺ naïve pure, permettant probablement d'expliquer les faibles réponses observées après stimulation des LT CD8⁺ par des CD pulsées avec le CEF. L'utilisation de peptides plus adéquats est donc envisagée. Dans ce contexte, il a été rapporté que l'épitope

peptidique Melan-A27–35, issu de l'Ag MART-1 (melanoma antigen recognized by T cells 1) est reconnu par un nombre élevé de LT CD8+ naïfs chez des individus sains (**Pittet *et al.*, 1999; Alanio *et al.*, 2010**). Ce peptide serait donc intéressant à inclure comme peptide référence (contrôle positif) dans les expériences de stimulation du répertoire T naïf afin de valider les conditions de priming et d'expansion cellulaire (**Wolfl et Greenberg, 2014**).

Conclusion et perspectives

L'ensemble des résultats présentés à l'issue de ce travail de thèse, qui a eu pour objectif d'évaluer l'immunogénicité de peptides multi-épitopiques affins à plusieurs molécules HLA-I et II, issus des protéines H2B, PSA et LmlRAB de *Leishmania*, chez des individus guéris de LC, nous permet de suggérer que ces peptides sont capables d'induire une réponse cellulaire T à prédominance Th1, associée à la protection contre la leishmaniose et pourraient, de ce fait, constituer des candidats vaccins potentiels contre l'infection humaine par le parasite *Leishmania*.

Nous avons, en effet, montré que des peptides multi-épitopiques, utilisés sous forme de pools peptidiques, étaient capables d'induire des taux significatifs et spécifiques d'IFN- γ par les cellules T CD4⁺ et TCD8⁺, des réponses T CD4⁺ productrices de GrB et T CD4⁺ bifonctionnelles avec une production simultanée d'IFN- γ et de TNF- α . Des réponses mémoires centrales TCD4⁺ et TCD8⁺, ont également été mises en évidence, en réponse à nos peptides chez les individus guéris de LC.

Les données présentées dans notre travail constituent des arguments solides en faveur du fait que les peptides conçus *in silico*, principalement ceux issus des protéines H2B et PSA pourraient constituer des candidats vaccins potentiels contre la leishmaniose humaine.

Par ce travail, nous avons contribué à élargir la liste des candidats vaccins contre la leishmaniose humaine, en y rajoutant un candidat vaccin poly-épitopique, capable d'induire l'activation de deux populations cellulaires, à savoir les cellules T CD4⁺ et les cellules T CD8⁺, toutes deux cruciales dans la mise en place de la protection contre l'infection par *Leishmania*. Cette étude ouvre ainsi de nouvelles perspectives dans la conception d'un vaccin polypeptidique contre les leishmanioses humaines.

Il est intéressant de noter que parmi les pools peptidiques les plus courts, le P13, constitué seulement de trois peptides affins aux molécules HLA-I et-II dérivés des protéines H2B et PSA, était aussi immunogène que le pool P21, contenant la totalité des peptides conçus. Ce pool mériterait d'être, à nouveau analysé dans un plus grand groupe d'individus guéris de LC, puisque pour certains tests, comme l'ELISPOT, l'absence de réponses significatives était probablement due au faible nombre de sujets analysés.

Par ailleurs, et dans le but d'élargir le panel de cytokines analysées, il serait important d'étudier d'autres cytokines associées à la résistance ou à la susceptibilité notamment l'IL-17, IL-22, IL-13, l'IL-2 et l'IL-4. La sécrétion des cytokines par les LT mémoires centraux devrait aussi être examinée.

Concernant l'éventuelle protection croisée induite par nos peptides, même si ces derniers sont conservés parmi les espèces de *Leishmania*, il est important d'élargir notre analyse à des individus immuns à des espèces de *Leishmania* autres que *L. major*.

Il serait également utile d'étudier le pouvoir immunogène des peptides dans des modèles expérimentaux animaux comme les souris transgéniques exprimant les allèles HLA et de déterminer ainsi la voie d'administration, la dose optimale et l'innocuité des peptides.

Une formulation idéale des peptides incluant leur conjugaison à des adjuvants devrait aussi être envisagée afin d'optimiser la réponse immunitaire.

Références

Ackerman, A. L., C. Kyritsis, R. Tampe and P. Cresswell (2003). "Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(22): 12889-12894.

Aebischer, T. (2014). "Leishmania spp. Proteome Data Sets: A Comprehensive Resource for Vaccine Development to Target Visceral Leishmaniasis." *Front Immunol* **5**: 260.

Afonso, L., V. M. Borges, H. Cruz, F. L. Ribeiro-Gomes, G. A. DosReis, A. N. Dutra, J. Clarencio, C. I. de Oliveira, A. Barral, M. Barral-Netto and C. I. Brodskyn (2008). "Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*." *J Leukoc Biol* **84**(2): 389-396.

Agallou, M., E. Athanasiou, O. Koutsoni, E. Dotsika and E. Karagouni (2014). "Experimental Validation of Multi-Epitope Peptides Including Promising MHC Class I- and II-Restricted Epitopes of Four Known *Leishmania infantum* Proteins." *Front Immunol* **5**: 268.

Agallou, M., M. Margaroni and E. Karagouni (2011). "Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of *Leishmania infantum* KMP-11 and CpG oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis." *Vaccine* **29**(31): 5053-5064.

Ahluwalia, S., S. D. Lawn, J. Kanagalingam, H. Grant and D. N. Lockwood (2004). "Mucocutaneous leishmaniasis: an imported infection among travellers to central and South America." *BMJ* **329**(7470): 842-844.

Aissi, W., K. Ben Hellel, Z. Habboul, I. Ben Sghaier, Z. Harrat, A. Bouratbine and K. Aoun (2015). "[Epidemiological, clinical and biological features of infantile visceral leishmaniasis at Kairouan hospital (Tunisia): about 240 cases]." *Bull Soc Pathol Exot* **108**(4): 265-271.

Ajdary, S., M. H. Alimohammadian, M. B. Eslami, K. Kemp and A. Kharazmi (2000). "Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection." *Infect Immun* **68**(4): 1760-1764.

Akopyants, N. S., N. Kimblin, N. Secundino, R. Patrick, N. Peters, P. Lawyer, D. E. Dobson, S. M. Beverley and D. L. Sacks (2009). "Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector." *Science* **324**(5924): 265-268.

- Alanio, C., F. Lemaitre, H. K. Law, M. Hasan and M. L. Albert (2010). "Enumeration of human antigen-specific naive CD8⁺ T cells reveals conserved precursor frequencies." *Blood* **115**(18): 3718-3725.
- Alexander, J. and F. Brombacher (2012). "T helper1/t helper2 cells and resistance/susceptibility to leishmania infection: is this paradigm still relevant?" *Front Immunol* **3**: 80.
- Alvar, J., I. D. Velez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. den Boer and W. H. O. L. C. Team (2012). "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." *PLoS One* **7**(5): e35671.
- Alves-Silva, M. V., D. Nico, P. M. de Luca and C. B. Palatnik de-Sousa (2019). "The F1F3 Recombinant Chimera of *Leishmania donovani*-Nucleoside Hydrolase (NH36) and Its Epitopes Induce Cross-Protection Against *Leishmania (V.) braziliensis* Infection in Mice." *Front Immunol* **10**: 724.
- Alves-Silva, M. V., D. Nico, A. Morrot, M. Palatnik and C. B. Palatnik-de-Sousa (2017). "A Chimera Containing CD4⁺ and CD8⁺ T-Cell Epitopes of the *Leishmania donovani* Nucleoside Hydrolase (NH36) Optimizes Cross-Protection against *Leishmania amazonensis* Infection." *Front Immunol* **8**: 100.
- Alves, C. R., L. C. Pontes de Carvalho, A. L. Souza and S. G. De Simone (2001). "A strategy for the identification of T-cell epitopes on *Leishmania* cysteine proteinases." *Cytobios* **104**(405): 33-41.
- Amato, V. S., F. F. Tuon, H. A. Bacha, V. A. Neto and A. C. Nicodemo (2008). "Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment." *Acta Trop* **105**(1): 1-9.
- Amit, A., M. R. Dikhit, V. Mahantesh, R. Chaudhary, A. K. Singh, A. Singh, S. K. Singh, V. N. Das, K. Pandey, V. Ali, S. Narayan, G. C. Sahoo, P. Das and S. Bimal (2017). "Immunomodulation mediated through *Leishmania donovani* protein disulfide isomerase by eliciting CD8⁺ T-cell in cured visceral leishmaniasis subjects and identification of its possible HLA class-I restricted T-cell epitopes." *J Biomol Struct Dyn* **35**(1): 128-140.
- Anderson, C. F., M. Oukka, V. J. Kuchroo and D. Sacks (2007). "CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis." *J Exp Med* **204**(2): 285-297.
- Andrieu, M., E. Loing, J. F. Desoutter, F. Connan, J. Choppin, H. Gras-Masse, D. Hanau, A. Dautry-Varsat, J. G. Guillet and A. Hosmalin (2000). "Endocytosis of an HIV-derived lipopeptide into human dendritic cells followed by class I-restricted CD8(+) T lymphocyte activation." *Eur J Immunol* **30**(11): 3256-3265.
- Aoun, K., F. Amri, E. Chouihi, N. Haouas, K. Bedoui, R. Benikhlef, J. Ghrab, H. Babba, M. K. Chahed, Z. Harrat and A. Bouratbine (2008). "[Epidemiology of *Leishmania (L.) infantum*,

L. major and L. killicki in Tunisia: results and analysis of the identification of 226 human and canine isolates]." *Bull Soc Pathol Exot* **101**(4): 323-328.

Aoun, K. and A. Bouratbine (2014). "Cutaneous leishmaniasis in North Africa: a review." *Parasite* **21**: 14.

Aoun, K., A. Bouratbine, Z. Harrat, I. Guizani, M. Mokni, S. Bel Hadj Ali, A. Ben Osman, M. Belkaid, K. Dellagi and R. Ben Ismail (2000). "[Epidemiologic and parasitologic data concerning sporadic cutaneous leishmaniasis in northern Tunisia]." *Bull Soc Pathol Exot* **93**(2): 101-103.

Aoun, K., F. Jeddi, F. Amri, J. Ghrab and A. Bouratbine (2009). "[Current epidemiological data on visceral leishmaniasis in Tunisia]." *Med Mal Infect* **39**(10): 775-779.

Appay, V., J. J. Zaunders, L. Papagno, J. Sutton, A. Jaramillo, A. Waters, P. Easterbrook, P. Grey, D. Smith, A. J. McMichael, D. A. Cooper, S. L. Rowland-Jones and A. D. Kelleher (2002). "Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo." *J Immunol* **168**(11): 5954-5958.

Armijos, R. X., M. M. Weigel, H. Aviles, R. Maldonado and J. Racines (1998). "Field trial of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis in an at-risk child population: safety, immunogenicity, and efficacy during the first 12 months of follow-up." *J Infect Dis* **177**(5): 1352-1357.

Armijos, R. X., M. M. Weigel, L. Romero, V. Garcia and J. Salazar (2003). "Field trial of a vaccine against new world cutaneous leishmaniasis in an at-risk child population: how long does protection last?" *J Infect Dis* **187**(12): 1959-1961.

Aslan, N., C. Yurdaydin, J. Wiegand, T. Greten, A. Ciner, M. F. Meyer, H. Heiken, B. Kuhlmann, T. Kaiser, H. Bozkaya, H. L. Tillmann, A. M. Bozdayi, M. P. Manns and H. Wedemeyer (2006). "Cytotoxic CD4 T cells in viral hepatitis." *J Viral Hepat* **13**(8): 505-514.

Baas, A., X. Gao and G. Chelvanayagam (1999). "Peptide binding motifs and specificities for HLA-DQ molecules." *Immunogenetics* **50**(1-2): 8-15.

Bacellar, O., C. Brodskyn, J. Guerreiro, M. Barral-Netto, C. H. Costa, R. L. Coffman, W. D. Johnson and E. M. Carvalho (1996). "Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis." *J Infect Dis* **173**(6): 1515-1518.

Bacellar, O., H. Lessa, A. Schriefer, P. Machado, A. Ribeiro de Jesus, W. O. Dutra, K. J. Gollob and E. M. Carvalho (2002). "Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients." *Infect Immun* **70**(12): 6734-6740.

Baharia, R. K., R. Tandon, A. A. Sahasrabudde, S. Sundar and A. Dube (2014). "Nucleosomal histone proteins of *L. donovani*: a combination of recombinant H2A, H2B, H3

and H4 proteins were highly immunogenic and offered optimum prophylactic efficacy against *Leishmania* challenge in hamsters." *PLoS One* **9**(6): e97911.

Bahl, S., S. Parashar, H. Malhotra, M. Raje and A. Mukhopadhyay (2015). "Functional Characterization of Monomeric GTPase Rab1 in the Secretory Pathway of *Leishmania*." *J Biol Chem* **290**(50): 29993-30005.

Baier, W., N. Masihi, M. Huber, P. Hoffmann and W. G. Bessler (2000). "Lipopeptides as immunoadjuvants and immunostimulants in mucosal immunization." *Immunobiology* **201**(3-4): 391-405.

Bamford, R. N., A. J. Grant, J. D. Burton, C. Peters, G. Kurys, C. K. Goldman, J. Brennan, E. Roessler and T. A. Waldmann (1994). "The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11): 4940-4944.

Banuls, A. L., M. Hide and F. Prugnolle (2007). "*Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans." *Adv Parasitol* **64**: 1-109.

Barbosa Santos, M. L., D. Nico, F. A. de Oliveira, A. S. Barreto, I. Palatnik-de-Sousa, E. Carrillo, J. Moreno, P. M. de Luca, A. Morrot, D. S. Rosa, M. Palatnik, C. Bani-Correa, R. P. de Almeida and C. B. Palatnik-de-Sousa (2017). "*Leishmania donovani* Nucleoside Hydrolase (NH36) Domains Induce T-Cell Cytokine Responses in Human Visceral Leishmaniasis." *Front Immunol* **8**: 227.

Barral-Netto, M., A. Barral, C. Brodskyn, E. M. Carvalho and S. G. Reed (1995). "Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis." *Parasite Immunol* **17**(1): 21-28.

Bartlett, S., M. Skwarczynski and I. Toth (2018). "Lipids as activators of innate immunity in peptide vaccine delivery." *Curr Med Chem*.

Basu, R., S. Bhaumik, J. M. Basu, K. Naskar, T. De and S. Roy (2005). "Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis." *J Immunol* **174**(11): 7160-7171.

Basu, R., S. Roy and P. Walden (2007). "HLA class I-restricted T cell epitopes of the kinetoplastid membrane protein-11 presented by *Leishmania donovani*-infected human macrophages." *J Infect Dis* **195**(9): 1373-1380.

Bates, P. A. (2007). "Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies." *Int J Parasitol* **37**(10): 1097-1106.

- Beetham, J. K., J. E. Donelson and R. R. Dahlin (2003). "Surface glycoprotein PSA (GP46) expression during short- and long-term culture of *Leishmania chagasi*." *Mol Biochem Parasitol* **131**(2): 109-117.
- Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, S. Mendez, E. M. Shevach and D. L. Sacks (2002a). "CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity." *Nature* **420**(6915): 502-507.
- Belkaid, Y., E. Von Stebut, S. Mendez, R. Lira, E. Caler, S. Bertholet, M. C. Udey and D. Sacks (2002b). "CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*." *J Immunol* **168**(8): 3992-4000.
- Ben-Ahmed, K., K. Aoun, F. Jeddi, J. Ghrab, M. A. El-Aroui and A. Bouratbine (2009). "Visceral leishmaniasis in Tunisia: spatial distribution and association with climatic factors." *Am J Trop Med Hyg* **81**(1): 40-45.
- Ben-Ismail, R., S. Khaled, S. Makni and M. S. Ben Rachid (1989). "Anti-leishmanial antibodies during natural infection of *Psammomys obesus* and *Meriones shawi* (Rodentia, Gerbillinae) by *Leishmania major*." *Ann Soc Belg Med Trop* **69**(1): 35-40.
- Ben Ismail, R., L. Gradoni, M. Gramiccia, S. Bettini, M. S. Ben Rachid and A. Garraoui (1986). "Epidemic cutaneous leishmaniasis in Tunisia: biochemical characterization of parasites." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **80**(4): 669-670.
- Ben Ismail, R., M. Gramiccia, L. Gradoni, H. Helal and M. S. Ben Rachid (1987). "Isolation of *Leishmania major* from *Phlebotomus papatasi* in Tunisia." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **81**(5): 749.
- Ben Salah, A., H. Louzir, S. Chlif, M. Mokni, A. Zaatour, M. Raouene, R. B. Ismail and K. Dellagi (2005). "The predictive validity of naturally acquired delayed-type hypersensitivity to leishmanin in resistance to *Leishmania major*-associated cutaneous leishmaniasis." *J Infect Dis* **192**(11): 1981-1987.
- Bertholet, S., A. Debrabant, F. Afrin, E. Caler, S. Mendez, K. S. Tabbara, Y. Belkaid and D. L. Sacks (2005). "Antigen requirements for efficient priming of CD8+ T cells by *Leishmania major*-infected dendritic cells." *Infect Immun* **73**(10): 6620-6628.
- Bertholet, S., R. Goldszmid, A. Morrot, A. Debrabant, F. Afrin, C. Collazo-Custodio, M. Houde, M. Desjardins, A. Sher and D. Sacks (2006). "*Leishmania* antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo." *J Immunol* **177**(6): 3525-3533.
- Bettaieb, J., A. Toumi, S. Chlif, B. Chelghaf, A. Boukthir, A. Gharbi and A. Ben Salah (2014). "Prevalence and determinants of *Leishmania major* infection in emerging and old foci in Tunisia." *Parasit Vectors* **7**: 386.

- Bhaumik, S., R. Basu, S. Sen, K. Naskar and S. Roy (2009). "KMP-11 DNA immunization significantly protects against *L. donovani* infection but requires exogenous IL-12 as an adjuvant for comparable protection against *L. major*." *Vaccine* **27**(9): 1306-1316.
- Bjorkman, P. J. and P. Parham (1990). "Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules." *Annu Rev Biochem* **59**: 253-288.
- Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger and D. C. Wiley (1987). "Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2." *Nature* **329**(6139): 506-512.
- Blum, J. S., P. A. Wearsch and P. Cresswell (2013). "Pathways of antigen processing." *Annu Rev Immunol* **31**: 443-473.
- Bogdan, C., M. Rollinghoff and A. Diefenbach (2000). "The role of nitric oxide in innate immunity." *Immunol Rev* **173**: 17-26.
- Borja-Cabrera, G. P., N. N. Correia Pontes, V. O. da Silva, E. Paraguai de Souza, W. R. Santos, E. M. Gomes, K. G. Luz, M. Palatnik and C. B. Palatnik de Sousa (2002). "Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN)." *Vaccine* **20**(27-28): 3277-3284.
- Borja-Cabrera, G. P., F. N. Santos, F. S. Bauer, L. E. Parra, I. Menz, A. A. Morgado, I. S. Soares, L. M. Batista and C. B. Palatnik-de-Sousa (2008). "Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil." *Vaccine* **26**(39): 4991-4997.
- Bottrel, R. L., W. O. Dutra, F. A. Martins, B. Gontijo, E. Carvalho, M. Barral-Netto, A. Barral, R. P. Almeida, W. Mayrink, R. Locksley and K. J. Gollob (2001). "Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis." *Infect Immun* **69**(5): 3232-3239.
- Bouratbine, A., K. Aoun, J. Ghrab, Z. Harrat, M. S. Ezzedini and S. Etljani (2005). "Spread of *Leishmania killicki* to Central and South-West Tunisia." *Parasite* **12**(1): 59-63.
- Bourreau, E., G. Prevot, R. Pradinaud and P. Launois (2001). "Interleukin (IL)-13 is the predominant Th2 cytokine in localized cutaneous leishmaniasis lesions and renders specific CD4+ T cells unresponsive to IL-12." *J Infect Dis* **183**(6): 953-959.
- Bourreau, E., C. Ronet, P. Couppie, D. Sainte-Marie, F. Tacchini-Cottier and P. Launois (2007). "IL-10 producing CD8+ T cells in human infection with *Leishmania guyanensis*." *Microbes Infect* **9**(8): 1034-1041.

- Bousoffara, T., H. Louzir, A. Ben Salah and K. Dellagi (2004). "Analysis of granzyme B activity as a surrogate marker of Leishmania-specific cell-mediated cytotoxicity in zoonotic cutaneous leishmaniasis." *J Infect Dis* **189**(7): 1265-1273.
- Bousslimi, N., K. Aoun, I. Ben-Abda, N. Ben-Alaya-Bouafif, M. Raouane and A. Bouratbine (2010). "Epidemiologic and clinical features of cutaneous leishmaniasis in southeastern Tunisia." *Am J Trop Med Hyg* **83**(5): 1034-1039.
- Bousoffara, T., M. S. Boubaker, M. Ben Ahmed, M. Mokni, I. Guizani, A. Ben Salah and H. Louzir (2019). "Histological and immunological differences between zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* and sporadic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum*." *Parasite* **26**: 9.
- Bousoffara, T., S. Chelif, M. Ben Ahmed, M. Mokni, A. Ben Salah, K. Dellagi and H. Louzir (2018). "Immunity Against *Leishmania major* Infection: Parasite-Specific Granzyme B Induction as a Correlate of Protection." *Front Cell Infect Microbiol* **8**: 397.
- Bras-Goncalves, R., E. Petitdidier, J. Pagniez, R. Veyrier, P. Cibrelus, M. Cavaleyra, S. Maquaire, J. Moreaux and J. L. Lemesre (2014). "Identification and characterization of new *Leishmania* promastigote surface antigens, LaPSA-38S and LiPSA-50S, as major immunodominant excreted/secreted components of *L. amazonensis* and *L. infantum*." *Infect Genet Evol* **24**: 1-14.
- Breton, M., M. J. Tremblay, M. Ouellette and B. Papadopoulou (2005). "Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis." *Infect Immun* **73**(10): 6372-6382.
- Burza, S., S. L. Croft and M. Boelaert (2018). "Leishmaniasis." *Lancet* **392**(10151): 951-970.
- Calarota, S. A. and F. Baldanti (2013). "Enumeration and characterization of human memory T cells by enzyme-linked immunospot assays." *Clin Dev Immunol* **2013**: 637649.
- Cardinaud, S., R. Bouziat, P. S. Rohrlach, S. Tourdot, L. Weiss, P. Langlade-Demoyen, A. Burgevin, S. Fiorentino, P. van Endert and F. A. Lemonnier (2009). "Design of a HIV-1-derived HLA-B07.02-restricted polyepitope construct." *AIDS* **23**(15): 1945-1954.
- Carrera, L., R. T. Gazzinelli, R. Badolato, S. Hieny, W. Muller, R. Kuhn and D. L. Sacks (1996). "Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice." *J Exp Med* **183**(2): 515-526.
- Carvalho, A. M., A. Magalhaes, L. P. Carvalho, O. Bacellar, P. Scott and E. M. Carvalho (2013). "Immunologic response and memory T cells in subjects cured of tegumentary leishmaniasis." *BMC Infect Dis* **13**: 529.

- Carvalho, L. P., S. Passos, O. Bacellar, M. Lessa, R. P. Almeida, A. Magalhaes, W. O. Dutra, K. J. Gollob, P. Machado and A. R. de Jesus (2007). "Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis." *Parasite Immunol* **29**(5): 251-258.
- Castellano, L. R., D. C. Filho, L. Argiro, H. Dessen, A. Prata, A. Dessen and V. Rodrigues (2009). "Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production." *Hum Immunol* **70**(6): 383-390.
- Castelli, F. A., C. Buhot, A. Sanson, H. Zarour, S. Pouvelle-Moratille, C. Nonn, H. Gahery-Segard, J. G. Guillet, A. Menez, B. Georges and B. Maillere (2002). "HLA-DP4, the most frequent HLA II molecule, defines a new supertype of peptide-binding specificity." *J Immunol* **169**(12): 6928-6934.
- Castelli, F. A., M. Leleu, S. Pouvelle-Moratille, S. Farci, H. M. Zarour, M. Andrieu, C. Auriault, A. Menez, B. Georges and B. Maillere (2007). "Differential capacity of T cell priming in naive donors of promiscuous CD4+ T cell epitopes of HCV NS3 and Core proteins." *Eur J Immunol* **37**(6): 1513-1523.
- Castelli, F. A., N. Szely, A. Olivain, N. Casartelli, C. Grygar, A. Schneider, A. Besse, Y. Levy, O. Schwartz and B. Maillere (2013). "Hierarchy of CD4 T cell epitopes of the ANRS Lipo5 synthetic vaccine relies on the frequencies of pre-existing peptide-specific T cells in healthy donors." *J Immunol* **190**(11): 5757-5763.
- Castes, M., A. Agnelli, O. Verde and A. J. Rondon (1983). "Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis." *Clin Immunol Immunopathol* **27**(2): 176-186.
- Chaffai, M., M. S. Ben Rachid, R. Ben-Ismaïl, A. Ben Osman and N. Makni (1988). "[Clinico-epidemiologic forms of cutaneous leishmaniasis in Tunisia]." *Ann Dermatol Venereol* **115**(12): 1255-1260.
- Chakravarty, J., S. Kumar, S. Trivedi, V. K. Rai, A. Singh, J. A. Ashman, E. M. Laughlin, R. N. Coler, S. J. Kahn, A. M. Beckmann, K. D. Cowgill, S. G. Reed, S. Sundar and F. M. Piazza (2011). "A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis." *Vaccine* **29**(19): 3531-3537.
- Chamakh-Ayari, R., R. Bras-Goncalves, N. Bahi-Jaber, E. Petitdidier, W. Markikou-Ouni, K. Aoun, J. Moreno, E. Carrillo, P. Salotra, H. Kaushal, N. S. Negi, J. Arevalo, F. Falconi-Agapito, A. Privat, M. Cruz, J. Pagniez, G. M. Papierok, F. B. Rhouma, P. Torres, J. L. Lemesre, M. Chenik and A. Meddeb-Garnaoui (2014). "In vitro evaluation of a soluble *Leishmania* promastigote surface antigen as a potential vaccine candidate against human leishmaniasis." *PLoS One* **9**(5): e92708.

- Chamakh-Ayari, R., M. Chenik, A. S. Chakroun, N. Bahi-Jaber, K. Aoun and A. Meddeb-Garnaoui (2017). "Leishmania major large RAB GTPase is highly immunogenic in individuals immune to cutaneous and visceral leishmaniasis." *Parasit Vectors* **10**(1): 185.
- Chang, K. P. (1981). "Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes." *Am J Trop Med Hyg* **30**(2): 322-333.
- Chauhan, I. S., J. Kaur, S. Krishna, A. Ghosh, P. Singh, M. I. Siddiqi and N. Singh (2015). "Evolutionary comparison of prenylation pathway in kinetoplastid Leishmania and its sister Leptomonas." *BMC Evol Biol* **15**: 261.
- Chenik, M., N. Chaabouni, Y. Ben Achour-Chenik, M. Ouakad, I. Lakhel-Naouar, H. Louzir and K. Dellagi (2006a). "Identification of a new developmentally regulated Leishmania major large RAB GTPase." *Biochem Biophys Res Commun* **341**(2): 541-548.
- Chenik, M., H. Louzir, H. Ksontini, A. Dilou, I. Abdmouleh and K. Dellagi (2006b). "Vaccination with the divergent portion of the protein histone H2B of Leishmania protects susceptible BALB/c mice against a virulent challenge with Leishmania major." *Vaccine* **24**(14): 2521-2529.
- Cho, J. H., O. Boyman, H. O. Kim, B. Hahm, M. P. Rubinstein, C. Ramsey, D. M. Kim, C. D. Surh and J. Sprent (2007). "An intense form of homeostatic proliferation of naive CD8⁺ cells driven by IL-2." *J Exp Med* **204**(8): 1787-1801.
- Clarencio, J., C. I. de Oliveira, C. Favali, O. Medina, A. Caldas, C. H. Costa, D. L. Costa, C. Brodskyn, A. Barral and M. Barral-Netto (2009). "Could the lower frequency of CD8⁺CD18⁺CD45RO⁺ lymphocytes be biomarkers of human VL?" *Int Immunol* **21**(2): 137-144.
- Coler, R. N., Y. Goto, L. Bogatzki, V. Raman and S. G. Reed (2007). "Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4⁺ T cells." *Infect Immun* **75**(9): 4648-4654.
- Collin, M., N. McGovern and M. Haniffa (2013). "Human dendritic cell subsets." *Immunology* **140**(1): 22-30.
- Convit, J., M. E. Pinaridi and A. J. Rondon (1972). "Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **66**(4): 603-610.
- Croan, D. G., D. A. Morrison and J. T. Ellis (1997). "Evolution of the genus Leishmania revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences." *Mol Biochem Parasitol* **89**(2): 149-159.

- Cruz, A. K., R. Titus and S. M. Beverley (1993). "Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(4): 1599-1603.
- Currier, J. R., E. G. Kuta, E. Turk, L. B. Earhart, L. Loomis-Price, S. Janetzki, G. Ferrari, D. L. Birx and J. H. Cox (2002). "A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays." *J Immunol Methods* **260**(1-2): 157-172.
- Da-Cruz, A. M., A. L. Bertho, M. P. Oliveira-Neto and S. G. Coutinho (2005). "Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions." *Br J Dermatol* **153**(3): 537-543.
- Da-Cruz, A. M., R. Bittar, M. Mattos, M. P. Oliveira-Neto, R. Nogueira, V. Pinho-Ribeiro, R. B. Azeredo-Coutinho and S. G. Coutinho (2002). "T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy." *Clin Diagn Lab Immunol* **9**(2): 251-256.
- da Silva Santos, C. and C. I. Brodskyn (2014). "The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis." *Front Public Health* **2**: 165.
- Daneshvar, H., M. J. Namazi, H. Kamiabi, R. Burchmore, S. Cleaveland and S. Phillips (2014). "Gentamicin-attenuated *Leishmania infantum* vaccine: protection of dogs against canine visceral leishmaniosis in endemic area of southeast of Iran." *PLoS Negl Trop Dis* **8**(4): e2757.
- Darrah, P. A., D. T. Patel, P. M. De Luca, R. W. Lindsay, D. F. Davey, B. J. Flynn, S. T. Hoff, P. Andersen, S. G. Reed, S. L. Morris, M. Roederer and R. A. Seder (2007). "Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*." *Nat Med* **13**(7): 843-850.
- Das, S., A. Freier, T. Boussoffara, S. Das, D. Oswald, F. O. Losch, M. Selka, N. Sacerdoti-Sierra, G. Schonian, K. H. Wiesmuller, K. Seifert, M. Schroff, C. Juhls, C. L. Jaffe, S. Roy, P. Das, H. Louzir, S. L. Croft, F. Modabber and P. Walden (2014). "Modular multiantigen T cell epitope-enriched DNA vaccine against human leishmaniasis." *Sci Transl Med* **6**(234): 234ra256.
- Dausset, J. (1958). "[Iso-leuko-antibodies]." *Acta Haematol* **20**(1-4): 156-166.
- De Brito, R. C. F., J. M. O. Cardoso, L. E. S. Reis, J. F. Vieira, F. A. S. Mathias, B. M. Roatt, R. Aguiar-Soares, J. C. Ruiz, D. M. Resende and A. B. Reis (2018). "Peptide Vaccines for Leishmaniasis." *Front Immunol* **9**: 1043.
- de Oliveira Mendes-Aguiar, C., R. Vieira-Goncalves, L. H. Guimaraes, M. P. de Oliveira-Neto, E. M. Carvalho and A. M. Da-Cruz (2016). "Effector memory CD4(+) T cells differentially express activation associated molecules depending on the duration of American cutaneous leishmaniasis lesions." *Clin Exp Immunol* **185**(2): 202-209.

- del Guercio, M. F., J. Sidney, G. Hermanson, C. Perez, H. M. Grey, R. T. Kubo and A. Sette (1995). "Binding of a peptide antigen to multiple HLA alleles allows definition of an A2-like supertype." *J Immunol* **154**(2): 685-693.
- Delgado, G., C. A. Parra-Lopez, L. E. Vargas, R. Hoya, M. Estupinan, F. Guzman, A. Torres, C. Alonso, I. D. Velez, C. Spinel and M. E. Patarroyo (2003). "Characterizing cellular immune response to kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) during *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* infection using dendritic cells (DCs) as antigen presenting cells (APCs)." *Parasite Immunol* **25**(4): 199-209.
- Desjeux, P. (2001). "The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **95**(3): 239-243.
- Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **27**(5): 305-318.
- Devault, A. and A. L. Banuls (2008). "The promastigote surface antigen gene family of the *Leishmania* parasite: differential evolution by positive selection and recombination." *BMC Evol Biol* **8**: 292.
- Diamond, D. J., J. York, J. Y. Sun, C. L. Wright and S. J. Forman (1997). "Development of a candidate HLA A*0201 restricted peptide-based vaccine against human cytomegalovirus infection." *Blood* **90**(5): 1751-1767.
- Dias, D. S., P. A. F. Ribeiro, V. T. Martins, D. P. Lage, L. E. Costa, M. A. Chavez-Fumagalli, F. F. Ramos, T. T. O. Santos, F. Ludolf, J. S. Oliveira, T. A. O. Mendes, E. S. Silva, A. S. Galdino, M. C. Duarte, B. M. Roatt, D. Menezes-Souza, A. L. Teixeira and E. A. F. Coelho (2018). "Vaccination with a CD4(+) and CD8(+) T-cell epitopes-based recombinant chimeric protein derived from *Leishmania infantum* proteins confers protective immunity against visceral leishmaniasis." *Transl Res* **200**: 18-34.
- Diaz, N. L., F. A. Arvelaez, O. Zerpa and F. J. Tapia (2006). "Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis." *Clin Exp Dermatol* **31**(1): 114-117.
- Diefenbach, A., H. Schindler, N. Donhauser, E. Lorenz, T. Laskay, J. MacMicking, M. Rollinghoff, I. Gresser and C. Bogdan (1998). "Type 1 interferon (IFN α / β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite." *Immunity* **8**(1): 77-87.
- Dikhit, M. R., A. Amit, A. K. Singh, A. Kumar, R. Mansuri, S. Sinha, R. K. Topno, R. Mishra, V. N. R. Das, K. Pandey, G. C. Sahoo, V. Ali, S. Bimal and P. Das (2017a). "Vaccine potential of HLA-A2 epitopes from *Leishmania* Cysteine Protease Type III (CPC)." *Parasite Immunol* **39**(9).

Dikhit, M. R., S. Das, V. Mahantesh, A. Kumar, A. K. Singh, B. Dehury, A. K. Rout, V. Ali, G. C. Sahoo, R. K. Topno, K. Pandey, V. N. R. Das, S. Bimal and P. Das (2018a). "The potential HLA Class I-restricted epitopes derived from LeIF and TSA of *Leishmania donovani* evoke anti-leishmania CD8⁺ T lymphocyte response." *Sci Rep* **8**(1): 14175.

Dikhit, M. R., A. Kumar, S. Das, B. Dehury, A. K. Rout, F. Jamal, G. C. Sahoo, R. K. Topno, K. Pandey, V. N. R. Das, S. Bimal and P. Das (2017b). "Identification of Potential MHC Class-II-Restricted Epitopes Derived from *Leishmania donovani* Antigens by Reverse Vaccinology and Evaluation of Their CD4⁺ T-Cell Responsiveness against Visceral Leishmaniasis." *Front Immunol* **8**: 1763.

Dikhit, M. R., Vijayamahantesh, A. Kumar, A. Amit, B. Dehury, Y. P. Nathsharma, M. Y. Ansari, V. Ali, R. K. Topno, V. Das, K. Pandey, G. C. Sahoo, S. Bimal and P. Das (2018b). "Mining the Proteome of *Leishmania donovani* for the Development of Novel MHC Class I Restricted Epitope for the Control of Visceral Leishmaniasis." *J Cell Biochem* **119**(1): 378-391.

Diniz, J. L., M. O. Costa and D. U. Goncalves (2011). "Mucocutaneous Leishmaniasis: clinical markers in presumptive diagnosis." *Braz J Otorhinolaryngol* **77**(3): 380-384.

Dostalova, A. and P. Volf (2012). "Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview." *Parasit Vectors* **5**: 276.

Doytchinova, I. A. and D. R. Flower (2005). "In silico identification of supertypes for class II MHCs." *J Immunol* **174**(11): 7085-7095.

Durier, C., O. Launay, V. Meiffredy, Y. Saidi, D. Salmon, Y. Levy, J. G. Guillet, G. Pialoux and J. P. Aboulker (2006). "Clinical safety of HIV lipopeptides used as vaccines in healthy volunteers and HIV-infected adults." *AIDS* **20**(7): 1039-1049.

Duvall, M. G., M. L. Precopio, D. A. Ambrozak, A. Jaye, A. J. McMichael, H. C. Whittle, M. Roederer, S. L. Rowland-Jones and R. A. Koup (2008). "Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection." *Eur J Immunol* **38**(2): 350-363.

Egui, A., D. Ledesma, E. Perez-Anton, A. Montoya, I. Gomez, S. M. Robledo, J. J. Infante, I. D. Velez, M. C. Lopez and M. C. Thomas (2018). "Phenotypic and Functional Profiles of Antigen-Specific CD4(+) and CD8(+) T Cells Associated With Infection Control in Patients With Cutaneous Leishmaniasis." *Front Cell Infect Microbiol* **8**: 393.

Eidsmo, L., S. Nysten, A. Khamesipour, M. A. Hedblad, F. Chiodi and H. Akuffo (2005). "The contribution of the Fas/FasL apoptotic pathway in ulcer formation during *Leishmania major*-induced cutaneous Leishmaniasis." *Am J Pathol* **166**(4): 1099-1108.

Elfaki, M. E., E. A. Khalil, A. S. De Groot, A. M. Musa, A. Gutierrez, B. M. Younis, K. A. Salih and A. M. El-Hassan (2012). "Immunogenicity and immune modulatory effects of in

silico predicted *L. donovani* candidate peptide vaccines." *Hum Vaccin Immunother* **8**(12): 1769-1774.

Elhassan, A. M., M. S. Ali, E. Zijlstra, I. A. Eltoun, H. W. Ghalib and H. M. Ahmed (1992). "Post-kala-azar dermal leishmaniasis in the Sudan: peripheral neural involvement." *Int J Dermatol* **31**(6): 400-403.

Farber, D. L., N. A. Yudanin and N. P. Restifo (2014). "Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis." *Nat Rev Immunol* **14**(1): 24-35.

Faria, D. R., P. E. Souza, F. V. Duraes, E. M. Carvalho, K. J. Gollob, P. R. Machado and W. O. Dutra (2009). "Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis." *Parasite Immunol* **31**(8): 432-439.

Fernandes, A. P., M. M. Costa, E. A. Coelho, M. S. Michalick, E. de Freitas, M. N. Melo, W. Luiz Tafuri, M. Resende Dde, V. Hermont, F. Abrantes Cde and R. T. Gazzinelli (2008). "Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein." *Vaccine* **26**(46): 5888-5895.

Fernandez, L., E. Carrillo, L. Sanchez-Sampedro, C. Sanchez, A. V. Ibarra-Meneses, M. A. Jimenez, V. D. A. Almeida, M. Esteban and J. Moreno (2018). "Antigenicity of *Leishmania*-Activated C-Kinase Antigen (LACK) in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, and Protective Effect of Prime-Boost Vaccination With pCI-neo-LACK Plus Attenuated LACK-Expressing Vaccinia Viruses in Hamsters." *Front Immunol* **9**: 843.

Foulds, K. E., M. J. Rotte, M. A. Paley, B. Singh, D. C. Douek, B. J. Hill, J. J. O'Shea, W. T. Watford, R. A. Seder and C. Y. Wu (2008). "IFN-gamma mediates the death of Th1 cells in a paracrine manner." *J Immunol* **180**(2): 842-849.

Gaafar, A., A. Kharazmi, A. Ismail, M. Kemp, A. Hey, C. B. Christensen, M. Dafalla, A. Y. el Kadar, A. M. el Hassan and T. G. Theander (1995). "Dichotomy of the T cell response to *Leishmania* antigens in patients suffering from cutaneous leishmaniasis; absence or scarcity of Th1 activity is associated with severe infections." *Clin Exp Immunol* **100**(2): 239-245.

Gahery-Segard, H., G. Pialoux, B. Charmeteau, S. Sermet, H. Poncelet, M. Raux, A. Tartar, J. P. Levy, H. Gras-Masse and J. G. Guillet (2000). "Multiepitopic B- and T-cell responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine." *J Virol* **74**(4): 1694-1703.

Gama, M. E., J. M. Costa, J. C. Pereira, C. M. Gomes and C. E. Corbett (2004). "Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis." *Braz J Med Biol Res* **37**(1): 129-136.

Garnham, P. C. (1971). "The genus *Leishmania*." *Bull World Health Organ* **44**(4): 477-489.

Gaze, S. T., W. O. Dutra, M. Lessa, H. Lessa, L. H. Guimaraes, A. R. Jesus, L. P. Carvalho, P. Machado, E. M. Carvalho and K. J. Gollob (2006). "Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population." *Scand J Immunol* **63**(1): 70-78.

Gebhardt, T., L. M. Wakim, L. Eidsmo, P. C. Reading, W. R. Heath and F. R. Carbone (2009). "Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus." *Nat Immunol* **10**(5): 524-530.

Gentilini, M. (2012). *Médecine tropicale - 6e édition* Book.

Genton, B., G. Pluschke, L. Degen, A. R. Kammer, N. Westerfeld, S. L. Okitsu, S. Schroller, P. Vounatsou, M. M. Mueller, M. Tanner and R. Zurbriggen (2007). "A randomized placebo-controlled phase Ia malaria vaccine trial of two virosome-formulated synthetic peptides in healthy adult volunteers." *PLoS One* **2**(10): e1018.

Gillespie, P. M., C. M. Beaumier, U. Strych, T. Hayward, P. J. Hotez and M. E. Bottazzi (2016). "Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis." *Vaccine* **34**(26): 2992-2995.

Glennie, N. D. and P. Scott (2016). "Memory T cells in cutaneous leishmaniasis." *Cell Immunol* **309**: 50-54.

Glennie, N. D., S. W. Volk and P. Scott (2017). "Skin-resident CD4+ T cells protect against *Leishmania major* by recruiting and activating inflammatory monocytes." *PLoS Pathog* **13**(4): e1006349.

Glennie, N. D., V. A. Yeramilli, D. P. Beiting, S. W. Volk, C. T. Weaver and P. Scott (2015). "Skin-resident memory CD4+ T cells enhance protection against *Leishmania major* infection." *J Exp Med* **212**(9): 1405-1414.

Global Burden of Disease Study, C. (2015). "Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013." *Lancet* **386**(9995): 743-800.

Gollob, K. J., L. R. Antonelli and W. O. Dutra (2005). "Insights into CD4+ memory T cells following *Leishmania* infection." *Trends Parasitol* **21**(8): 347-350.

Gollob, K. J., A. G. Viana and W. O. Dutra (2014). "Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection." *Parasite Immunol* **36**(8): 367-376.

Gonzalez-Lombana, C., C. Gimblet, O. Bacellar, W. W. Oliveira, S. Passos, L. P. Carvalho, M. Goldschmidt, E. M. Carvalho and P. Scott (2013). "IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection." *PLoS Pathog* **9**(3): e1003243.

- Goydos, J. S., E. Elder, T. L. Whiteside, O. J. Finn and M. T. Lotze (1996). "A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine. Induction of specific immune reactivity in patients with adenocarcinoma." *J Surg Res* **63**(1): 298-304.
- Greenbaum, J., J. Sidney, J. Chung, C. Brander, B. Peters and A. Sette (2011). "Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes." *Immunogenetics* **63**(6): 325-335.
- Greenblatt, C. L. (1980). "The present and future of vaccination for cutaneous leishmaniasis." *Prog Clin Biol Res* **47**: 259-285.
- Grimaldi, G., Jr., R. B. Tesh and D. McMahon-Pratt (1989). "A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World." *Am J Trop Med Hyg* **41**(6): 687-725.
- Gueirard, P., A. Laplante, C. Rondeau, G. Milon and M. Desjardins (2008). "Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages." *Cell Microbiol* **10**(1): 100-111.
- Guerfali, F. Z., H. Ben-Abdallah, R. M. Sghaier, K. Ben-Aissa, G. Mkannez, H. Attia and D. Laouini (2009). "An in silico immunological approach for prediction of CD8⁺ T cell epitopes of *Leishmania major* proteins in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 murine models of infection." *Infect Genet Evol* **9**(3): 344-350.
- Guermontprez, P., L. Saveanu, M. Kleijmeer, J. Davoust, P. Van Endert and S. Amigorena (2003). "ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells." *Nature* **425**(6956): 397-402.
- Guerra, J. A., S. R. Prestes, H. Silveira, L. I. Coelho, P. Gama, A. Moura, V. Amato, M. Barbosa and L. C. Ferreira (2011). "Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon." *PLoS Negl Trop Dis* **5**(3): e980.
- Guimaraes-Costa, A. B., M. T. Nascimento, G. S. Froment, R. P. Soares, F. N. Morgado, F. Conceicao-Silva and E. M. Saraiva (2009). "*Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(16): 6748-6753.
- Gurung, P. and T. D. Kanneganti (2015). "Innate immunity against *Leishmania* infections." *Cell Microbiol* **17**(9): 1286-1294.
- Gutierrez, Y., G. H. Salinas, G. Palma, L. B. Valderrama, C. V. Santrich and N. G. Saravia (1991). "Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection." *Am J Trop Med Hyg* **45**(3): 281-289.

- Hamze, M., S. Meunier, A. Karle, A. Gdoura, A. Goudet, N. Szely, M. Pallardy, F. Carbonnel, S. Spindeldreher, X. Mariette, C. Miceli-Richard and B. Maillere (2017). "Characterization of CD4 T Cell Epitopes of Infliximab and Rituximab Identified from Healthy Donors." *Front Immunol* **8**: 500.
- Handman, E., F. M. Symons, T. M. Baldwin, J. M. Curtis and J. P. Scheerlinck (1995). "Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response." *Infect Immun* **63**(11): 4261-4267.
- Hashiguchi, Y., E. L. Gomez, H. Kato, L. R. Martini, L. N. Velez and H. Uezato (2016). "Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review." *Trop Med Health* **44**: 2.
- Heinzel, F. P., M. D. Sadick, B. J. Holaday, R. L. Coffman and R. M. Locksley (1989). "Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets." *J Exp Med* **169**(1): 59-72.
- Henrickson, S. E., T. R. Mempel, I. B. Mazo, B. Liu, M. N. Artyomov, H. Zheng, A. Peixoto, M. P. Flynn, B. Senman, T. Junt, H. C. Wong, A. K. Chakraborty and U. H. von Andrian (2008). "T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation." *Nat Immunol* **9**(3): 282-291.
- Hernandez-Ruiz, J., N. Salaiza-Suazo, G. Carrada, S. Escoto, A. Ruiz-Remigio, Y. Rosenstein, A. Zentella and I. Becker (2010). "CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists." *PLoS Negl Trop Dis* **4**(11): e871.
- Hirayama, M. and Y. Nishimura (2016). "The present status and future prospects of peptide-based cancer vaccines." *Int Immunol* **28**(7): 319-328.
- Holaday, B. J., M. M. Pompeu, S. Jeronimo, M. J. Texeira, A. Sousa Ade, A. W. Vasconcelos, R. D. Pearson, J. S. Abrams and R. M. Locksley (1993). "Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala azar." *J Clin Invest* **92**(6): 2626-2632.
- Hoseini, S. G., S. H. Javanmard, S. H. Zarkesh, A. Khamesipour, L. Rafiei, K. Karbalaie, M. Nilforoushzade, M. Baghaei and S. H. Hejazi (2012). "Regulatory T-cell profile in early and late lesions of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*." *J Res Med Sci* **17**(6): 513-518.
- Houde, M., S. Bertholet, E. Gagnon, S. Brunet, G. Goyette, A. Laplante, M. F. Princiotta, P. Thibault, D. Sacks and M. Desjardins (2003). "Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation." *Nature* **425**(6956): 402-406.

- Hu, X., P. K. Paik, J. Chen, A. Yarilina, L. Kockeritz, T. T. Lu, J. R. Woodgett and L. B. Ivashkiv (2006). "IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins." *Immunity* **24**(5): 563-574.
- Huber, M., E. Timms, T. W. Mak, M. Rollinghoff and M. Lohoff (1998). "Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice." *Infect Immun* **66**(8): 3968-3970.
- Iborra, S., M. Soto, J. Carrion, C. Alonso and J. M. Requena (2004). "Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis." *Vaccine* **22**(29-30): 3865-3876.
- Jafari, I., V. Heravi Shargh, M. Shahryari, A. Abbasi, M. R. Jaafari, A. Khamesipour and A. Badiie (2018). "Cationic liposomes formulated with a novel whole *Leishmania lysate* (WLL) as a vaccine for leishmaniasis in murine model." *Immunobiology* **223**(6-7): 493-500.
- Jardim, A., J. Alexander, H. S. Teh, D. Ou and R. W. Olafson (1990). "Immunoprotective *Leishmania major* synthetic T cell epitopes." *J Exp Med* **172**(2): 645-648.
- Jiang, X., R. A. Clark, L. Liu, A. J. Wagers, R. C. Fuhlbrigge and T. S. Kupper (2012). "Skin infection generates non-migratory memory CD8⁺ T(RM) cells providing global skin immunity." *Nature* **483**(7388): 227-231.
- Joshi, S., N. K. Yadav, K. Rawat, V. Kumar, R. Ali, A. A. Sahasrabudhe, M. I. Siddiqi, W. Haq, S. Sundar and A. Dube (2019). "Immunogenicity and Protective Efficacy of T-Cell Epitopes Derived From Potential Th1 Stimulatory Proteins of *Leishmania (Leishmania) donovani*." *Front Immunol* **10**: 288.
- Kamil, A. A., E. A. Khalil, A. M. Musa, F. Modabber, M. M. Mukhtar, M. E. Ibrahim, E. E. Zijlstra, D. Sacks, P. G. Smith, F. Zicker and A. M. El-Hassan (2003). "Alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* plus bacille Calmette-Guerrin, a candidate vaccine for visceral leishmaniasis: safety, skin-delayed type hypersensitivity response and dose finding in healthy volunteers." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **97**(3): 365-368.
- Kammoun-Rebai, W., I. Naouar, V. Libri, M. Albert, H. Louzir, A. Meddeb-Garnaoui and D. Duffy (2016). "Protein biomarkers discriminate *Leishmania major*-infected and non-infected individuals in areas endemic for cutaneous leishmaniasis." *BMC Infect Dis* **16**: 138.
- Kane, M. M. and D. M. Mosser (2001). "The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis." *J Immunol* **166**(2): 1141-1147.
- Kannanganat, S., B. G. Kapogiannis, C. Ibegbu, L. Chennareddi, P. Goepfert, H. L. Robinson, J. Lennox and R. R. Amara (2007). "Human immunodeficiency virus type 1 controllers but not noncontrollers maintain CD4 T cells coexpressing three cytokines." *J Virol* **81**(21): 12071-12076.

Kaushal, H., R. Bras-Goncalves, K. Avishek, D. Kumar Deep, E. Petitdidier, J. L. Lemesre, G. Papierok, S. Kumar, V. Ramesh and P. Salotra (2016). "Evaluation of cellular immunological responses in mono- and polymorphic clinical forms of post-kala-azar dermal leishmaniasis in India." *Clin Exp Immunol* **185**(1): 50-60.

Kaushal, H., R. Bras-Goncalves, N. S. Negi, J. L. Lemesre, G. Papierok and P. Salotra (2014). "Role of CD8(+) T cells in protection against *Leishmania donovani* infection in healed Visceral Leishmaniasis individuals." *BMC Infect Dis* **14**: 653.

Kaye, P. M. and T. Aebischer (2011). "Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine." *Clin Microbiol Infect* **17**(10): 1462-1470.

Kedzierska, K., J. M. Curtis, S. A. Valkenburg, L. A. Hatton, H. Kiu, P. C. Doherty and L. Kedzierski (2012). "Induction of protective CD4+ T cell-mediated immunity by a *Leishmania* peptide delivered in recombinant influenza viruses." *PLoS One* **7**(3): e33161.

Kedzierski, L., J. Montgomery, D. Bullen, J. Curtis, E. Gardiner, A. Jimenez-Ruiz and E. Handman (2004). "A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3." *J Immunol* **172**(8): 4902-4906.

Kemp, M., E. Handman, K. Kemp, A. Ismail, M. D. Mustafa, A. Y. Kordofani, K. Bendtzen, A. Kharazmi and T. G. Theander (1998). "The *Leishmania* promastigote surface antigen-2 (PSA-2) is specifically recognised by Th1 cells in humans with naturally acquired immunity to *L. major*." *FEMS Immunol Med Microbiol* **20**(3): 209-218.

Kemp, M., A. S. Hey, J. A. Kurtzhals, C. B. Christensen, A. Gaafar, M. D. Mustafa, A. A. Kordofani, A. Ismail, A. Kharazmi and T. G. Theander (1994). "Dichotomy of the human T cell response to *Leishmania* antigens. I. Th1-like response to *Leishmania major* promastigote antigens in individuals recovered from cutaneous leishmaniasis." *Clin Exp Immunol* **96**(3): 410-415.

Kemp, M., J. A. Kurtzhals, A. Kharazmi and T. G. Theander (1993). "Interferon-gamma and interleukin-4 in human *Leishmania donovani* infections." *Immunol Cell Biol* **71** (Pt 6): 583-587.

Keshavarz Valian, H., M. Nateghi Rostami, M. Tasbihi, A. Miramin Mohammadi, S. E. Eskandari, A. Sarrafnejad and A. Khamesipour (2013). "CCR7+ central and CCR7- effector memory CD4+ T cells in human cutaneous leishmaniasis." *J Clin Immunol* **33**(1): 220-234.

Khamesipour, A., M. Nateghi Rostami, M. Tasbihi, A. Miramin Mohammadi, T. Shahrestani, A. Sarrafnejad, Y. Sohrabi, S. E. Eskandari and H. Keshavarz Valian (2012). "Phenotyping of circulating CD8(+) T cell subsets in human cutaneous leishmaniasis." *Microbes Infect* **14**(9): 702-711.

Khan, K. H. (2013). "DNA vaccines: roles against diseases." *Germs* **3**(1): 26-35.

Khorasanizadeh, S. (2004). "The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation." *Cell* **116**(2): 259-272.

Kima, P. E., N. H. Ruddle and D. McMahon-Pratt (1997). "Presentation via the class I pathway by *Leishmania amazonensis*-infected macrophages of an endogenous leishmanial antigen to CD8⁺ T cells." *J Immunol* **159**(4): 1828-1834.

Kima, P. E. and L. Soong (2013). "Interferon gamma in leishmaniasis." *Front Immunol* **4**: 156.

Kopf, M., F. Brombacher, G. Kohler, G. Kienzle, K. H. Widmann, K. Lefrang, C. Humborg, B. Ledermann and W. Solbach (1996). "IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*." *J Exp Med* **184**(3): 1127-1136.

Kumar, A. and M. Samant (2016). "DNA vaccine against visceral leishmaniasis: a promising approach for prevention and control." *Parasite Immunol* **38**(5): 273-281.

Kumar, P., P. Misra, C. P. Thakur, A. Saurabh, N. Rishi and D. K. Mitra (2018). "T cell suppression in the bone marrow of visceral leishmaniasis patients: impact of parasite load." *Clin Exp Immunol* **191**(3): 318-327.

Kurkjian, K. M., A. J. Mahmutovic, K. L. Kellar, R. Haque, C. Bern and W. E. Secor (2006). "Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis." *Cytometry A* **69**(5): 353-358.

Lakhal-Naouar, I., B. M. Slike, N. E. Aronson and M. A. Marovich (2015). "The Immunology of a Healing Response in Cutaneous Leishmaniasis Treated with Localized Heat or Systemic Antimonial Therapy." *PLoS Negl Trop Dis* **9**(10): e0004178.

Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2005). "Understanding the generation and function of memory T cell subsets." *Curr Opin Immunol* **17**(3): 326-332.

Laskay, T., G. van Zandbergen and W. Solbach (2003). "Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?" *Trends Microbiol* **11**(5): 210-214.

Laskay, T., G. van Zandbergen and W. Solbach (2008). "Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor." *Immunobiology* **213**(3-4): 183-191.

Launay, O., C. Durier, C. Desaint, B. Silbermann, A. Jackson, G. Pialoux, B. Bonnet, I. Poizot-Martin, G. Gonzalez-Canali, L. Cuzin, S. Figueredo, M. Surenaud, N. Ben Hamouda, H. Gahery, J. Choppin, D. Salmon, C. Guerin, I. Bourgault Villada, J. G. Guillet and A. V. S. Group (2007). "Cellular immune responses induced with dose-sparing intradermal

administration of HIV vaccine to HIV-uninfected volunteers in the ANRS VAC16 trial." *PLoS One* **2**(8): e725.

Laurenti, M. D., C. N. Rossi, V. L. da Matta, T. Y. Tomokane, C. E. Corbett, N. F. Secundino, P. F. Pimenta and M. Marcondes (2013). "Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector." *Vet Parasitol* **196**(3-4): 296-300.

Lemesre, J. L., P. Holzmuller, M. Cavaleyra, R. B. Goncalves, G. Hottin and G. Papierok (2005). "Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes." *Vaccine* **23**(22): 2825-2840.

Lemesre, J. L., P. Holzmuller, R. B. Goncalves, G. Bourdoiseau, C. Hugnet, M. Cavaleyra and G. Papierok (2007). "Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial." *Vaccine* **25**(21): 4223-4234.

Levy, A., J. Pitcovski, S. Frankenburg, O. Elias, Y. Altuvia, H. Margalit, T. Peretz, J. Golenser and M. Lotem (2007). "A melanoma multiepitope polypeptide induces specific CD8⁺ T-cell response." *Cell Immunol* **250**(1-2): 24-30.

Lewinsohn, D. A., D. M. Lewinsohn and T. J. Scriba (2017). "Polyfunctional CD4(+) T Cells As Targets for Tuberculosis Vaccination." *Front Immunol* **8**: 1262.

Li, W., M. D. Joshi, S. Singhanian, K. H. Ramsey and A. K. Murthy (2014). "Peptide Vaccine: Progress and Challenges." *Vaccines (Basel)* **2**(3): 515-536.

Liew, F. Y., C. Parkinson, S. Millott, A. Severn and M. Carrier (1990). "Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis." *Immunology* **69**(4): 570-573.

Lima-Junior, J. D. C., F. N. Morgado and F. Conceicao-Silva (2017). "How Can Elispot Add Information to Improve Knowledge on Tropical Diseases?" *Cells* **6**(4).

Lin, L., G. Finak, K. Ushey, C. Seshadri, T. R. Hawn, N. Frahm, T. J. Scriba, H. Mahomed, W. Hanekom, P. A. Bart, G. Pantaleo, G. D. Tomaras, S. Rerks-Ngarm, J. Kaewkungwal, S. Nitayaphan, P. Pitisuttithum, N. L. Michael, J. H. Kim, M. L. Robb, R. J. O'Connell, N. Karasavvas, P. Gilbert, C. D. R. S, M. J. McElrath and R. Gottardo (2015). "COMPASS identifies T-cell subsets correlated with clinical outcomes." *Nat Biotechnol* **33**(6): 610-616.

Lindenstrom, T., E. M. Agger, K. S. Korsholm, P. A. Darrah, C. Aagaard, R. A. Seder, I. Rosenkrands and P. Andersen (2009). "Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells." *J Immunol* **182**(12): 8047-8055.

Liu, D. and J. E. Uzonna (2012). "The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response." *Front Cell Infect Microbiol* **2**: 83.

Livingston, B. D., C. Crimi, H. Grey, G. Ishioka, F. V. Chisari, J. Fikes, H. Grey, R. W. Chesnut and A. Sette (1997). "The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection." *J Immunol* **159**(3): 1383-1392.

Llanos-Cuentas, A., W. Calderon, M. Cruz, J. A. Ashman, F. P. Alves, R. N. Coler, L. Y. Bogatzki, S. Bertholet, E. M. Laughlin, S. J. Kahn, A. M. Beckmann, K. D. Cowgill, S. G. Reed and F. M. Piazza (2010). "A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine when used in combination with sodium stibogluconate for the treatment of mucosal leishmaniasis." *Vaccine* **28**(46): 7427-7435.

Loing, E., M. Andrieu, K. Thiam, D. Schorner, K. H. Wiesmuller, A. Hosmalin, G. Jung and H. Gras-Masse (2000). "Extension of HLA-A*0201-restricted minimal epitope by N epsilon-palmitoyl-lysine increases the life span of functional presentation to cytotoxic T cells." *J Immunol* **164**(2): 900-907.

Lopez, J. A., J. H. LeBowitz, S. M. Beverley, H. G. Rammensee and P. Overath (1993). "*Leishmania mexicana* promastigotes induce cytotoxic T lymphocytes in vivo that do not recognize infected macrophages." *Eur J Immunol* **23**(1): 217-223.

Lopez Kostka, S., S. Dinges, K. Griewank, Y. Iwakura, M. C. Udey and E. von Stebut (2009). "IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice." *J Immunol* **182**(5): 3039-3046.

Louzir, H., P. C. Melby, A. Ben Salah, H. Marrakchi, K. Aoun, R. Ben Ismail and K. Dellagi (1998). "Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*." *J Infect Dis* **177**(6): 1687-1695.

Lund, O., M. Nielsen, C. Kesmir, A. G. Petersen, C. Lundegaard, P. Worning, C. Sylvester-Hvid, K. Lamberth, G. Roder, S. Justesen, S. Buus and S. Brunak (2004). "Definition of supertypes for HLA molecules using clustering of specificity matrices." *Immunogenetics* **55**(12): 797-810.

Macdonald, W. A., A. W. Purcell, N. A. Mifsud, L. K. Ely, D. S. Williams, L. Chang, J. J. Gorman, C. S. Clements, L. Kjer-Nielsen, D. M. Koelle, S. R. Burrows, B. D. Tait, R. Holdsworth, A. G. Brooks, G. O. Lovrecz, L. Lu, J. Rossjohn and J. McCluskey (2003). "A naturally selected dimorphism within the HLA-B44 supertype alters class I structure, peptide repertoire, and T cell recognition." *J Exp Med* **198**(5): 679-691.

Macedo, A. B., J. C. Sanchez-Arcila, A. O. Schubach, S. C. Mendonca, A. Marins-Dos-Santos, M. de Fatima Madeira, T. Gagini, M. I. Pimentel and P. M. De Luca (2012).

"Multifunctional CD4(+) T cells in patients with American cutaneous leishmaniasis." *Clin Exp Immunol* **167**(3): 505-513.

Machado, P. R., M. E. Rosa, D. Costa, M. Mignac, J. S. Silva, A. Schriefer, M. M. Teixeira, O. Bacellar and E. M. Carvalho (2011). "Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **105**(8): 438-444.

Maretti-Mira, A. C., J. Bittner, M. P. Oliveira-Neto, M. Liu, D. Kang, H. Li, C. Pirmez and N. Craft (2012). "Transcriptome patterns from primary cutaneous *Leishmania braziliensis* infections associate with eventual development of mucosal disease in humans." *PLoS Negl Trop Dis* **6**(9): e1816.

Martinez-Lopez, M., S. Iborra, R. Conde-Garrosa and D. Sancho (2015). "Batf3-dependent CD103+ dendritic cells are major producers of IL-12 that drive local Th1 immunity against *Leishmania* major infection in mice." *Eur J Immunol* **45**(1): 119-129.

Martins, V. T., M. C. Duarte, D. P. Lage, L. E. Costa, A. M. Carvalho, T. A. Mendes, B. M. Roatt, D. Menezes-Souza, M. Soto and E. A. Coelho (2017). "A recombinant chimeric protein composed of human and mice-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell epitopes protects against visceral leishmaniasis." *Parasite Immunol* **39**(1).

Mary, C., V. Auriault, B. Faugere and A. J. Dessein (1999). "Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigen-specific T cells." *Infect Immun* **67**(11): 5559-5566.

Masopust, D., V. Vezys, A. L. Marzo and L. Lefrancois (2001). "Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue." *Science* **291**(5512): 2413-2417.

Mazumder, S., M. Maji, A. Das and N. Ali (2011). "Potency, efficacy and durability of DNA/DNA, DNA/protein and protein/protein based vaccination using gp63 against *Leishmania donovani* in BALB/c mice." *PLoS One* **6**(2): e14644.

Meddeb-Garnaoui, A., A. Toumi, H. Ghelis, M. Mahjoub, H. Louzir and M. Chenik (2010). "Cellular and humoral responses induced by *Leishmania* histone H2B and its divergent and conserved parts in cutaneous and visceral leishmaniasis patients, respectively." *Vaccine* **28**(7): 1881-1886.

Medrano, F. J., J. Hernandez-Quero, E. Jimenez, J. A. Pineda, A. Rivero, A. Sanchez-Quijano, I. D. Velez, P. Viciano, R. Castillo, M. J. Reyes and et al. (1992). "Visceral leishmaniasis in HIV-1-infected individuals: a common opportunistic infection in Spain?" *AIDS* **6**(12): 1499-1503.

Melby, P. C., F. J. Andrade-Narvaez, B. J. Darnell, G. Valencia-Pacheco, V. V. Tryon and A. Palomo-Cetina (1994). "Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis." *Infect Immun* **62**(3): 837-842.

- Melief, C. J. M. and J. H. Kessler (2017). "Novel insights into the HLA class I immunopeptidome and T-cell immunosurveillance." *Genome Med* **9**(1): 44.
- Mempel, T. R., S. E. Henrickson and U. H. Von Andrian (2004). "T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases." *Nature* **427**(6970): 154-159.
- Mendez, S., S. K. Reckling, C. A. Piccirillo, D. Sacks and Y. Belkaid (2004). "Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity." *J Exp Med* **200**(2): 201-210.
- Miles, S. A., S. M. Conrad, R. G. Alves, S. M. Jeronimo and D. M. Mosser (2005). "A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*." *J Exp Med* **201**(5): 747-754.
- Mohrs, M., B. Ledermann, G. Kohler, A. Dorfmueller, A. Gessner and F. Brombacher (1999). "Differences between IL-4- and IL-4 receptor alpha-deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling." *J Immunol* **162**(12): 7302-7308.
- Molina, R., C. Amela, J. Nieto, M. San-Andres, F. Gonzalez, J. A. Castillo, J. Lucientes and J. Alvar (1994). "Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **88**(4): 491-493.
- Mollinedo, F., H. Janssen, J. de la Iglesia-Vicente, J. A. Villa-Pulgarin and J. Calafat (2010). "Selective fusion of azurophilic granules with *Leishmania*-containing phagosomes in human neutrophils." *J Biol Chem* **285**(45): 34528-34536.
- Moon, J. J., H. H. Chu, M. Pepper, S. J. McSorley, S. C. Jameson, R. M. Kedl and M. K. Jenkins (2007). "Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude." *Immunity* **27**(2): 203-213.
- Mou, Z., J. Li, T. Boussoffara, H. Kishi, H. Hamana, P. Ezzati, C. Hu, W. Yi, D. Liu, F. Khadem, I. Okwor, P. Jia, K. Shitaoka, S. Wang, M. Ndao, C. Petersen, J. Chen, S. Rafati, H. Louzir, A. Muraguchi, J. A. Wilkins and J. E. Uzonna (2015). "Identification of broadly conserved cross-species protective *Leishmania* antigen and its responding CD4+ T cells." *Sci Transl Med* **7**(310): 310ra167.
- Moyle, P. M. and I. Toth (2008). "Self-adjuvanting lipopeptide vaccines." *Curr Med Chem* **15**(5): 506-516.
- Muller, I. (1992). "Role of T cell subsets during the recall of immunologic memory to *Leishmania major*." *Eur J Immunol* **22**(12): 3063-3069.
- Murray, J. L., M. E. Gillogly, D. Przepiora, H. Brewer, N. K. Ibrahim, D. J. Booser, G. N. Hortobagyi, A. P. Kudelka, K. H. Grabstein, M. A. Cheever and C. G. Ioannides (2002).

"Toxicity, immunogenicity, and induction of E75-specific tumor-lytic CTLs by HER-2 peptide E75 (369-377) combined with granulocyte macrophage colony-stimulating factor in HLA-A2+ patients with metastatic breast and ovarian cancer." *Clin Cancer Res* **8**(11): 3407-3418.

Naouar, I., T. Boussoffara, M. Ben Ahmed, N. Belhaj Hmida, A. Gharbi, S. Gritli, A. Ben Salah and H. Louzir (2014). "Involvement of different CD4(+) T cell subsets producing granzyme B in the immune response to *Leishmania major* antigens." *Mediators Inflamm* **2014**: 636039.

Naouar, I., T. Boussoffara, M. Chenik, S. Gritli, M. Ben Ahmed, N. Belhadj Hmida, N. Bahi-Jaber, R. Bardi, Y. Gorgi, A. Ben Salah and H. Louzir (2016). "Prediction of T Cell Epitopes from *Leishmania major* Potentially Excreted/Secreted Proteins Inducing Granzyme B Production." *PLoS One* **11**(1): e0147076.

Nardin, E. (2010). "The past decade in malaria synthetic peptide vaccine clinical trials." *Hum Vaccin* **6**(1): 27-38.

Nascimento, E., D. F. Fernandes, E. P. Vieira, A. Campos-Neto, J. A. Ashman, F. P. Alves, R. N. Coler, L. Y. Bogatzki, S. J. Kahn, A. M. Beckmann, S. O. Pine, K. D. Cowgill, S. G. Reed and F. M. Piazza (2010). "A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine when used in combination with meglumine antimoniate for the treatment of cutaneous leishmaniasis." *Vaccine* **28**(40): 6581-6587.

Nascimento, M. S., V. Carregaro, D. S. Lima-Junior, D. L. Costa, B. Ryffel, M. S. Duthie, A. de Jesus, R. P. de Almeida and J. S. da Silva (2015). "Interleukin 17A acts synergistically with interferon gamma to promote protection against *Leishmania infantum* infection." *J Infect Dis* **211**(6): 1015-1026.

Nateghi Rostami, M., H. Keshavarz, R. Edalat, A. Sarrafnejad, T. Shahrestani, F. Mahboudi and A. Khamesipour (2010a). "CD8+ T cells as a source of IFN-gamma production in human cutaneous leishmaniasis." *PLoS Negl Trop Dis* **4**(10): e845.

Nateghi Rostami, M., H. Keshavarz Valian, S. E. Eskandari, A. Miramin Mohammadi, S. T. Shahrestani, A. Sarraf-Nejad and A. Khamesipour (2010b). "Differential in vitro CD4+/CD8+ T-cell response to live vs. killed *Leishmania major*." *Parasite Immunol* **32**(2): 101-110.

Neefjes, J., M. L. Jongma, P. Paul and O. Bakke (2011). "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation." *Nat Rev Immunol* **11**(12): 823-836.

Nico, D., D. C. Gomes, M. V. Alves-Silva, E. O. Freitas, A. Morrot, D. Bahia, M. Palatnik, M. M. Rodrigues and C. B. Palatnik-de-Sousa (2014). "Cross-Protective Immunity to *Leishmania amazonensis* is Mediated by CD4+ and CD8+ Epitopes of *Leishmania donovani* Nucleoside Hydrolase Terminal Domains." *Front Immunol* **5**: 189.

Noben-Trauth, N., W. E. Paul and D. L. Sacks (1999). "IL-4- and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains." *J Immunol* **162**(10): 6132-6140.

Novais, F. O., L. P. Carvalho, J. W. Graff, D. P. Beiting, G. Ruthel, D. S. Roos, M. R. Betts, M. H. Goldschmidt, M. E. Wilson, C. I. de Oliveira and P. Scott (2013). "Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis." *PLoS Pathog* **9**(7): e1003504.

Novais, F. O., L. P. Carvalho, S. Passos, D. S. Roos, E. M. Carvalho, P. Scott and D. P. Beiting (2015). "Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology." *J Invest Dermatol* **135**(1): 94-101.

Novais, F. O. and P. Scott (2015). "CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly." *Semin Immunopathol* **37**(3): 251-259.

O'Ryan, M., J. Stoddard, D. Toneatto, J. Wassil and P. M. Dull (2014). "A multi-component meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB): the clinical development program." *Drugs* **74**(1): 15-30.

Okwor, I., Z. Mou, D. Liu and J. Uzonna (2012). "Protective immunity and vaccination against cutaneous leishmaniasis." *Front Immunol* **3**: 128.

Okwor, I. B., P. Jia, Z. Mou, C. Onyilagha and J. E. Uzonna (2014). "CD8+ T cells are preferentially activated during primary low dose leishmania major infection but are completely dispensable during secondary anti-*Leishmania* immunity." *PLoS Negl Trop Dis* **8**(11): e3300.

Oliva, G., J. Nieto, V. Foglia Manzillo, S. Cappiello, E. Fiorentino, T. Di Muccio, A. Scalone, J. Moreno, C. Chicharro, E. Carrillo, T. Butaud, L. Guegand, V. Martin, A. M. Cuisinier, D. McGahie, S. Gueguen, C. Canavate and L. Gradoni (2014). "A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naive dogs exposed to two leishmania infantum transmission seasons." *PLoS Negl Trop Dis* **8**(10): e3213.

Oliveira, F., A. Báfica, A. B. Rosato, C. B. Favali, J. M. Costa, V. Cafe, M. Barral-Netto and A. Barral (2011). "Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis." *Am J Trop Med Hyg* **85**(1): 70-73.

Oliveira, F., E. Rowton, H. Aslan, R. Gomes, P. A. Castrovinci, P. H. Alvarenga, M. Abdeladhim, C. Teixeira, C. Meneses, L. T. Kleeman, A. B. Guimaraes-Costa, T. E. Rowland, D. Gilmore, S. Doumbia, S. G. Reed, P. G. Lawyer, J. F. Andersen, S. Kamhawi and J. G. Valenzuela (2015). "A sand fly salivary protein vaccine shows efficacy against vector-transmitted cutaneous leishmaniasis in nonhuman primates." *Sci Transl Med* **7**(290): 290ra290.

- Oliveira, G. A., K. Wetzel, J. M. Calvo-Calle, R. Nussenzweig, A. Schmidt, A. Birkett, F. Dubovsky, E. Tierney, C. H. Gleiter, G. Boehmer, A. J. Luty, M. Ramharter, G. B. Thornton, P. G. Kremsner and E. H. Nardin (2005). "Safety and enhanced immunogenicity of a hepatitis B core particle Plasmodium falciparum malaria vaccine formulated in adjuvant Montanide ISA 720 in a phase I trial." *Infect Immun* **73**(6): 3587-3597.
- Oryan, A. and M. Akbari (2016). "Worldwide risk factors in leishmaniasis." *Asian Pac J Trop Med* **9**(10): 925-932.
- Ou, D., L. A. Mitchell and A. J. Tingle (1998). "A new categorization of HLA DR alleles on a functional basis." *Hum Immunol* **59**(10): 665-676.
- Ozbilge, H., N. Aksoy, M. S. Gurel and S. Yazar (2006). "IgG and IgG subclass antibodies in patients with active cutaneous leishmaniasis." *J Med Microbiol* **55**(Pt 10): 1329-1331.
- Pakpour, N., C. Zaph and P. Scott (2008). "The central memory CD4+ T cell population generated during Leishmania major infection requires IL-12 to produce IFN-gamma." *J Immunol* **180**(12): 8299-8305.
- Panina-Bordignon, P., A. Tan, A. Termijtelen, S. Demotz, G. Corradin and A. Lanzavecchia (1989). "Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells." *Eur J Immunol* **19**(12): 2237-2242.
- Peacock, C. S., K. Seeger, D. Harris, L. Murphy, J. C. Ruiz, M. A. Quail, N. Peters, E. Adlem, A. Tivey, M. Aslett, A. Kerhornou, A. Ivens, A. Fraser, M. A. Rajandream, T. Carver, H. Norbertczak, T. Chillingworth, Z. Hance, K. Jagels, S. Moule, D. Ormond, S. Rutter, R. Squares, S. Whitehead, E. Rabbinowitsch, C. Arrowsmith, B. White, S. Thurston, F. Bringaud, S. L. Baldauf, A. Faulconbridge, D. Jeffares, D. P. Depledge, S. O. Oyola, J. D. Hilley, L. O. Brito, L. R. Tosi, B. Barrell, A. K. Cruz, J. C. Mottram, D. F. Smith and M. Berriman (2007). "Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease." *Nat Genet* **39**(7): 839-847.
- Pearson, R. D. and A. Q. Sousa (1996). "Clinical spectrum of Leishmaniasis." *Clin Infect Dis* **22**(1): 1-13.
- Peoples, G. E., J. M. Gurney, M. T. Hueman, M. M. Woll, G. B. Ryan, C. E. Storrer, C. Fisher, C. D. Shriver, C. G. Ioannides and S. Ponniah (2005). "Clinical trial results of a HER2/neu (E75) vaccine to prevent recurrence in high-risk breast cancer patients." *J Clin Oncol* **23**(30): 7536-7545.
- Pereira-Carvalho, R., C. O. Mendes-Aguiar, M. P. Oliveira-Neto, C. J. Covas, A. L. Bertho, A. M. Da-Cruz and A. Gomes-Silva (2013). "Leishmania braziliensis-reactive T cells are down-regulated in long-term cured cutaneous Leishmaniasis, but the renewal capacity of T effector memory compartments is preserved." *PLoS One* **8**(11): e81529.

- Pereira, B. A., F. S. Silva, K. M. Rebello, M. Marin-Villa, Y. M. Traub-Cseko, T. C. Andrade, A. L. Bertho, E. R. Caffarena and C. R. Alves (2011). "In silico predicted epitopes from the COOH-terminal extension of cysteine proteinase B inducing distinct immune responses during *Leishmania (Leishmania) amazonensis* experimental murine infection." *BMC Immunol* **12**: 44.
- Pereira, L. I., M. L. Dorta, A. J. Pereira, R. P. Bastos, M. A. Oliveira, S. A. Pinto, H. Galdino, Jr., W. Mayrink, W. Barcelos, V. P. Toledo, G. M. Lima and F. Ribeiro-Dias (2009). "Increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with the clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/*Leishmania* antigens." *Am J Trop Med Hyg* **81**(3): 378-383.
- Peters, N. C., J. G. Egen, N. Secundino, A. Debrabant, N. Kimblin, S. Kamhawi, P. Lawyer, M. P. Fay, R. N. Germain and D. Sacks (2008). "In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies." *Science* **321**(5891): 970-974.
- Petitdidier, E., J. Pagniez, G. Papierok, P. Vincendeau, J. L. Lemesre and R. Bras-Goncalves (2016). "Recombinant Forms of *Leishmania amazonensis* Excreted/Secreted Promastigote Surface Antigen (PSA) Induce Protective Immune Responses in Dogs." *PLoS Negl Trop Dis* **10**(5): e0004614.
- Petrovsky, N. and J. C. Aguilar (2004). "Vaccine adjuvants: current state and future trends." *Immunol Cell Biol* **82**(5): 488-496.
- Phetsouphanh, C., S. Pillai and J. J. Zaunders (2017). "Editorial: Cytotoxic CD4+ T Cells in Viral Infections." *Front Immunol* **8**: 1729.
- Pitta, M. G., A. Romano, S. Cabantous, S. Henri, A. Hammad, B. Kouriba, L. Argiro, M. el Kheir, B. Bucheton, C. Mary, S. H. El-Safi and A. Dessein (2009). "IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*." *J Clin Invest* **119**(8): 2379-2387.
- Pittet, M. J., D. Valmori, P. R. Dunbar, D. E. Speiser, D. Lienard, F. Lejeune, K. Fleischhauer, V. Cerundolo, J. C. Cerottini and P. Romero (1999). "High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals." *J Exp Med* **190**(5): 705-715.
- Podinovskaia, M. and A. Descoteaux (2015). "Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction." *Future Microbiol* **10**(1): 111-129.
- Ponte-Sucre, A., F. Gamarro, J. C. Dujardin, M. P. Barrett, R. Lopez-Velez, R. Garcia-Hernandez, A. W. Pountain, R. Mwenechanya and B. Papadopolou (2017). "Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge." *PLoS Negl Trop Dis* **11**(12): e0006052.

- Pratt, D. M. and J. R. David (1981). "Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*." *Nature* **291**(5816): 581-583.
- Prlic, M., G. Hernandez-Hoyos and M. J. Bevan (2006). "Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8+ T cell response." *J Exp Med* **203**(9): 2135-2143.
- Purcell, A. W., J. McCluskey and J. Rossjohn (2007). "More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design." *Nat Rev Drug Discov* **6**(5): 404-414.
- Rastogi, R., J. K. Verma, A. Kapoor, G. Langsley and A. Mukhopadhyay (2016). "Rab5 Isoforms Specifically Regulate Different Modes of Endocytosis in *Leishmania*." *J Biol Chem* **291**(28): 14732-14746.
- Ravindran, R., K. Anam, B. C. Bairagi, B. Saha, N. Pramanik, S. K. Guha, R. P. Goswami, D. Banerjee and N. Ali (2004). "Characterization of immunoglobulin G and its subclass response to Indian kala-azar infection before and after chemotherapy." *Infect Immun* **72**(2): 863-870.
- Ready, P. D. (2010). "Leishmaniasis emergence in Europe." *Euro Surveill* **15**(10): 19505.
- Ready, P. D. (2014). "Epidemiology of visceral leishmaniasis." *Clin Epidemiol* **6**: 147-154.
- Reece, W. H., M. Pinder, P. K. Gothard, P. Milligan, K. Bojang, T. Doherty, M. Plebanski, P. Akinwunmi, S. Everaere, K. R. Watkins, G. Voss, N. Tornieporth, A. Allouche, B. M. Greenwood, K. E. Kester, K. P. McAdam, J. Cohen and A. V. Hill (2004). "A CD4(+) T-cell immune response to a conserved epitope in the circumsporozoite protein correlates with protection from natural *Plasmodium falciparum* infection and disease." *Nat Med* **10**(4): 406-410.
- Reed, S. G., M. T. Orr and C. B. Fox (2013). "Key roles of adjuvants in modern vaccines." *Nat Med* **19**(12): 1597-1608.
- Regina-Silva, S., A. M. Feres, J. C. Franca-Silva, E. S. Dias, E. M. Michalsky, H. M. de Andrade, E. A. Coelho, G. M. Ribeiro, A. P. Fernandes and G. L. Machado-Coelho (2016). "Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec(R) vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil." *Vaccine* **34**(19): 2233-2239.
- Reiner, S. L. and R. M. Locksley (1995). "The regulation of immunity to *Leishmania major*." *Annu Rev Immunol* **13**: 151-177.
- Requena, J. M., C. Alonso and M. Soto (2000). "Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections." *Parasitol Today* **16**(6): 246-250.
- Resende, D. M., B. C. Caetano, M. S. Dutra, M. L. Penido, C. F. Abrantes, R. M. Verly, J. M. Resende, D. Pilo-Veloso, S. A. Rezende, O. Bruna-Romero, A. P. Fernandes and R. T.

- Gazzinelli (2008). "Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigote specific A2 antigen: correlation with IFN-gamma and cytolytic activity by CD8+ T cells." *Vaccine* **26**(35): 4585-4593.
- Rezvan, H., R. Rees and S. Ali (2012). "Immunogenicity of MHC Class I Peptides Derived from *Leishmania mexicana* Gp63 in HLA-A2.1 Transgenic (HHDII) and BALB/C Mouse Models." *Iran J Parasitol* **7**(4): 27-40.
- Ridley, D. S., A. V. De Magalhaes and P. D. Marsden (1989). "Histological analysis and the pathogenesis of mucocutaneous leishmaniasis." *J Pathol* **159**(4): 293-299.
- Rioux, J. A., F. Petter, A. Zahaf, G. Lanotte, R. Houin, D. Jarry, J. Perieres, A. Martini and S. Sarhani (1986). "[Isolation of *Leishmania major* Yakimoff and Shokhor, 1914 (Kinetoplastida-Trypanosomatidae) in *Meriones shawi-shawi* (Duvernoy, 1842) (Rodentia-Gerbillidae) in Tunisia]." *Ann Parasitol Hum Comp* **61**(2): 139-145.
- Ritter, U., J. Mattner, J. S. Rocha, C. Bogdan and H. Korner (2004). "The control of *Leishmania* (*Leishmania*) major by TNF in vivo is dependent on the parasite strain." *Microbes Infect* **6**(6): 559-565.
- Rittig, M. G. and C. Bogdan (2000). "Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views." *Parasitol Today* **16**(7): 292-297.
- Rivier, D., R. Shah, P. Bovay and J. Mauel (1993). "Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge." *Parasite Immunol* **15**(2): 75-84.
- Rock, K. L., E. Reits and J. Neefjes (2016). "Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules." *Trends Immunol* **37**(11): 724-737.
- Rock, K. L. and L. Shen (2005). "Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance." *Immunol Rev* **207**: 166-183.
- Rodriguez, A., A. Regnault, M. Kleijmeer, P. Ricciardi-Castagnoli and S. Amigorena (1999). "Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells." *Nat Cell Biol* **1**(6): 362-368.
- Roestenberg, M., E. Remarque, E. de Jonge, R. Hermsen, H. Blythman, O. Leroy, E. Imoukhuede, S. Jepsen, O. Ofori-Anyinam, B. Faber, C. H. Kocken, M. Arnold, V. Walraven, K. Teelen, W. Roeffen, Q. de Mast, W. R. Ballou, J. Cohen, M. C. Dubois, S. Ascarateil, A. van der Ven, A. Thomas and R. Sauerwein (2008). "Safety and immunogenicity of a recombinant *Plasmodium falciparum* AMA1 malaria vaccine adjuvanted with Alhydrogel, Montanide ISA 720 or AS02." *PLoS One* **3**(12): e3960.

- Rossi, M. and N. Fasel (2018). "How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions!" *Int Immunol* **30**(3): 103-111.
- Rougeron, V., T. De Meeus, S. Kako Ouraga, M. Hide and A. L. Banuls (2010). ""Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)" in Leishmania after two decades of laboratory and field analyses." *PLoS Pathog* **6**(8): e1001004.
- Ryan, J. R., A. M. Smithyman, G. H. Rajasekariah, L. Hochberg, J. M. Stiteler and S. K. Martin (2002). "Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis." *J Clin Microbiol* **40**(3): 1037-1043.
- Sachdeva, R., A. C. Banerjea, N. Malla and M. L. Dubey (2009). "Immunogenicity and efficacy of single antigen Gp63, polytope and polytopeHSP70 DNA vaccines against visceral Leishmaniasis in experimental mouse model." *PLoS One* **4**(12): e7880.
- Sacks, D. and N. Noben-Trauth (2002). "The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice." *Nat Rev Immunol* **2**(11): 845-858.
- Saffari, B. and H. Mohabatkar (2009). "Computational analysis of cysteine proteases (Clan CA, Family Cl) of Leishmania major to find potential epitopic regions." *Genomics Proteomics Bioinformatics* **7**(3): 87-95.
- Saha, S., S. Mondal, R. Ravindran, S. Bhowmick, D. Modak, S. Mallick, M. Rahman, S. Kar, R. Goswami, S. K. Guha, N. Pramanik, B. Saha and N. Ali (2007). "IL-10- and TGF-beta-mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis: the significance of amphotericin B in the control of Leishmania donovani infection in India." *J Immunol* **179**(8): 5592-5603.
- Salah, A. B., Y. Kamarianakis, S. Chlif, N. B. Alaya and P. Prastacos (2007). "Zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Tunisia: spatio temporal dynamics." *Int J Epidemiol* **36**(5): 991-1000.
- Salaiza-Suazo, N., P. Volkow, R. Tamayo, H. Moll, R. Gillitzer, A. Perez-Torres, R. Perez-Montfort, J. D. Dominguez, O. Velasco-Castrejon, M. Crippa and I. Becker (1999). "Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania mexicana modifies the immunohistological profile but not the disease outcome." *Trop Med Int Health* **4**(12): 801-811.
- Sallusto, F., J. Geginat and A. Lanzavecchia (2004). "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance." *Annu Rev Immunol* **22**: 745-763.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp and A. Lanzavecchia (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." *Nature* **401**(6754): 708-712.

Santarem, N., R. Silvestre, J. Tavares, M. Silva, S. Cabral, J. Maciel and A. Cordeiro-da-Silva (2007). "Immune response regulation by leishmania secreted and nonsecreted antigens." *J Biomed Biotechnol* **2007**(6): 85154.

Santos Cda, S., V. Boaventura, C. Ribeiro Cardoso, N. Tavares, M. J. Lordelo, A. Noronha, J. Costa, V. M. Borges, C. I. de Oliveira, J. Van Weyenbergh, A. Barral, M. Barral-Netto and C. I. Brodskyn (2013). "CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis." *J Invest Dermatol* **133**(6): 1533-1540.

Sassi, A., H. Louzir, A. Ben Salah, M. Mokni, A. Ben Osman and K. Dellagi (1999). "Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia." *Clin Exp Immunol* **116**(1): 127-132.

Scorza, B. M., E. M. Carvalho and M. E. Wilson (2017). "Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis." *Int J Mol Sci* **18**(6).

Scott, P., D. Artis, J. Uzonna and C. Zaph (2004). "The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development." *Immunol Rev* **201**: 318-338.

Scott, P., P. Natovitz, R. L. Coffman, E. Pearce and A. Sher (1988). "Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens." *J Exp Med* **168**(5): 1675-1684.

Scott, P. and F. O. Novais (2016). "Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis." *Nat Rev Immunol* **16**(9): 581-592.

Scott, P., E. Pearce, A. W. Cheever, R. L. Coffman and A. Sher (1989). "Role of cytokines and CD4⁺ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease." *Immunol Rev* **112**: 161-182.

Seder, R. A., P. A. Darrah and M. Roederer (2008). "T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design." *Nat Rev Immunol* **8**(4): 247-258.

Sette, A., M. Newman, B. Livingston, D. McKinney, J. Sidney, G. Ishioka, S. Tangri, J. Alexander, J. Fikes and R. Chesnut (2002). "Optimizing vaccine design for cellular processing, MHC binding and TCR recognition." *Tissue Antigens* **59**(6): 443-451.

Sette, A. and J. Sidney (1999). "Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism." *Immunogenetics* **50**(3-4): 201-212.

Seyed, N., T. Taheri, C. Vauchy, M. Dosset, Y. Godet, A. Eslamifar, I. Sharifi, O. Adotevi, C. Borg, P. S. Rohrllich and S. Rafati (2014). "Immunogenicity evaluation of a rationally designed polytope construct encoding HLA-A*0201 restricted epitopes derived from Leishmania major related proteins in HLA-A2/DR1 transgenic mice: steps toward polytope vaccine." *PLoS One* **9**(10): e108848.

Seyed, N., F. Zahedifard, S. Safaiyan, E. Gholami, F. Doustdari, K. Azadmanesh, M. Mirzaei, N. Saeedi Eslami, A. Khadem Sadegh, A. Eslami Far, I. Sharifi and S. Rafati (2011). "In silico analysis of six known Leishmania major antigens and in vitro evaluation of specific epitopes eliciting HLA-A2 restricted CD8 T cell response." *PLoS Negl Trop Dis* **5**(9): e1295.

Shargh, V. H., M. R. Jaafari, A. Khamesipour, I. Jaafari, S. A. Jalali, A. Abbasi and A. Badiie (2012). "Liposomal SLA co-incorporated with PO CpG ODNs or PS CpG ODNs induce the same protection against the murine model of leishmaniasis." *Vaccine* **30**(26): 3957-3964.

Sidney, J., M. F. del Guercio, S. Southwood, V. H. Engelhard, E. Appella, H. G. Rammensee, K. Falk, O. Rotzschke, M. Takiguchi, R. T. Kubo and et al. (1995). "Several HLA alleles share overlapping peptide specificities." *J Immunol* **154**(1): 247-259.

Sidney, J., B. Peters, N. Frahm, C. Brander and A. Sette (2008). "HLA class I supertypes: a revised and updated classification." *BMC Immunol* **9**: 1.

Silva, E., L. F. Ferreira, M. Z. Hernandez, M. E. de Brito, B. C. de Oliveira, A. A. da Silva, O. P. de-Melo-Neto, A. M. Rezende and V. R. Pereira (2016). "Combination of In Silico Methods in the Search for Potential CD4(+) and CD8(+) T Cell Epitopes in the Proteome of Leishmania braziliensis." *Front Immunol* **7**: 327.

Silveira, F. T., R. Lainson and C. E. Corbett (2004). "Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**(3): 239-251.

Sindermann, H. and J. Engel (2006). "Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **100 Suppl 1**: S17-20.

Singh, B. and S. Sundar (2012). "Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives." *Vaccine* **30**(26): 3834-3842.

Singh, O. P., K. Gidwani, R. Kumar, S. Nysten, S. L. Jones, M. Boelaert, D. Sacks and S. Sundar (2012). "Reassessment of immune correlates in human visceral leishmaniasis as defined by cytokine release in whole blood." *Clin Vaccine Immunol* **19**(6): 961-966.

Singh, O. P. and S. Sundar (2014). "Whole blood assay and visceral leishmaniasis: Challenges and promises." *Immunobiology* **219**(4): 323-328.

- Skwarczynski, M. and I. Toth (2016). "Peptide-based synthetic vaccines." *Chem Sci* **7**(2): 842-854.
- Sokal, J. E. (1975). "Editorial: Measurement of delayed skin-test responses." *N Engl J Med* **293**(10): 501-502.
- Soong, L. (2008). "Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites." *J Immunol* **180**(7): 4355-4360.
- Souza, M. A., M. C. Castro, A. P. Oliveira, A. F. Almeida, L. C. Reis, C. J. Silva, M. E. Brito and V. R. Pereira (2012). "American tegumentary leishmaniasis: cytokines and nitric oxide in active disease and after clinical cure, with or without chemotherapy." *Scand J Immunol* **76**(2): 175-180.
- Steverding, D. (2017). "The history of leishmaniasis." *Parasit Vectors* **10**(1): 82.
- Taylor, W. R. (1986). "The classification of amino acid conservation." *J Theor Biol* **119**(2): 205-218.
- Thalhofer, C. J., Y. Chen, B. Sudan, L. Love-Homan and M. E. Wilson (2011). "Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum* chagasi." *Infect Immun* **79**(1): 108-117.
- Thomaz-Soccol, V., E. S. Ferreira da Costa, S. G. Karp, L. A. Junior Letti, F. T. Soccol and C. R. Soccol (2018). "Recent Advances in Vaccines Against *Leishmania* Based on Patent Applications." *Recent Pat Biotechnol* **12**(1): 21-32.
- Thomaz-Soccol, V., G. Lanotte, J. A. Rioux, F. Pratlong, A. Martini-Dumas and E. Serres (1993). "Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903." *Ann Parasitol Hum Comp* **68**(2): 107-108.
- Todryk, S. M., A. A. Pathan, S. Keating, D. W. Porter, T. Berthoud, F. Thompson, P. Klenerman and A. V. Hill (2009). "The relationship between human effector and memory T cells measured by ex vivo and cultured ELISPOT following recent and distal priming." *Immunology* **128**(1): 83-91.
- Tomiyama, M., M. Takahara, K. Egawa and M. Nieda (2004). "Mature dendritic cells are superior to immature dendritic cells in expanding antigen-specific naive and memory CD8⁺ T cells." *Anticancer Res* **24**(5C): 3327-3333.
- Torres-Guerrero, E., M. R. Quintanilla-Cedillo, J. Ruiz-Esmenjaud and R. Arenas (2017). "Leishmaniasis: a review." *F1000Res* **6**: 750.

- Ueno, T., H. Tomiyama and M. Takiguchi (2002). "Single T cell receptor-mediated recognition of an identical HIV-derived peptide presented by multiple HLA class I molecules." *J Immunol* **169**(9): 4961-4969.
- Uzonna, J. E., K. L. Joyce and P. Scott (2004). "Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8⁺ T cells." *J Exp Med* **199**(11): 1559-1566.
- Uzonna, J. E., G. Wei, D. Yurkowski and P. Bretscher (2001). "Immune elimination of *Leishmania major* in mice: implications for immune memory, vaccination, and reactivation disease." *J Immunol* **167**(12): 6967-6974.
- van Leeuwen, E. M., E. B. Remmerswaal, M. T. Vossen, A. T. Rowshani, P. M. Wertheim-van Dillen, R. A. van Lier and I. J. ten Berge (2004). "Emergence of a CD4⁺CD28⁻ granzyme B⁺, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection." *J Immunol* **173**(3): 1834-1841.
- van Zandbergen, G., M. Klinger, A. Mueller, S. Dannenberg, A. Gebert, W. Solbach and T. Laskay (2004). "Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages." *J Immunol* **173**(11): 6521-6525.
- Velez, I. D., S. del Pilar Agudelo, M. P. Arbelaez, K. Gilchrist, S. M. Robledo, J. A. Puerta, F. Zicker, J. Berman and F. Modabber (2000). "Safety and immunogenicity of a killed *Leishmania (L.) amazonensis* vaccine against cutaneous leishmaniasis in Colombia: a randomized controlled trial." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **94**(6): 698-703.
- Verma, S., R. Kumar, G. K. Katara, L. C. Singh, N. S. Negi, V. Ramesh and P. Salotra (2010). "Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis." *PLoS One* **5**(4): e10107.
- Vijayamahantesh, A. Amit, M. R. Dikhit, A. K. Singh, T. Venkateshwaran, V. N. R. Das, P. Das and S. Bimal (2017). "Immuno-informatics based approaches to identify CD8⁺ T cell epitopes within the *Leishmania donovani* 3-ectonucleotidase in cured visceral leishmaniasis subjects." *Microbes Infect* **19**(6): 358-369.
- von Stebut, E., Y. Belkaid, T. Jakob, D. L. Sacks and M. C. Udey (1998). "Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity." *J Exp Med* **188**(8): 1547-1552.
- Waldrop, S. L., K. A. Davis, V. C. Maino and L. J. Picker (1998). "Normal human CD4⁺ memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis." *J Immunol* **161**(10): 5284-5295.
- Wang, Y., G. Wang, D. Zhang, H. Yin and M. Wang (2013). "Screening and identification of novel B cell epitopes of *Toxoplasma gondii* SAG1." *Parasit Vectors* **6**: 125.

Wiedermann, U., C. Wiltchke, J. Jasinska, M. Kundi, R. Zurbriggen, E. Garner-Spitzer, R. Bartsch, G. Steger, H. Pehamberger, O. Scheiner and C. C. Zielinski (2010). "A virosomal formulated Her-2/neu multi-peptide vaccine induces Her-2/neu-specific immune responses in patients with metastatic breast cancer: a phase I study." *Breast Cancer Res Treat* **119**(3): 673-683.

Wilhelm, P., U. Ritter, S. Labbow, N. Donhauser, M. Rollinghoff, C. Bogdan and H. Korner (2001). "Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF." *J Immunol* **166**(6): 4012-4019.

Williams, T. M. (2001). "Human leukocyte antigen gene polymorphism and the histocompatibility laboratory." *J Mol Diagn* **3**(3): 98-104.

Woelbing, F., S. L. Kostka, K. Moelle, Y. Belkaid, C. Sunderkoetter, S. Verbeek, A. Waisman, A. P. Nigg, J. Knop, M. C. Udey and E. von Stebut (2006). "Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity." *J Exp Med* **203**(1): 177-188.

Wofl, M. and P. D. Greenberg (2014). "Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8⁺ T cells." *Nat Protoc* **9**(4): 950-966.

Working Group on Research Priorities for Development of Leishmaniasis, V., C. H. Costa, N. C. Peters, S. R. Maruyama, E. C. de Brito, Jr. and I. K. Santos (2011). "Vaccines for the leishmaniases: proposals for a research agenda." *PLoS Negl Trop Dis* **5**(3): e943.

Wortmann, G., L. Hochberg, H. H. Houg, C. Sweeney, M. Zapor, N. Aronson, P. Weina and C. F. Ockenhouse (2005). "Rapid identification of *Leishmania* complexes by a real-time PCR assay." *Am J Trop Med Hyg* **73**(6): 999-1004.

Wu, C. Y., J. R. Kirman, M. J. Rotte, D. F. Davey, S. P. Perfetto, E. G. Rhee, B. L. Freidag, B. J. Hill, D. C. Douek and R. A. Seder (2002). "Distinct lineages of T(H)1 cells have differential capacities for memory cell generation in vivo." *Nat Immunol* **3**(9): 852-858.

Wu, W., L. Huang and S. Mendez (2010). "A live *Leishmania major* vaccine containing CpG motifs induces the de novo generation of Th17 cells in C57BL/6 mice." *Eur J Immunol* **40**(9): 2517-2527.

Xu, D., H. Liu, M. Komai-Koma, C. Campbell, C. McSharry, J. Alexander and F. Y. Liew (2003). "CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania major* infection, and colitis in mice." *J Immunol* **170**(1): 394-399.

Yang, D. M., M. V. Rogers and F. Y. Liew (1991). "Identification and characterization of host-protective T-cell epitopes of a major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major*." *Immunology* **72**(1): 3-9.

Zaph, C., J. Uzonna, S. M. Beverley and P. Scott (2004). "Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites." *Nat Med* **10**(10): 1104-1110.

Annexe

SUJETS LEISHMANIOSE CUTANÉE GUÉRIS

Fiche de renseignements cliniques

1-IDENTIFICATION DE L'INDIVIDU

|.| |.| |.|

Nom |.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.

Prénom |.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.

Adresse _____

Tel :

Genre Homme Femme

Date de naissance |.| |.| |.|.|.

Enceinte Oui Non

2- INFORMATIONS

Avez-vous toujours vécu dans cette Oui Non

Si "non" depuis combien de temps vivez-vous dans cette région |.| Ans

Avez-vous séjourné dans d'autres régions ces 10 dernières années Oui Non

Si "oui" :

_____ date |.| |.| |.|.

Commentaires _____

Emploi ne s'applique pas sans emploi ouvrier agriculteur employé
 profession libérale autre (spécifier) _____

Niveau d'étude illettré primaire secondaire supérieur

Antécédents (autre que leishmanioses)

 HIV TBC anémie allergies hépatites diabète malnutrition**3-ANTÉCÉDENTS MÉDICAUX (AUTRE QUE** autre(spécifier) _____**4- ANTÉCÉDENTS DE LEISHMANIOSE**Traitements médicaux en cours corticothérapie autre (spécifier) _____Présence de cicatrices Oui Non Si "oui", localisationSymptômes muqueux associés Oui NonRapport médical Oui Non

Si date ||| ||| |||||

Hôpital _____

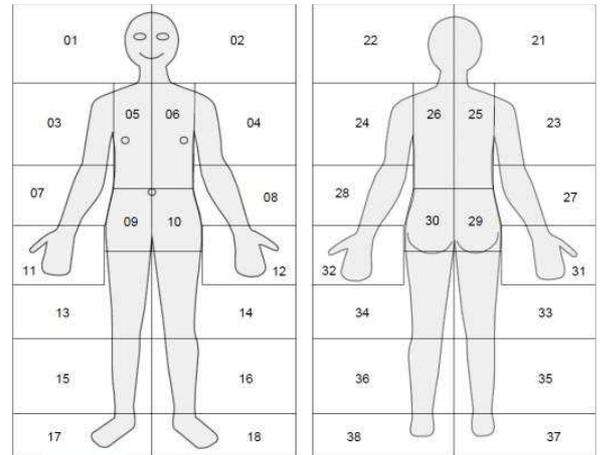
Confirmation Parasitologique Oui Non Non documentée

Si date ||| ||| |||||

 Frottis CultureTraitemen Oui Non

type: _____

durée: _____

**5- Prélèvement sanguin** Oui Non

Volum

||| ml

Nom de l'enquêteur

date

Signature

Résumé

Les leishmanioses sont des maladies tropicales négligées ayant un impact important sur la santé humaine en raison de la fréquence et la gravité de certaines de leurs formes cliniques. En l'absence de vaccins à usage humain, la chimiothérapie constitue le moyen principal de lutte contre la leishmaniose, malgré tous ses inconvénients, à savoir, effets secondaires et résistance au traitement. La guérison est généralement associée à une protection contre une réinfection ce qui constitue un argument solide en faveur de la faisabilité d'un vaccin.

Les vaccins peptidiques basés sur l'identification, *in silico*, d'épitopes T immunodominants capables d'induire des réponses immunitaires T spécifiques, présentent une stratégie prometteuse, en raison de leur spécificité, stabilité, facilité de production à grande échelle et leur faible coût.

Notre objectif a été d'évaluer l'immunogénicité de peptides multi-épitopiques constitués d'épitopes T, affins à différents allèles du complexe majeur d'histocompatibilité humain ou HLA (Human Leukocyte Antigen) de classe-I (HLA-I) ou -II (HLA-II). Ces épitopes ont été identifiés à partir des protéines Histone (H2B), Promastigote surface Antigen (PSA) et *L. major* large RABGTPase (LmLRAB), déjà décrites comme candidats vaccin contre la leishmaniose humaine ou animale. 12 peptides multi-épitopiques ont été conçus et utilisés sous forme de pools de peptides pour stimuler des PBMC issus d'individus guéris de leishmaniose cutanée. La production d'IFN- γ , d'IL-10, de TNF- α et de granzyme B (GrB), a été évaluée par ELISA ou CBA. La fréquence des cellules T productrices d'IFN- γ a été quantifiée par ELISpot. Les phénotypes des populations lymphocytaires T productrices de cytokines ainsi que les lymphocytes T mémoires ont été analysés par cytométrie en flux.

Nous avons démontré que 16 parmi les 25 pools de peptides, contenant des peptides affins aux molécules HLA-I, HLA-II ou HLA-I et II, parmi les plus représentés dans la population mondiale, ont été capables d'induire des taux spécifiques et significatifs d'IFN- γ mais pas d'IL-10, chez les individus guéris de LC. 6 pools de peptides parmi ceux induisant les taux les plus élevés d'IFN- γ ont été sélectionnés afin de mieux caractériser leur réponse immunitaire. Nous avons démontré que certains d'entre eux ont été capables d'induire une augmentation significative des pourcentages de lymphocytes (i) TCD4+ et TCD8+ producteurs d'IFN- γ (ii) TCD4+ producteurs de GrB (iii) TCD4+ bifonctionnels, sécrétant de l'IFN- γ et du TNF- α et/ou du TNF- α et de l'IL-2 et (iv) TCD4+ et TCD8+ mémoires centraux.

En conclusion, nous avons démontré que des peptides multi-épitopiques dérivés des protéines H2B, PSA et LmLRAB, ont été capables d'induire des réponses lymphocytaires TCD4+ et TCD8+ avec production de cytokines associées à la résistance contre l'infection par *Leishmania*. Nos résultats suggèrent que ces peptides pourraient être exploités, en tant que candidats vaccins contre la leishmaniose humaine.

Abstract

Leishmaniasis is a neglected tropical disease with a significant impact on human health because of the frequency and the severity of some of their clinical forms. In the absence of effective human vaccines, chemotherapy remains the major tool for the control of leishmaniasis, despite serious side effects and resistance to treatment. Healing is associated with the development of a life-long immunity to infection, arguing for vaccine feasibility.

Peptide vaccines based on *in silico* identification of immunodominant T cell epitopes able to induce T cell specific immune responses constitute a promising strategy because of their specificity, stability and large-scale production/low cost.

Our purpose was to evaluate the immunogenicity of multi-epitope peptides composed of T cell epitopes with binding affinities to the most frequent human leukocyte antigen class-I (HLA-I) and -II (HLA-II) alleles. These epitopes were derived from Histone (H2B), Promastigote surface Antigen (PSA) and *L. major* large RABGTPase (LmLRAB) proteins, which were previously described as potential *Leishmania* candidate vaccines.

12 multi-epitope peptides were designed and were used as peptide pools to stimulate PBMC from individuals with healed cutaneous leishmaniasis. IFN- γ , IL-10, TNF- α and granzyme B (GrB) production was evaluated by ELISA or CBA. The frequency of IFN- γ -producing T cells was quantified by ELISpot. T cells secreting cytokines as well as memory T cells were analyzed by flow cytometry.

We showed that 16 of 25 peptide pools containing HLA-I, HLA-II or both HLA-I and -II peptides were able to induce specific and significant IFN- γ but not IL-10 production. 6 peptide pools were selected among those inducing the highest levels of IFN- γ for further characterization. We showed that, some of them were able to induce a significant increase of the percentages of (i) both CD4+ and CD8+ T cells producing IFN- γ (ii) CD4+ T cells producing GrB (iii) bifunctional CD4+ T cells secreting IFN- γ +TNF- α + and/or TNF- α +IL-2+ and (iv) CD4+ and CD8+ central memory T cells.

In conclusion, we demonstrated that multi-epitope peptides derived from H2B, PSA and LmLRAB proteins were able to induce both CD4+ and CD8+ T cell responses, both associated with protection against *Leishmania* infection, suggesting that they may be exploited as potential polytope vaccine candidates against human leishmaniasis.