



**HAL**  
open science

# Phylogénie et implication du Leishmania RNA virus dans la leishmaniose cutanée due à *L. guyanensis* en Guyane Française

Marine Ginouvès

► **To cite this version:**

Marine Ginouvès. Phylogénie et implication du Leishmania RNA virus dans la leishmaniose cutanée due à *L. guyanensis* en Guyane Française. Dermatologie. Université de Guyane, 2020. Français. NNT: 2020YANE0009 . tel-03223114

**HAL Id: tel-03223114**

**<https://theses.hal.science/tel-03223114>**

Submitted on 10 May 2021

**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

En vue de l'obtention du grade de

## Docteur de l'université de Guyane

Spécialité : *Aspects cellulaires et moléculaires de la biologie*

---

---

Présentée et soutenue publiquement le 1<sup>er</sup> décembre 2020 par :

Marine GINOUVES

---

### Phylogénie et implication du *Leishmania* RNA virus dans la leishmaniose cutanée due à *L. guyanensis* en Guyane Française

---

---

#### JURY

Claude PIRMEZ	PhD-PH	Rapporteure
Iván Darío VÉLEZ	PU-PH	Rapporteur
Isabelle VILLENA	PU-PH	Examinatrice
Patrick BASTIEN	PU-PH	Examineur, Président de jury
Ghislaine PREVOT	PU	Co-Directrice de Thèse
Pierre COUPPIE	PU-PH	Directeur de Thèse



## STRUCTURES PARTENAIRES ET FINANCEURS



## REMERCIEMENTS

Je remercie le Pr CARME, fondateur de l'EA 3593, de m'avoir laissé l'opportunité de réaliser cette thèse au sein de son équipe. Je remercie également ses successeurs, Pr NACHER et Pr DEMAR pour leur soutien.

Je remercie la Pr Ghislaine PREVOT, ma co-directrice de thèse, qui a acquiescé à ma démarche d'inscription en thèse et qui m'a accordé toute sa confiance pour l'accomplissement de ce travail, son temps, son soutien et son aide tout au long de cette thèse.

Je remercie le Pr Pierre COUPPIE, qui m'a également accordé sa confiance en acceptant d'être mon directeur de thèse et qui m'a apporté son aide au cours de ce travail.

Egalement un grand merci :

Aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail et pour leurs suggestions qui ont permis d'améliorer ce manuscrit.

Aux membres de mon comité de suivi de thèse, Anne LAVERGNE, Sébastien BRIOLANT et Christophe RAVEL.

Aux collègues de l'école doctorale, Abdennebi OMRANE, Dominique DUTERVIL, Jean-Charles ROBINSON, Rachelle HO-COUI-YOUN et les membres du conseil.

Aux collègues doctorants avec lesquels j'ai pu partager de bons moments au cours des formations, du concours « MT180S », expérimentarium, et aux formateurs pour leur soutien.

A mes collègues du DFR Santé que j'ai côtoyé quotidiennement et qui m'ont apporté leur aide et toute leur convivialité : Stéphane SIMON, Julie PENEAU, Aurélia STEPHANI, Laure LAGHOE, Tani LY, Mona SAOUT, Raymonde ONOZO, Sandrine ADONIS, Endrow PHIBEL et Romy BAAL.

Aux collègues des autres services qui m'ont accompagnée dans les démarches financières et administratives des projets de recherche, dans la résolution des problèmes informatiques et immobiliers : Paulette GEER-BAAL, Sylvie AOUIZERATE, Danielle ZELT, Jocelyne CRAMER, Richard TABLON, Jean THOKAU, Antoine PRIMEROSE, Bertrand RAZAN et Jean-richard LAFLEUR, ainsi que tous les autres collègues de l'Université que je n'ai pu citer.

Aux collègues (et chefs) médecins pour leur sympathie et leur réelle humilité.

A tous les collaborateurs que j'ai côtoyés au cours de ce travail de thèse : Eliane BOURREAU, Sébastien BRIOLANT, Hervé BOGREAU, Thiago VASCONCELOS DOS SANTOS, et tous ceux avec qui j'ai publié et/ou qui ont participé à la mise en place et au déroulement des travaux de recherche.

Aux stagiaires qui ont apporté leur contribution aux différents travaux.

A ma famille, ma mère Germaine, qui est toujours là pour moi, et mon père Alain, présent malgré la distance. A mes enfants qui sont ma source de motivation, leur père, mes frères et sœur, cousins et cousines, beau-frère, tantes et oncles, neveux et nièce, amis, tout cet entourage qui m'accompagne chaque jour.

Et à tous ceux que j'ai rencontrés au cours de cette thèse.

# Phylogénie et implication du *Leishmania* RNA virus dans la leishmaniose cutanée due à *L. guyanensis* en Guyane Française

## SOMMAIRE

STRUCTURES PARTENAIRES ET FINANCEURS.....	3
REMERCIEMENTS .....	4
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX .....	9
LISTE DES ABREVIATIONS .....	10
Introduction .....	12
1. Généralités.....	12
1.1. Le parasite .....	12
1.1.1. La forme promastigote.....	14
1.1.2. La forme amastigote .....	14
1.2. La génétique des <i>Leishmania</i> .....	16
1.2.1. Le génome des <i>Leishmania</i> .....	16
1.2.2. La transcription des gènes .....	17
1.2.3. L'aneuploïdie.....	18
1.2.4. La reproduction des <i>Leishmania</i> .....	20
1.3. Le vecteur.....	21
1.4. Les hôtes .....	22
1.4.1. Les réservoirs.....	23
1.4.2. Les réservoirs dans l'Ancien Monde.....	24
1.4.3. Les réservoirs dans le Nouveau Monde.....	24
1.5. Le cycle des <i>Leishmania</i> .....	25
1.5.1. Cycle dans le vecteur .....	26
1.5.2. Cycle dans l'hôte mammifère .....	28
1.5.2.1. Le parasite face au système immunitaire de l'hôte .....	28
1.5.2.1.1. Réponse immunitaire innée.....	29
1.5.2.1.2. Réponse immunitaire acquise .....	31
1.5.2.1.3. Réponse Th1/Th2 .....	32
1.5.2.1.4. Réponse Th17 et Treg .....	34
1.6. Les formes cliniques de la leishmaniose .....	35
1.6.1. La leishmaniose cutanée .....	35
1.6.2. La leishmaniose viscérale.....	36

1.6.3.	Les leishmanioses cutanées diffuse et disséminée .....	38
1.6.4.	La leishmaniose cutanéomuqueuse .....	40
1.7.	Les traitements.....	41
1.7.1.	L'amphotéricine B.....	42
1.7.2.	L'azithromycine .....	43
1.7.3.	Le fluconazole .....	43
1.7.4.	L'antimoniote de meglumine (Glucantime ®).....	44
1.7.5.	La miltéfosine .....	44
1.7.6.	La paromomycine.....	45
1.7.7.	La pentamidine.....	45
1.8.	La leishmaniose en Guyane.....	46
1.8.1.	Epidémiologie des <i>Leishmania</i> .....	46
1.8.2.	La transmission de la maladie .....	46
1.8.3.	Les vecteurs .....	47
1.8.4.	Les réservoirs.....	48
1.8.5.	Diagnostic et traitements .....	49
2.	Les virus de parasites : acteurs potentiels des interactions hôtes-parasites .....	51
2.1.	Le Virus de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	51
2.2.	Le virus de <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	52
2.3.	Autres virus de parasites.....	53
3.	Le <i>Leishmania</i> RNA virus (LRV) .....	54
3.1.	Les LRV dans le monde .....	56
3.1.1.	La prévalence du LRV dans le monde.....	56
3.2.	Le génome viral.....	58
3.2.1.	Le LRV1 .....	59
3.2.2.	Le LRV2 .....	60
3.3.	Reproduction.....	61
3.4.	Régulation du cycle viral .....	62
3.5.	La réponse immunitaire face aux LRV .....	64
	Objectifs de la thèse .....	67
	AXE 1 : Prévalence et phylogénie du LRV en Guyane Française.....	69
	Publication n°1 : Prévalence et distribution du LRV en Guyane Française.....	69
	Publication n°2 : Phylogénie des LRV .....	75
	AXE 2 : Sensibilité <i>in vitro</i> des <i>Leishmania</i> infectées par le LRV .....	100
	Publication n°3 : Mise au point d'un test de viabilité cellulaire .....	100



Publication n°4 : Evaluation de la sensibilité des <i>Leishmania</i> aux médicaments en Guyane.....	110
Influence du LRV dans la sensibilité <i>in vitro</i> des <i>Leishmania</i> .....	119
AXE 3 : Influence du LRV dans la leishmaniose .....	120
Publication n°5 : Influence du LRV dans la leishmaniose humaine.....	120
Publication n°6 : Influence de la voie d'administration de la pentamidine dans l'échec thérapeutique .....	131
Publication n°7 : Phylogénie des LRV et clinique des patients.....	138
Discussion .....	150
Conclusion et Perspectives .....	165
Annexes .....	168
Bibliographie.....	179

## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1 : Morphologie de l'intestin du phlébotome.....	13
Figure 2 : Taxonomie des <i>Leishmania</i> .....	13
Figure 3 : Formes promastigote et amastigote des <i>Leishmania</i> .....	15
Figure 4 : Régulation de l'expression des gènes des <i>Leishmania</i> .....	18
Figure 5 : Aneuploïdie chez différentes souches et espèces de <i>Leishmania</i> .....	19
Figure 6 : Mécanisme de l'aneuploïdie .....	20
Figure 7 : Phlébotome femelle .....	21
Figure 8 : Cycle hétéroxène des <i>Leishmania</i> .....	25
Figure 9 : Schéma du cycle des <i>Leishmania</i> chez le vecteur .....	26
Figure 10 : Cycle des <i>Leishmania</i> chez le vecteur .....	27
Figure 11 : Schéma de la réponse Th1/Th2.....	32
Figure 12 : Leishmaniose cutanée localisée .....	35
Figure 13 : La Leishmaniose cutanée dans le monde .....	36
Figure 14 : Leishmaniose viscérale .....	37
Figure 15 : La leishmaniose viscérale dans le monde .....	38
Figure 16 : Leishmaniose diffuse.....	39
Figure 17 : Leishmaniose disséminée .....	39
Figure 18 : Leishmaniose cutanéomuqueuse .....	40
Figure 19 : Réservoirs primaires de la leishmaniose en Guyane .....	48
Figure 20 : Réservoirs secondaires de la leishmaniose en Guyane .....	49
Figure 21 : Micrographie de <i>Leishmania</i> .....	54
Figure 22 : Organisation du génome du LRV1-1 .....	59
Figure 23 : Schéma des génomes de LRV1 et 2 .....	60
Figure 24 : Modèle hypothétique de l'activité transcriptionnelle du virion L-A .....	62
Figure 25 : Structure en tige-boucle prédite en 5'UTR des transcrits de LRV1-4 .....	63
Figure 26 : Origine supposée de quelques virus de parasites et de Totiviridae.....	162
Tableau 1 : Les <i>Leishmania</i> affectant l'homme .....	14
Tableau 2 : Les vecteurs et hôtes animaux de la leishmaniose en Guyane .....	47
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des anciennes et nouvelles nomenclatures de Leishmaniavirus identifiés entre 1992 et 1995.....	55
Tableau 4 : Prévalence des LRV dans le Nouveau et l'Ancien Monde (1996 à 2016).....	57
Tableau 5 : Sensibilité in vitro des <i>Leishmania</i> à la pentamidine en présence ou en absence du LRV .....	119

## LISTE DES ABREVIATIONS

(+) : positif  
(-) : négatif  
aa : acides aminés  
ADN : acide désoxyribonucléique  
AGO1 : argonaute-1  
ARN : acide ribonucléique  
ARNi : ARN interférence  
ARNm : ARN messenger  
AsTV : *Armigeres subalbatus totivirus*  
CCL5 : C-C motif chemokine Ligand 5<sup>1\*</sup>  
CDS : centre de santé  
CHC : Centre Hospitalier de Cayenne  
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
CNV : *Camponotus nipponicus virus*  
CSpV-1 : *Cryptosporidium parvum virus 1*  
CXCL10 : C-X-C motif chemokine Ligand 10\*  
db : double brin  
DTV : *Drosophila totivirus*  
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
gag : groupe antigen (protéine d'enveloppe)  
GLV : *Giardia lamblia virus*  
GP63 : glycoprotéine 63  
ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses  
IFN : interferon\*  
IL : interleukine\*  
IMNV : *Infectious myonecrosis virus*  
IRES : Internal Ribosome Entry Site  
kb : kilo base(s)  
kDa : kilo dalton(s)  
LBV-1 : *Leishbunyavirus-1*  
LC : leishmaniose cutanée  
LCD : leishmaniose cutanée diffuse  
LCL : leishmaniose cutanée localisée  
LCM : leishmaniose cutanéomuqueuse  
LD : leishmaniose disséminée  
Lepsey NLV1 : *Leptomonas Seymouri Narna-like virus 1*  
LM : leishmaniose muqueuse  
Lmar LBV1 : *Leishmania martiniquensis Leishbunyavirus-1*  
LPG : lipophosphoglycane  
LRV : *Leishmania RNA virus*  
LT : Lymphocytes T  
LTCD4+ : Lymphocytes T CD4+

---

<sup>1</sup> \* voir annexe 1

LTCD8+ : Lymphocytes T CD8+  
 LTh : Lymphocyte T helper  
 LV : leishmaniose viscérale  
 Mb : méga base  
 ml : milli-litre(s)  
 µm : micro-mètres(s)  
 MyD88 : Myeloid differentiation primary response 88  
 NF-κB : Nuclear Factor-kappa B  
 ng : nano-gramme(s)  
 NK : Natural Killer  
 NLV : *Narna-like virus*  
 NO : Nitric Oxyde  
 nt : nucléotide(s)  
 OMRV : *Omono river virus*  
 ORF : Open Reading Frame  
 PCR : Polymerase Chain Reaction  
 PMCV : *Piscine myocarditis virus*  
 PnVA : *Panax notoginseng virus*  
 pol : polymérase  
 PSG : Promastigote Secretory Gel  
 RdRp : RNA polymerase RNA dependant  
 RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism  
 RPMI : Roswell Park Memorial Institute (medium)  
 RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction  
 sb : simple brin  
 ScV : *Saccharomyces cerevisiae virus*  
 SL : Spliced Leader  
 Ter : terminal  
 TGF-β : Transforming Growth Factor-bêta  
 Th1 : cellule T helper 1  
 Th2 : cellule T helper 2  
 Th17 : cellule T helper 17  
 TLR : Toll Like Receptor  
 TNF : Tumor Necrosis Factor\*  
 ToV-TJ : *Tianjin totivirus-like virus*  
 T reg : cellule T régulatrice  
 TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β  
 TVV : *Trichomonas vaginalis virus*  
 UI : Unité Internationale  
 UTR : Untranslated Region  
 VBS : Virus Binding Site  
 VIH : virus de l'immunodéficience humaine  
 VLP : Virus Like-Particles  
 WST-8 : 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium

# INTRODUCTION

---

La leishmaniose est une parasitose causée par un protozoaire, la *Leishmania*, transmis au cours du repas de sang d'un phlébotome femelle hématophage. Les diverses manifestations cliniques de cette maladie sont associées à un certain nombre de facteurs, tels que l'espèce de *Leishmania* impliquée et la réponse immunitaire de l'hôte. La maladie peut rester asymptomatique ou se déclarer sous l'une des différentes formes cliniques. Parmi celles-ci, on distingue la leishmaniose cutanée localisée (LCL), forme la plus fréquente qui s'auto-guérit en quelques mois dans la plupart des cas, la leishmaniose viscérale (LV), forme la plus sévère puisque mortelle en absence de traitement, les leishmanioses cutanées diffuse (LCD) et disséminée (LD), qui sont des formes difficiles à traiter, et la leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) qui est une forme potentiellement grave de la maladie.

Cette parasitose, répandue dans 88 pays dans le monde, touche l'Asie, l'Afrique, l'Amérique du Sud et Centrale, ainsi que l'Europe, particulièrement la région méditerranéenne. La prévalence de cette maladie est de 14 millions de personnes infectées dans le monde, particulièrement dans les zones tropicales et tempérées. Près de 350 millions de personnes sont considérées comme étant à risque, avec une incidence annuelle de 2 millions de personnes (WHO 2010).

## 1. Généralités

### 1.1. Le parasite

Les *Leishmania* sont des protozoaires appartenant à l'ordre des Kinetoplastidae et à la famille des Trypanosomatidae. Le genre *Leishmania* est divisé en 2 sous-genres définis selon le lieu de développement des parasites dans le vecteur. Les parasites du sous-genre *Leishmania* sont dits suprapyloriens, ils se développent en amont du pylore, dans l'intestin moyen ou antérieur (midgut) du phlébotome. Les parasites du sous-genre *Viannia* sont dits péripyloriens, ils entrent dans l'intestin postérieur (hindgut) avant de migrer vers l'intestin moyen (Figure 1). Le sous-genre *Leishmania* est présent dans le Nouveau et l'Ancien Monde, tandis que le sous-genre *Viannia* est restreint au Nouveau Monde (WHO 2010).

Près d'une vingtaine d'espèces de *Leishmania* sont transmises à l'homme, la plupart étant pathogènes (Figure 2 et Tableau 1).

Ces parasites dimorphiques peuvent se trouver sous une forme intracellulaire amastigote dans les macrophages des hôtes mammifères, ou sous la forme promastigote flagellée dans le tractus intestinal de l'insecte vecteur (Torres-Guerrero et al. 2017).

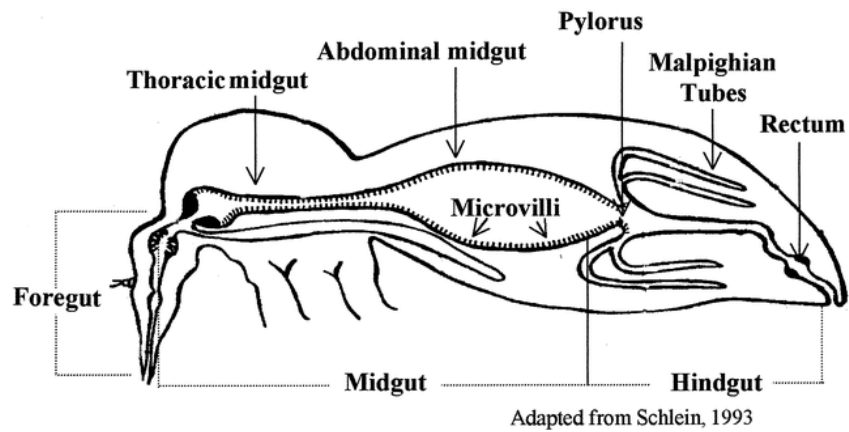


Figure 1 : Morphologie de l'intestin du phlébotome (Nieves & Pimenta, 2000)

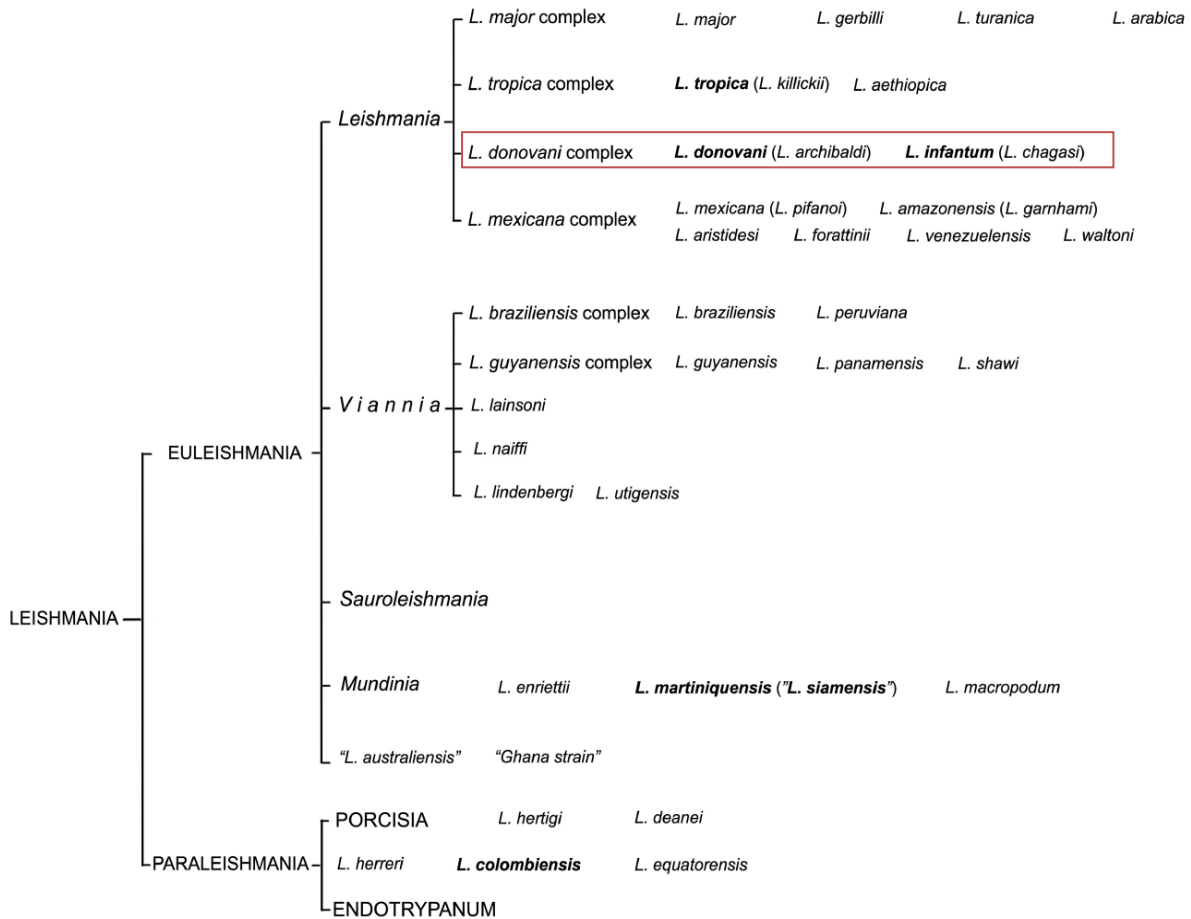


Figure 2 : Taxonomie des Leishmania (encadré rouge : espèces de Leishmania impliquées dans la leishmaniose viscérale)

Tableau 1 : Les Leishmania affectant l'homme (WHO 2010)

Subgenus	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Old World	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> <sup>a</sup> <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>		
New World	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifano</i> <sup>a</sup> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> <sup>a</sup> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i> <sup>b</sup>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
Principal tropism	Viscerotropic	Dermotropic	Dermotropic	Mucotropic

<sup>a</sup> Species status is under discussion

<sup>b</sup> Taxonomic position is under discussion

### 1.1.1. La forme promastigote

La forme promastigote est une forme extracellulaire qui se développe chez le vecteur phlébotome. Cette forme se caractérise par sa structure allongée de 12 à 20 µm de long et la présence d'un flagelle (Figure 3). C'est cette forme mobile et infectieuse (cf. 1.5.1) qui est injectée à un hôte mammifère lors d'un repas de sang du vecteur (Torres-Guerrero et al. 2017).

En conditions *in vitro*, la culture des parasites promastigotes axéniques<sup>2</sup> débute généralement avec la forme amastigote, contenue dans un prélèvement de peau d'un hôte mammifère infecté. La forme amastigote subit ensuite des modifications dans le milieu de culture pour évoluer vers une forme promastigote procyclique. Cette forme peu infectieuse se multiplie rapidement au cours de la phase exponentielle. Lorsque la culture atteint la phase stationnaire, le parasite se transforme en promastigotes métacycliques (Figure 3), une forme infectieuse très mobile qui ne se multiplie plus (Ouellette et al. 2003; Mottram laboratory 2008; Ramalho-Ortigao et al. 2010).

### 1.1.2. La forme amastigote

La forme amastigote se caractérise par sa structure ronde ou ovale de 2 à 6 µm de diamètre, où le flagelle atrophié n'est plus visible (Figure 3). Cette forme intracellulaire se développe dans les macrophages de l'hôte mammifère (Torres-Guerrero et al. 2017).

<sup>2</sup> Culture réalisée en absence de cellules hôtes.

Lorsque ces macrophages infectés sont absorbés par le phlébotome, lors d'un repas de sang, ils contaminent le vecteur.

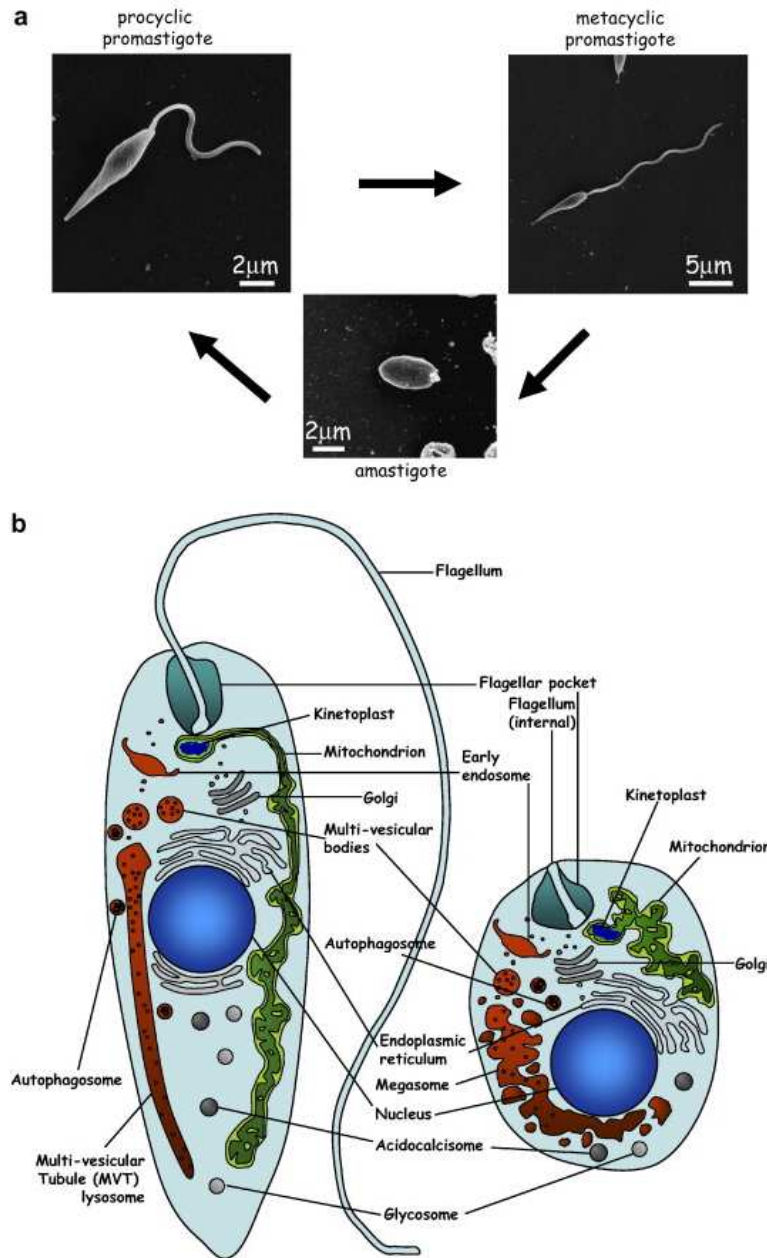


Figure 3 : Formes promastigote et amastigote des Leishmania (a) photographie au microscope électronique (b) schéma des formes promastigote et amastigote (Besteiro et al. 2007)



## 1.2. La génétique des *Leishmania*

Les *Leishmania*, étant hétéroxènes<sup>3</sup>, nécessitent une adaptation face aux différents environnements qu'elles rencontrent au cours de leur vie : du stade extracellulaire dans le tractus digestif du vecteur phlébotome, au stade intracellulaire obligatoire dans les macrophages de l'hôte mammifère.

Ces variations comprennent la modification de température, qui passe de 37 °C chez l'hôte à une température ambiante (environ 26 °C) chez le vecteur, la modification du pH de neutre chez le vecteur à très acide chez l'hôte mammifère, la variation en nutriments disponibles, mais également la réponse du système immunitaire des hôtes suite à l'intrusion du parasite. Pour s'ajuster à tous ces bouleversements, le parasite adopte des mécanismes de régulation de l'expression de ses gènes, dont certains sont peu communs aux eucaryotes, comme l'aneuploïdie (cf. 1.2.3).

### 1.2.1. Le génome des *Leishmania*

Les *Leishmania* possèdent un génome d'environ 32 Mb, réparti sur 36 chromosomes pour les espèces du sous-genre *Leishmania* (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* et *L. tarentolae*), excepté *L. mexicana* qui en possède 34. Les espèces du sous-genre *Viannia* renferment 35 chromosomes (*L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. naiffi* et *L. lainsoni*). Cette variation du nombre de chromosomes s'expliquerait par la fusion de deux chromosomes en un : les chromosomes 8 et 29, 20 et 36 chez *L. mexicana* et les chromosomes 20 et 34 chez les espèces du sous-genre *Viannia* (Wincker et al. 1996; Britto et al. 1998; Coughlan et al. 2018).

Le génome des *Leishmania*, ne contenant que très peu de gènes spécifiques à une ou quelques espèces de *Leishmania* en particulier (Peacock et al. 2007), ne permet pas de déterminer des marqueurs génotypiques relatifs aux différentes formes cliniques de la maladie. Toutefois, l'espèce *L. braziliensis* présente des particularités génomiques, tel qu'un fort taux de « single nucléotide polymorphism » (SNP), des gènes « perdus » et un grand nombre de gènes uniques (67 gènes uniques) comparativement aux autres espèces de *Leishmania*. Ces caractéristiques pourraient expliquer son tropisme métastatique et sa virulence accrue (Rogers et al. 2011).

Une autre particularité des *Leishmania* est que ces parasites possèdent un fort polymorphisme de taille de leurs chromosomes homologues, même au sein d'une même espèce de *Leishmania* (Bastien et al. 1992). Ce polymorphisme est certainement dû à des amplifications/délétions d'ADN, en particulier dans les régions sub-télomériques (Mannaert et al., 2012).

Comme tous les kinétoplastidés, les *Leishmania* renferment de l'ADN kinétoplastique au sein de leur kinétoplaste<sup>4</sup>, qui code pour des enzymes impliquées dans la respiration

---

<sup>3</sup> Parasites nécessitant au moins deux hôtes successifs pour effectuer un cycle de reproduction complet.

<sup>4</sup> ADN mitochondrial unique et condensé en de nombreux ADN circulaires.

cellulaire. On en retrouve deux types, d'une part les maxicercles, d'environ 50 kb présents en faible nombre de copies, qui codent pour des enzymes et des coenzymes impliquées dans le cycle de Krebs. D'autre part les mini-cercles, d'une taille allant de 600 à 2500 pb, qui sont présents en grand nombre de copies (Kazemi 2011). Ces derniers codent pour des ARN guides impliqués dans un processus rare de l'ARN editing, la modification post-transcriptionnelle des ARNm mitochondriaux. Ce processus peut conduire à une modification considérable de la séquence de l'ARNm par rapport à la séquence codante de l'ADN dont ils sont issus (Bañuls et al. 2007).

### 1.2.2. La transcription des gènes

Les *Leishmania* ont une organisation des gènes, une régulation de la transcription et une modification post-transcriptionnelle des ARNm inhabituelles pour des eucaryotes.

Ces cellules, dépourvues de séquences régulatrices au niveau des promoteurs, usent d'autres mécanismes de régulation de la transcription. En effet, la présence de nombreux gènes dupliqués dans les chromosomes disomiques et le nombre élevé de copies de gènes dans les chromosomes surnuméraires constituent des moyens d'augmenter le niveau de transcrits dans les parasites (Rogers et al. 2011; Mannaert et al. 2012). Ainsi, la régulation de l'expression des gènes s'effectue de manière post-transcriptionnelle. Les gènes codants sont transcrits par l'ARN polymérase II de manière bidirectionnelle, divergente ou convergente (Papadopoulou et al. 2003). Leur expression est régulée par la dégradation des transcrits (Mannaert et al. 2012).

D'autre part, les gènes sont organisés sur les chromosomes en grandes unités de transcription polycistroniques. Ces gènes, sans relation fonctionnelle entre eux, sont séparés par des régions intergéniques qui permettent la régulation et la modification des transcrits (Papadopoulou et al. 2003). Une fois les ARNm polycistroniques synthétisés, les transcrits sont clivés, puis une coiffe de 39 nucléotides (nt) appelée Spliced Leader (SL), codée par le gène mini-exon, est ajoutée par trans-épissage<sup>5</sup> en 5' de tous les ARNm. Dans le même temps, ces ARNm sont poly-adénylés au niveau de leur région 3' (Figure 4) (Papadopoulou et al. 2003).

Un certain nombre d'autres éléments, comme les régions non codantes en 3' (3' UTR : UnTranslated Region) (Papadopoulou et al. 2003) et les ARN non codants (Dumas et al. 2006) sont impliqués dans la régulation de la transcription des gènes, notamment au niveau des différents stades du parasite.

Il existe également un contrôle de la traduction et/ou de la modification des protéines et de leur dégradation (Mannaert et al., 2012).

---

<sup>5</sup> Mécanisme de maturation des ARNm spécifique aux Trypanosomatidés, consistant à ajouter systématiquement une coiffe SL en 5' de tous les ARNm.

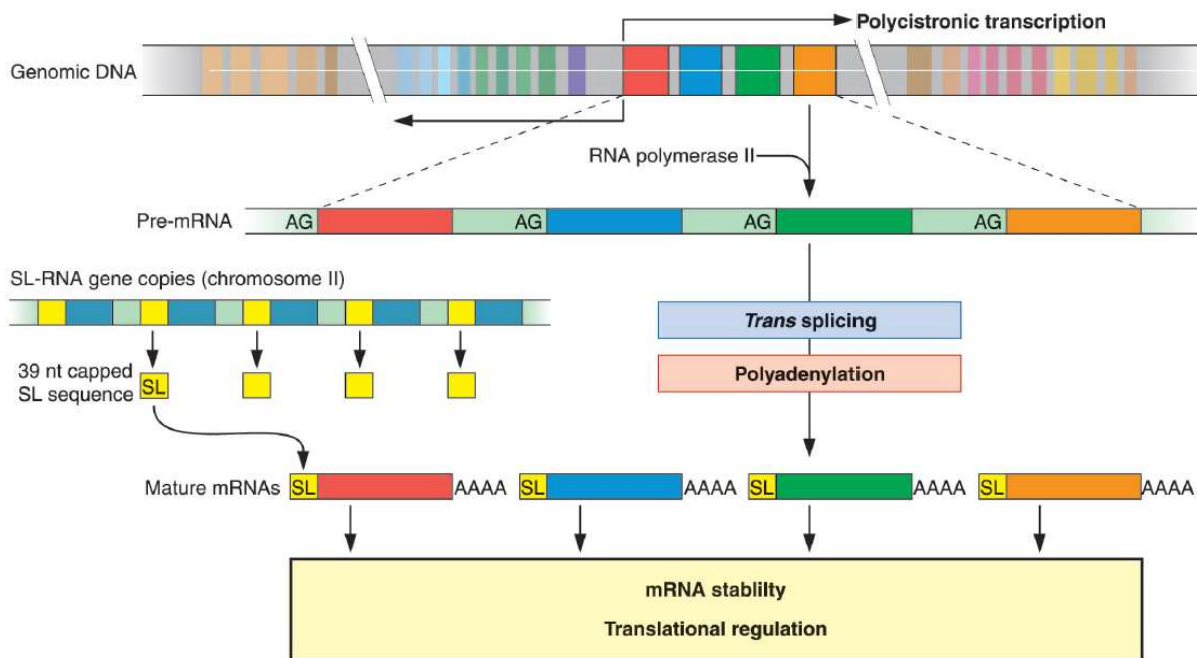


Figure 4 : Régulation de l'expression des gènes des *Leishmania* (Papadopoulou et al. 2003)

### 1.2.3. L'aneuploïdie

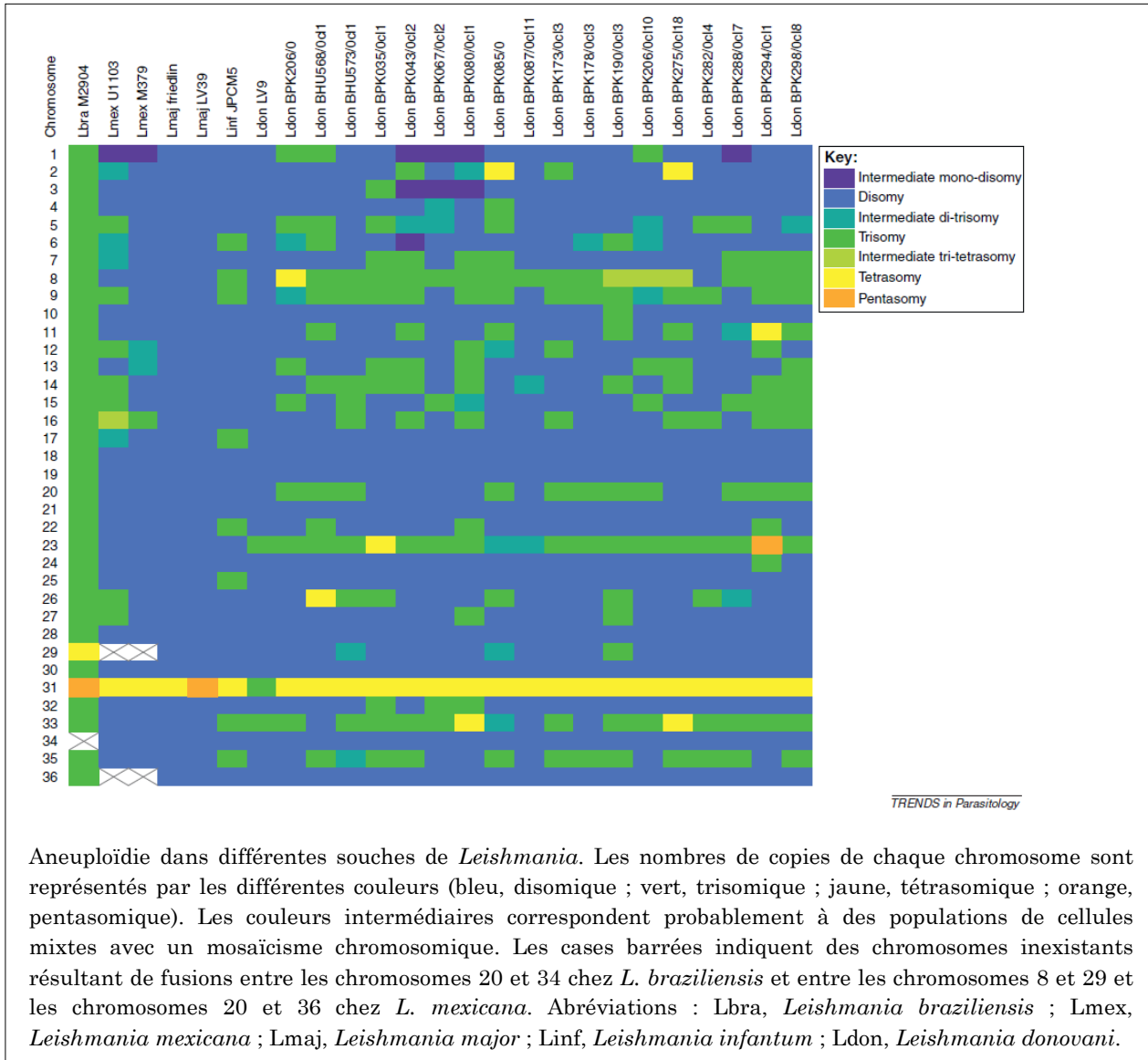
Une autre particularité des *Leishmania*, qui constitue une exception chez les eucaryotes, est la présence constitutive d'aneuploïdie mosaïque. L'aneuploïdie, qui contribue à l'évolution et à la diversification des organismes, peut être observée chez les plantes, les poissons, les levures... mais également dans les cellules tumorales (Mannaert et al. 2012; Sterkers et al. 2014).

Chez les *Leishmania*, qui sont considérées comme des organismes diploïdes, on observe une forte aneuploïdie allant de la monosomie à l'hexasomie. Cette aneuploïdie, présente chez toutes les espèces de *Leishmania*, est variable selon les chromosomes et les souches parasitaires

Figure 5) (Bastien et al. 1992; Cruz et al. 1993; Rogers et al. 2011; Sterkers et al. 2011; Mannaert et al. 2012; Sterkers et al. 2012, 2014). Bien que l'aneuploïdie soit généralement néfaste, chez les *Leishmania* cette plasticité constitue un moyen de régulation de l'expression des gènes, par un dosage génique<sup>6</sup> pondéré par le nombre de chromosomes et de gènes. La régulation peut être effectuée par duplication ou perte de chromosomes, ou par délétion ou duplication de gènes (Mannaert et al. 2012). Le dosage génique conduirait à une plasticité phénotypique qui permettrait aux parasites de s'adapter à des modifications environnementales pour en limiter les effets néfastes (Rogers et al. 2011; Mannaert et al. 2012; Iantorno et al. 2017). Cette plasticité pourrait également affecter la clinique du patient et la susceptibilité aux médicaments (Iantorno et al. 2017). En effet, il a été observé qu'un stress induit par une pression

<sup>6</sup> Niveau d'expression d'un gène donné selon son nombre de copies présent dans le génome.

médicamenteuse conduit à la modification du caryotype des parasites, se manifestant par le gain ou la perte du nombre de chromosomes, leur permettant ainsi de résister à l'action des médicaments (Ubeda et al. 2008). Ce mécanisme permettrait également de pallier la rareté des recombinaisons sexuées chez les *Leishmania* (Mannaert et al. 2012).



Aneuploïdie dans différentes souches de *Leishmania*. Les nombres de copies de chaque chromosome sont représentés par les différentes couleurs (bleu, disomique ; vert, trisomique ; jaune, tétrasomique ; orange, pentasomique). Les couleurs intermédiaires correspondent probablement à des populations de cellules mixtes avec un mosaïcisme chromosomique. Les cases barrées indiquent des chromosomes inexistantes résultant de fusions entre les chromosomes 20 et 34 chez *L. braziliensis* et entre les chromosomes 8 et 29 et les chromosomes 20 et 36 chez *L. mexicana*. Abréviations : Lbra, *Leishmania braziliensis* ; Lmex, *Leishmania mexicana* ; Lmaj, *Leishmania major* ; Linf, *Leishmania infantum* ; Ldon, *Leishmania donovani*.

Figure 5 : Aneuploïdie chez différentes souches et espèces de *Leishmania* (Mannaert et al. 2012)

L'aneuploïdie est le résultat d'une distribution asymétrique des chromosomes pendant la mitose, conduisant soit à une perte de chromosomes, dû à un défaut de réplication de l'un des chromosomes homologues, soit au gain d'un chromosome, dû à la réplication répétée de l'un des chromosomes (Figure 6) (Sterkers et al. 2012). Ce processus conduit à un mosaïcisme chromosomique permanent où des parasites au sein d'une même souche ou issus d'un même clone posséderaient chacun un caryotype unique (Sterkers et al. 2011; Mannaert et al. 2012; Lachaud et al. 2014).

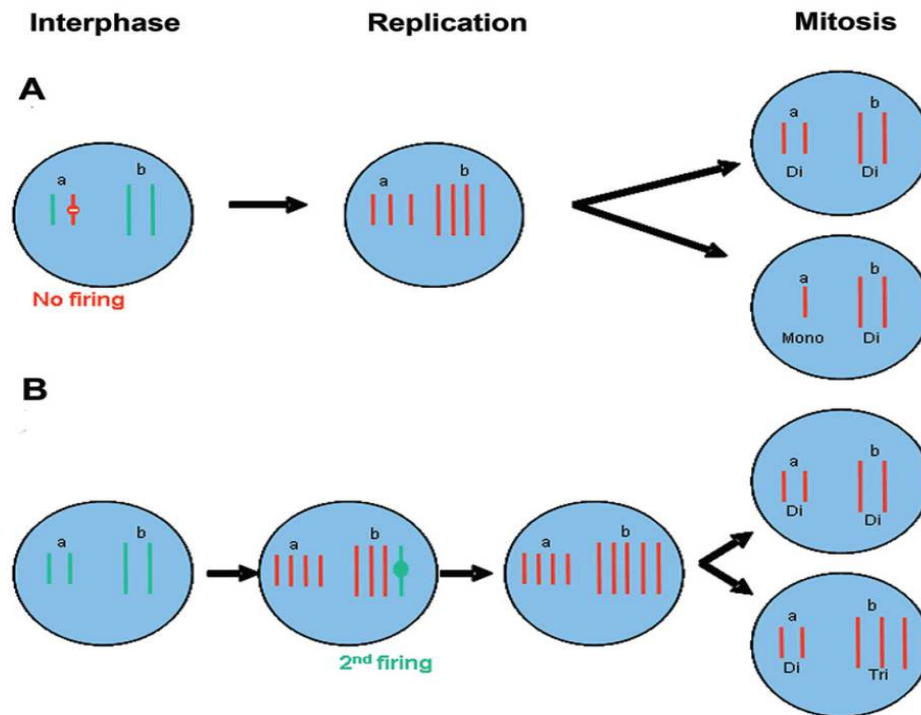


Figure 6 : Mécanisme de l'aneuploïdie (Sterkers et al. 2012)

#### 1.2.4. La reproduction des *Leishmania*

La reproduction des *Leishmania* a longtemps été considérée comme majoritairement clonale (Tibayrenc et al. 1990). Mais de nombreux débats ont lieu autour de la question (Rougeron et al. 2009, 2010; Tibayrenc & Ayala 2013; Rougeron et al. 2015; Tibayrenc & Ayala 2015; Rougeron et al. 2017). En effet, certains auteurs suggèrent la possibilité d'une reproduction parasexuée, voire sexuée rare, mais néanmoins existante (Blaineau et al. 1992; Louradour et al. 2020). De plus, des cas de recombinaisons génétiques par fusion de parasites ont été mis en évidence chez la forme promastigote *in vitro* (Lanotte & Rioux, 1990) et semble donc se produire uniquement chez le vecteur phlébotome (Akopyants et al. 2009). L'existence d'hybrides, comme *L. major/L. arabica*, *L. infantum/L. donovani* dans l'Ancien Monde ou *L. guyanensis/L. braziliensis*, *L. shawi/L. guyanensis* et *L. braziliensis/L. peruviana* dans le Nouveau Monde (Bañuls et al. 2007; Coughlan et al. 2018), montrerait la possibilité d'échange de matériel génétique au cours de reproductions sexuées entre les *Leishmania* (Bañuls et al. 2007; Inbar et al. 2013, 2019). Ce phénomène, qui pourrait survenir de manière très rare, semble être transmis de manière clonale à la descendance (Akopyants et al. 2009).

Cependant, rien ne permet d'affirmer que ces recombinaisons aient eu lieu dans des cas de reproductions sexuées (Rogers et al. 2011; Lachaud et al. 2014; Sterkers et al. 2014) impliquant des gamètes et, cela, en dépit de la présence de gènes méiotiques n'étant pas

forcément associés à la méiose, mais qui sembleraient plutôt intervenir dans le mécanisme de recombinaison (Lachaud et al. 2014).

### 1.3. Le vecteur

Un vecteur, généralement un insecte hématophage, est un hôte permettant la maturation et/ou la multiplication d'un agent infectieux en son sein, ainsi que sa transmission d'un hôte à un autre. C'est au cours d'un repas de sang qu'il absorbe le micro-organisme pathogène, qui sera ensuite injecté à un autre hôte au cours d'un repas de sang ultérieur.

Le phlébotome, un diptère<sup>7</sup> appartenant à la famille des Phlebotomidae (Killick-Kendrick 1999), constitue un vecteur capable de transmettre de nombreux pathogènes. Cet insecte peut véhiculer des virus, tels que les *Phlebovirus* responsables de la fièvre de la vallée du Rift<sup>8</sup>, des bactéries telles que des *Bartonella* responsables de la maladie de Carrion<sup>9</sup>, ou des parasites, les *Leishmania*, responsables de la leishmaniose.

Parmi les 800 espèces de phlébotomes connues, 93 constituent des vecteurs probables de la leishmaniose. Les espèces incriminées dans la transmission du parasite à l'homme appartiennent au genre *Phlebotomus* dans l'Ancien Monde et au genre *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde (WHO 2010).

Cet insecte de 2 à 3 mm de long (Figure 7) est localisé dans les zones intertropicales et tempérées du globe (WHO 2010).



Figure 7 : Phlébotome femelle ((Gathany n.d.))

Il se nourrit de sucres végétaux, préférentiellement la nuit. La femelle hématophage se nourrit également de sang pour apporter les éléments nutritifs nécessaires à la maturation de ses œufs. Elle constitue ainsi un vecteur impliqué dans la transmission du

---

<sup>7</sup> Insectes n'ayant qu'une seule paire d'ailes.

<sup>8</sup> Maladie se manifestant par des fièvres chez les animaux domestiques, mais également chez l'homme, pouvant conduire au décès.

<sup>9</sup> Maladie qui provoque à terme une anémie.

parasite. Bien qu'une présence exceptionnelle de sang dans les intestins de phlébotomes mâles ait été rapportée (certainement prélevé sur des plaies, leurs mandibules n'étant pas assez développées pour percer la peau), ceux-ci ne sont pas impliqués dans le cycle de transmission de la maladie (WHO 2010).

Les lieux de vie et les périodes d'activités des phlébotomes diffèrent d'une espèce à l'autre. Certaines espèces sont localisées préférentiellement dans la canopée et ont une activité crépusculaire, tandis que d'autres vivent au niveau du sol et ont une activité nocturne (Pajot et al. 1982). La journée, ces derniers se réfugient dans des zones relativement sombres, fraîches et humides, telles que les maisons, les latrines, les caves, les écuries, les grottes, les fissures de murs, les pierres, le sol, la végétation dense, les trous et contreforts d'arbres, les terriers de rongeurs ou d'autres mammifères, les nids d'oiseaux et les termitières (Killick-Kendrick 1999).

Bien que la présence de lumière artificielle ne perturbe pas l'activité nocturne des phlébotomes situés au niveau du sol (Schlein et al. 1992), en revanche le CO<sub>2</sub> et les kairomones<sup>10</sup> émis par l'homme peuvent attirer les femelles (Pinto et al. 2001). Les attaques des femelles peuvent également être suscitées par l'intrusion ou l'altération du biotope des phlébotomes par l'homme (Pajot et al. 1982).

Les modifications environnementales engendrées par l'homme ont contraint les phlébotomes à s'adapter à de nouveaux écosystèmes perturbés, et donc à de nouvelles sources de sang. Les animaux domestiques et l'homme sont ainsi devenus des hôtes pour le vecteur. De ce fait, le cycle de transmission sylvatique des phlébotomes s'est étendu à un cycle périurbain et urbain (Reithinger et al. 2007). Les distances de déplacement des phlébotomes sylvatiques, de l'ordre de 200 m à 1 km (Killick-Kendrick et al. 1986), se sont étendues à plus de 2 km pour les espèces péri-domestiques (WHO 2010).

En ce qui concerne la reproduction des phlébotomes, elle débute par une parade exécutée par le mâle qui se pose sur un hôte. Lorsqu'une femelle arrive, il lui fait la cour et s'ensuit l'accouplement. La femelle se gorge de sang sur l'hôte avant, pendant ou après l'accouplement. Après les 4 à 8 jours nécessaires à la maturation des œufs, la femelle gravis<sup>11</sup> pond ses œufs en milieu terrestre, préférentiellement humide, frais et en présence de matière organique, qui sera la source nutritive des futures larves. Il faudra environ 1 mois aux larves pour devenir des adultes (Killick-Kendrick 1999) qui auront une durée de vie moyenne de 2 mois, pouvant néanmoins être réduite de moitié en cas d'infection par des *Leishmania* (Agrela & Feliciangeli, 2015) .

#### 1.4. Les hôtes

L'élargissement du spectre d'hôte des *Leishmania* à l'homme et aux animaux domestiques serait la conséquence des changements environnementaux auxquels les phlébotomes et les parasites ont dû s'adapter (Reithinger et al. 2007).

---

<sup>10</sup> Substance qui permet à un parasite ou à un prédateur de détecter, respectivement, son hôte ou sa proie à de grandes distances.

<sup>11</sup> En gestation.

En effet, toutes actions humaines provoquant des modifications environnementales tels que le changement climatique, la déforestation, les migrations, l'urbanisation, sont des phénomènes qui bouleversent la composition des mammifères et par conséquent le comportement des phlébotomes (Reithinger et al. 2007).

De plus, l'intrusion humaine dans les foyers zoonotiques forestiers, la diminution de la diversité des mammifères due à la déforestation, le développement de l'agriculture et de l'urbanisation contraint les phlébotomes à se nourrir sur l'homme (Reithinger et al. 2007). C'est ainsi que le parasite a acquis l'aptitude à mener un cycle à la fois sylvatique et domestique, urbain et périurbain (Rotureau 2006). Ainsi, la transmission de la maladie peut être à la fois anthrozoootique, le parasite pouvant être transmis entre l'animal et l'homme, mais également anthroponotique, avec une transmission interhumaine pour les espèces *L. donovani* et *L. tropica* (Alemayehu & Alemayehu, 2017).

#### 1.4.1. Les réservoirs

Un réservoir est un hôte qui doit permettre le maintien et la dissémination d'un agent pathogène, contrairement à l'hôte accidentel qui, bien qu'étant infecté, ne joue pas de rôle dans le maintien du parasite (Ashford 1996).

Ainsi, l'hôte réservoir doit garantir un équilibre entre l'agent pathogène et ses mécanismes de défense. Il faut également que l'hôte réservoir soit suffisamment abondant et vive suffisamment longtemps pour constituer une source de nourriture pérenne pour le vecteur. Les animaux réservoirs partageant le même lieu de vie que les vecteurs, tels que les terriers, ont pour avantage d'être des proies faciles augmentant ainsi les prises de repas du vecteur et permettant une meilleure dissémination du parasite (WHO 2010).

L'infection du réservoir doit également être assez longue et suffisamment non-pathogène pour permettre au parasite de survivre durant les périodes de non transmission. Enfin, le nombre de parasites doit être suffisamment élevé dans la peau ou dans le sang de l'hôte réservoir pour être prélevé par le vecteur (WHO 2010).

L'identification des hôtes réservoirs impliqués dans le cycle de la leishmaniose est très complexe, de par la pluralité des facteurs considérés. Roque et al. emploient le terme de « système d'hôte », qui implique une ou plusieurs espèces de mammifères responsables du maintien du parasite dans la nature. Chaque espèce joue un rôle dans la transmission de manière spatio-temporelle. Il distingue également les « hôtes de maintien » des parasites, ce sont les hôtes mammifères infectés qui maintiennent l'infection, et les « hôtes amplificateurs », des hôtes qui, en plus de maintenir l'infection, favorisent la transmission des parasites. Ces derniers hôtes auraient la particularité de contenir plus de parasites dans leur sang ou leur peau et sur des périodes plus longues. Ces caractéristiques peuvent être interchangeables chez un même hôte selon son état immunitaire ou autre (Roque & Jansen, 2014).

D'autres termes sont également employés, tels que les réservoirs primaires qui regroupent les mammifères hôtes responsables du maintien du parasite dans la nature,



les réservoirs secondaires qui regroupent les mammifères infectés incapables de maintenir un cycle de transmission à long terme, tel que l'homme (Shaw 1988).

#### 1.4.2. Les réservoirs dans l'Ancien Monde

Les mammifères qui constituent des réservoirs primaires de la LV due à *L. infantum* dans l'Ancien Monde sont les canidés sauvages (*Canidae spp.*) tels que les renards, les chacals et les loups. Les canidés domestiques, les chiens, constituent les principaux réservoirs de LV dues à *L. infantum* (Podaliri Vulpiani et al. 2011).

Les gerbilles (*Psammomys obesus* et *Rhombomys opimus*) sont les principaux réservoirs de *L. major*, espèce de *Leishmania* – responsable des formes cutanées – la plus répandue en Afrique (Ashford 1996, WHO 2010). Les damans (*Hyracoidea spp.*, *Procavia spp.* et *Heterohyrax brucei*), présents en Afrique et en Asie de l'Est, constituent un réservoir idéal de *L. aethiopica*, responsable de la forme cutanée. En effet, ces mammifères, qui vivent en communauté et qui partagent leur habitat avec les phlébotomes, y accumulent leurs excréments. Cette source de matière organique est essentielle au développement des larves de phlébotomes (Ashford 1996).

L'homme joue également un rôle de réservoir principal dans la LV due à *L. donovani* en Inde, au Népal, au Bangladesh et en Afrique de l'Est, ainsi que dans la forme cutanée due à *L. tropica* (WHO 2010).

#### 1.4.3. Les réservoirs dans le Nouveau Monde

Perchés dans la canopée d'Amérique latine, les paresseux à deux doigts (*Choloepus spp.*) et à trois doigts (*Bradypus spp.*) constituent des cibles de choix pour les vecteurs. En effet, leur fourrure, qui permet le développement des larves de certains phlébotomes, fournit un habitat idéal (Ashford 1996).

D'autres réservoirs ont également été décrits dans le Nouveau Monde, tels que les opossums (*Didelphimorphia spp.*) dont le pian (*Didelphis marsupialis*), les fourmiliers (*Pilosa spp.*) dont le Tamandua (*Tamandua spp.*), les tatous (*Cingulata spp.*), les rongeurs (*Rodentia spp.*) dont le rat épineux (*Proechimys spp.*) et l'agouti paca (*Cuniculus paca*), les carnivores (*Carnivora spp.*) dont le renard des savanes (*Cerdocyon thous*) et le chien des buissons (*Speothos venaticus*), les primates (*Primata spp.*) dont le capucin brun (*Cebus apella*), le saki noir (*Chiropotes satanas*) et le Tamarin de Geoffroy (*Sanguinus geoffroyi*), et les chiroptères (*Chiroptera spp.*) dont la chauve-souris fer-de-lance à lunette (*Carollia perspicillata*) (Roque & Jansen, 2014).

## 1.5. Le cycle des *Leishmania*

Les *Leishmania* ont un cycle hétéroxène qui implique une alternance entre deux hôtes : un hôte mammifère et un hôte vecteur, le phlébotome (Figure 8).

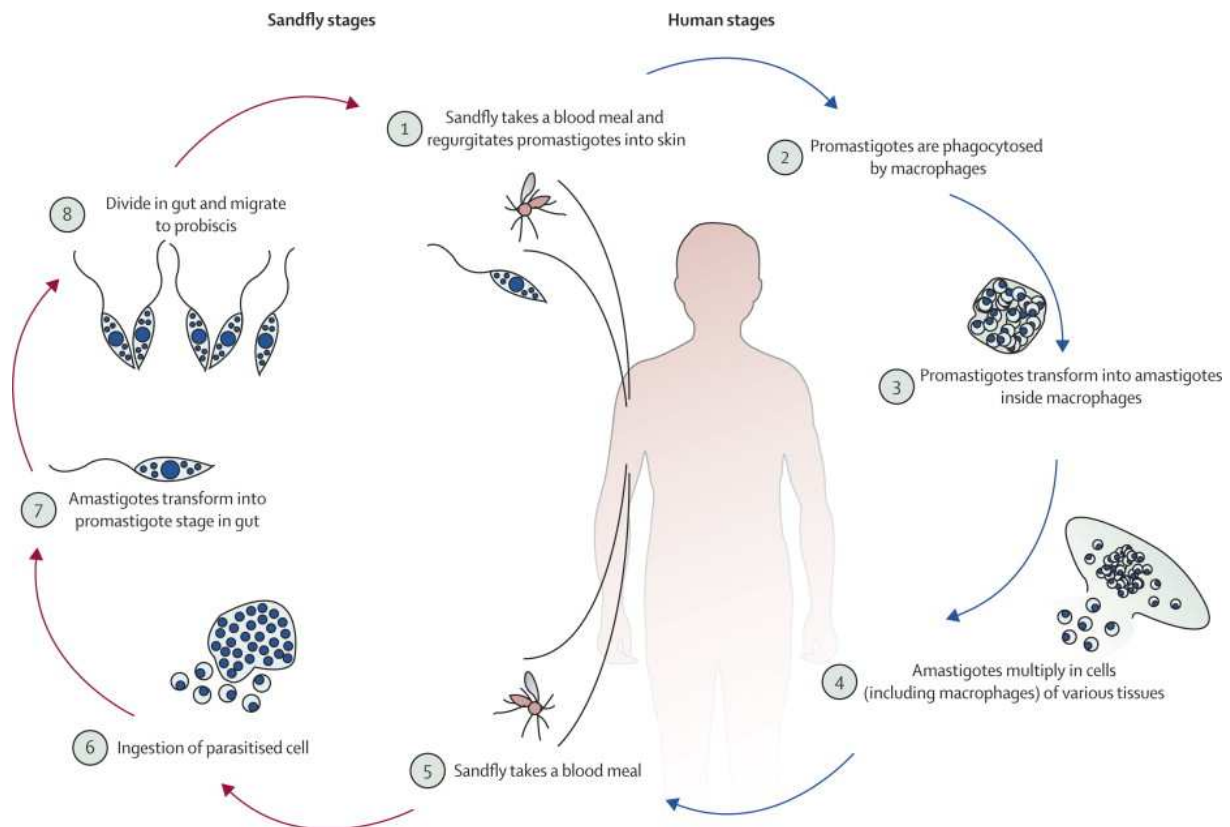


Figure 8 : Cycle hétéroxène des *Leishmania* (Reithinger et al. 2007)

Lors de son repas de sang, le vecteur infecté occasionne une plaie à l'aide de ses mandibules (semblables à des scies) sur la peau de l'hôte afin de créer un saignement pour y prélever du sang. Au moment de l'absorption du sang, les parasites sont régurgités sous la forme promastigote métacyclique par le vecteur infecté et pénètrent dans l'hôte au niveau de la plaie (1). Les promastigotes sont, dans un premier temps, phagocytés par les neutrophiles – qui sont les premières cellules à affluer massivement sur le lieu de l'infection – puis, dans un second temps, par les macrophages de l'hôte, (2) dans lesquels ils vont se différencier en amastigotes (3). La multiplication des amastigotes conduit à l'éclatement des macrophages (4) et à la libération des parasites qui pourront infecter les cellules voisines. Les macrophages infectés sont ensuite absorbés par un phlébotome non infecté, lors d'un repas de sang. La plaie formée par les pièces buccales du phlébotome génère une flaque de sang contenant des macrophages dermiques infectés et/ou des amastigotes libres (5). Les amastigotes contenus dans les macrophages ingérés (6) sont libérés dans l'intestin du vecteur. Ils vont se différencier en

promastigotes (7), qui vont se diviser puis migrer vers la trompe de l'insecte (8) afin d'être régurgités chez un hôte lors d'un prochain repas de sang (1).

### 1.5.1. Cycle dans le vecteur

L'infection d'un phlébotome se produit donc après l'ingestion de macrophages infectés présents dans le repas sanguin. Les parasites sont libérés dans l'intestin du phlébotome et la plupart d'entre eux sont lysés par l'action de protéases digestives du vecteur (Ramalho-Ortigao et al. 2010).

Les changements de température et de pH entre l'hôte et le vecteur déclenchent des processus de modification des parasites (Figure 9 et Figure 10). Ainsi, les amastigotes rescapés vont subir une différenciation afin d'évoluer vers la forme promastigote procyclique non infectieuse, une forme trapue du parasite. Cette forme permet la production de molécules de surface, tels que le phosphoglycane et le lipophosphoglycane (LPG), qui inhibent l'action des enzymes digestives du vecteur, rendant le parasite plus résistant aux attaques protéolytiques (Ramalho-Ortigao et al. 2010). Les promastigotes procycliques ont la particularité de se diviser activement dans la matrice pérित्रophique<sup>12</sup> de l'insecte, structure contenant le sang ingéré (Bates 2007; Ramalho-Ortigao et al. 2010).

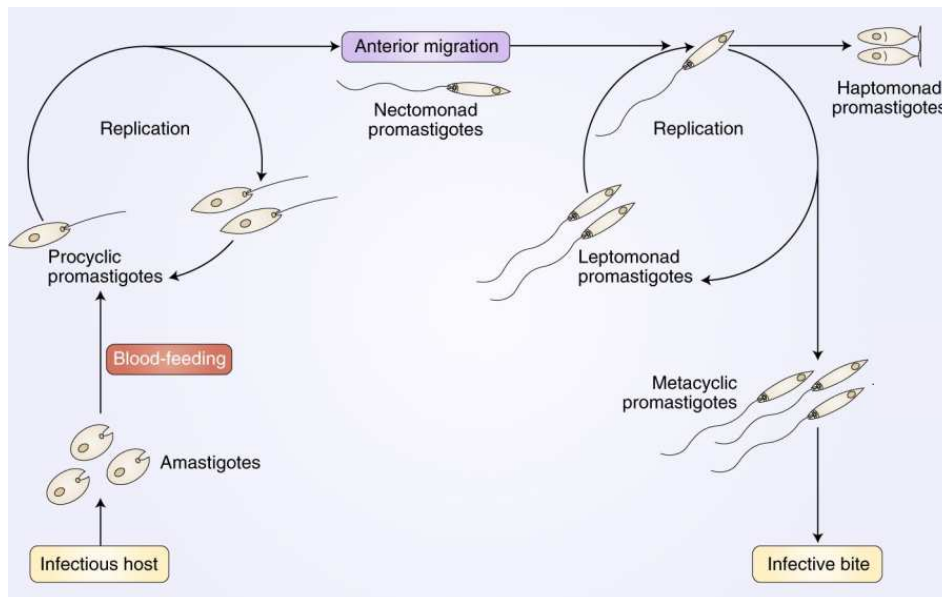
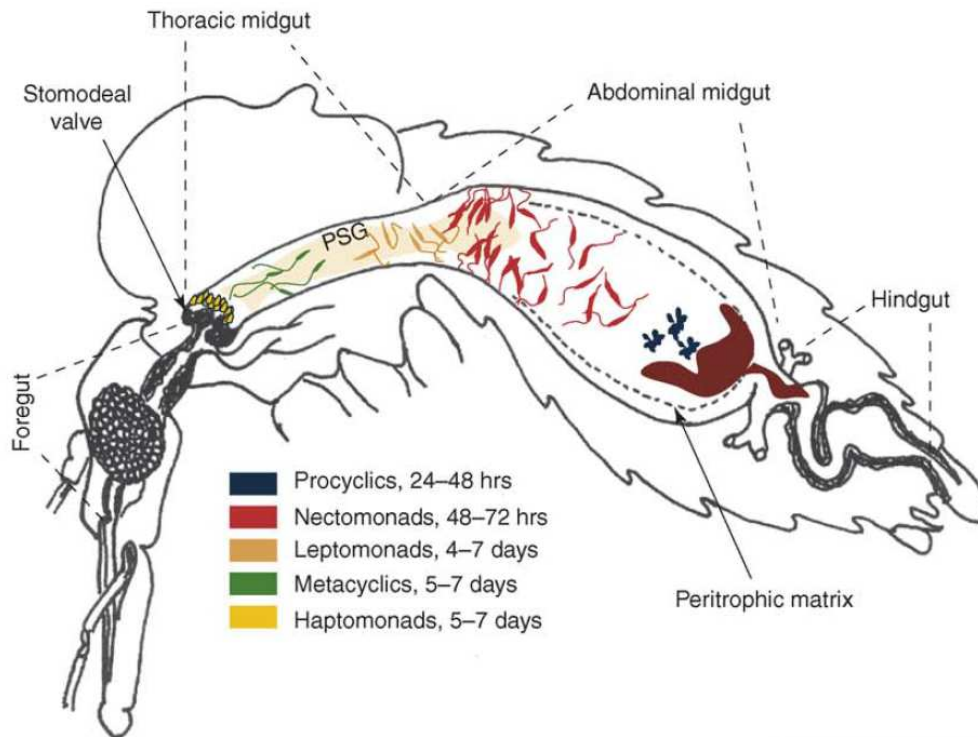


Figure 9 : Schéma du cycle des *Leishmania* chez le vecteur (modifié à partir de (Bates 2018))

<sup>12</sup> Structure composée d'un réseau de chitines et de protéines sécrétées par l'épithélium de l'intestin moyen, qui englobe le sang digéré.



TRENDS in Parasitology

Figure 10 : Cycle des *Leishmania* chez le vecteur (Kamhawi 2006)

Au bout de quelques jours, les parasites ralentissent leur multiplication pour se différencier en promastigotes nectomonades, caractérisés par une forme allongée et fortement mobile. A ce stade, les parasites s'accumulent puis quittent la matrice dégradée grâce à l'action de chitinases sécrétées par les parasites et le vecteur. Une fois arrivés au niveau de la valve stomodéale<sup>13</sup>, une partie des promastigotes nectomonades se différencie en promastigotes haptomonades, qui restent attachés à la valve stomodéale, et l'autre partie, en promastigotes leptomonades. Cette dernière forme, de plus courte taille que la forme nectomonade, se multiplie au niveau de l'intestin thoracique du vecteur et finit par se différencier en promastigotes métacycliques, forme infectieuse transmise à l'hôte au cours du repas de sang du phlébotome (Gossage et al. 2003; Ramalho-Ortigao et al. 2010).

Pour pouvoir atteindre l'hôte au cours du repas de sang du vecteur, les *Leishmania* doivent traverser la trompe de l'insecte (Schlein et al. 1992). Pour cela, les promastigotes leptomonades sécrètent une substance, le gel sécrétoire promastigote (Promastigote Secretory Gel, PSG) qui remplit l'intestin thoracique, ce qui conduit à l'obstruction de l'intestin et de la valve stomodéale. Ainsi, lorsque le phlébotome infecté aspire le sang de son hôte, celui-ci se mélange au PSG très soluble qui enveloppe les parasites. Le PSG, mélangé aux parasites et au sang, est ensuite régurgité par reflux dans la flaque de sang formée au niveau de la peau de l'hôte (Rogers 2012).

Ce gel, qui rendrait les repas de sang difficiles, conduirait à des prises de repas plus fréquentes et plus longues, augmentant ainsi les occasions de transmission des parasites

<sup>13</sup> Un sphincter qui régule le flux de nourriture.

sur différents hôtes (Rogers et al. 2004). Le nombre de parasites transmis lors du repas de sang varie entre 10 et 100 000 parasites chez le modèle murin (Kimblin et al. 2008).

### **1.5.2. Cycle dans l'hôte mammifère**

Bien que de rares cas de transmission de la leishmaniose puissent être congénitaux ou dus à l'écrasement d'un insecte infecté au niveau d'une blessure présente sur la peau (Kerdel-Vegas 1982), la principale voie de contamination de l'homme reste la voie vectorielle.

Lors d'un repas de sang pris chez son hôte mammifère, le phlébotome infecté provoque une plaie au niveau de l'épiderme de l'hôte, dans laquelle la forme promastigote métacyclique du parasite est régurgitée. Les parasites sont ensuite phagocytés par les macrophages et sont confinés dans des phagolysosomes. C'est dans ces vacuoles que les promastigotes intracellulaires évoluent vers la forme amastigote, qui se multiplie ensuite par divisions mitotiques (Torres-Guerrero et al. 2017).

A ce stade, soit l'hôte guérit spontanément, soit l'infection progresse. Si les parasites amastigotes contenus dans les macrophages restent localisés au point d'infection, on parle de LCL. S'ils se disséminent via le système lymphatique ou le système sanguin périphérique vers d'autres sites cutanés, on parle de LCD ou de LD. Si, suite à une LCL, les parasites migrent vers les muqueuses du visage, on parle de LCM (WHO 2010). S'ils migrent puis restent localisés au niveau du foie, de la rate, de la muqueuse intestinale, de la moelle osseuse ..., il s'agit d'une LV (WHO 2010). La viscéralisation dépend du tropisme des parasites. En effet, seuls les parasites thermorésistants sont capables de se développer dans les organes profonds. Cette capacité est due notamment à la sur-régulation du gène A2, qui permet au parasite de supporter ces températures plus élevées (Callahan et al. 1996; Zhang & Matlashewski 1997; Zhang et al. 2014).

#### ***1.5.2.1. Le parasite face au système immunitaire de l'hôte***

Pour pouvoir maintenir l'infection, les parasites sont obligés de déjouer les mécanismes de défense immunitaire innés et acquis de l'hôte. Les parasites possèdent des dispositifs leur permettant de détourner ou de faire face à certains processus immunitaires, tels que l'opsonisation, la phagocytose, le burst oxydatif et la production de cytokines<sup>14</sup>.

C'est au moment de la mise en place de la réponse immune que la pathologie se manifeste chez l'hôte. En effet, chez la souris, les lésions apparaissent au bout 4 à 5 semaines après l'infection. Ce délai correspond au temps nécessaire à la mise en place de la réponse immunitaire, caractérisée par l'infiltration aigue des neutrophiles, des

---

<sup>14</sup> Substances peptidiques synthétisées par les cellules immunitaires qui agissent dans la régulation de la réponse immunitaire et dans les réactions inflammatoires.

macrophages et des éosinophiles dans la peau, par l'expansion des cellules T et la dégradation des parasites (Belkaid et al. 2000).

L'état clinique de l'hôte dépend de nombreux facteurs, tels que son patrimoine génétique qui façonne la réponse immunitaire mise en place, comme cela peut être observé dans le modèle murin. En effet, les souris C57BL/6 infectées par les *Leishmania* ont la particularité de produire une réponse de type Th1, qui permet leur guérison ; tandis que les souris BALB/c produisent, quant à elles, une réponse de type Th2, conduisant à une sensibilité à la maladie.

L'espèce parasitaire joue également un rôle dans la réponse immunitaire. En fonction de l'espèce de *Leishmania* impliquée, les manifestations cliniques peuvent différer. Les souris BALB/c infectées par *L. amazonensis* présentent de fortes charges parasitaires et développent des lésions plus larges sur une période courte. En revanche, en présence de l'espèce *L. guyanensis*, ces souris maîtrisent mieux le parasite, ce qui se manifeste par une multiplication plus lente des parasites et des lésions plus petites. Cette différence est due au fait que les promastigotes *L. guyanensis* induisent un burst oxydatif qui permet l'élimination des amastigotes intracellulaires par la voie du Reactive Oxygen Intermediates (ROI) – provoquée par une fragmentation par apoptose des amastigotes – ; tandis que l'espèce *L. amazonensis* induit une réponse dépendante du NO, qui ne permet pas l'élimination efficace des parasites (Souza-Franco et al. 2006).

La réponse immunitaire est également influencée par les éléments de la salive du phlébotome, le site d'inoculation des parasites et la quantité de parasites inoculée. Par exemple, chez le hamster, l'injection de *L. panamensis* au niveau du museau entraîne une plus forte inflammation – caractérisée par la production importante d'Interferon gamma (INF- $\gamma$ ) mais également d'interleukine 10 (IL-10) –, des lésions plus sévères et une plus forte charge parasitaire, comparée à l'inoculation des parasites au niveau de la patte (Osorio et al. 2003). Aussi, la quantité de parasites injectée détermine le type de réponse mise en place et l'amplitude de cette réponse. L'injection d'une forte charge parasitaire entraîne des dommages tissulaires plus importants (Ribeiro-Romão et al. 2014)

Ainsi, selon la génétique de l'hôte et l'espèce parasitaire impliquée, la réponse immunitaire mise en place peut-être différente. Les cellules immunitaires, qui interviennent dans la mise en place de cette réponse, peuvent avoir des rôles antagonistes d'un hôte à un autre, voire d'une situation à l'autre.

#### 1.5.2.1.1. Réponse immunitaire innée

Lors du repas de sang, le phlébotome femelle infecté régurgite des parasites et de la salive dans l'épiderme de l'hôte. La salive de l'insecte contient des éléments vasodilatateurs et immunosuppresseurs qui favorisent l'infection au site de piqûre. Ces molécules inhibent la réponse immunitaire de l'hôte en empêchant les macrophages de présenter les antigènes parasitaires aux cellules T (Theodos & Titus, 1993).

La voie alterne du complément est la première défense mise en place quelques minutes après l'infection. Elle permet d'éliminer 95% des promastigotes (Rafati et al. 1997). Cependant, dans ce processus, la protéine du complément C3b qui a pour rôle de favoriser la phagocytose des micro-organismes par les macrophages dans le but de les détruire, constitue en fait une opportunité pour les *Leishmania* de se faire phagocyter et donc d'infecter leurs cellules hôtes. De plus, la présence d'une glycoprotéine de surface parasitaire, la GP63<sup>15</sup>, permet de protéger les parasites de la lyse médiée par le complément (Saha et al. 2011).

Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées dans les premières minutes qui suivent la pénétration des parasites dans l'hôte. Ces neutrophiles produisent des Neutrophil Extracellular Traps<sup>16</sup> (NETs) qui ont pour rôle de détruire les parasites. L'impact des neutrophiles va dépendre de l'espèce de *Leishmania* impliquée. *L. amazonensis* est éliminé de manière efficace par les NETs, tandis que *L. donovani* et *L. infantum* y sont résistants. Chez *L. mexicana* et *L. major* le recrutement rapide des neutrophiles contribue à la progression et à la chronicité de la maladie (Rossi & Fasel 2018).

L'exposition des neutrophiles aux parasites provoque la sécrétion d'IL-8, qui entraîne le recrutement d'autres neutrophiles sur le site de l'infection. Les neutrophiles servent de cellules hôtes dans la phase précoce de l'infection (Laskay et al. 2008; Saha et al. 2011; Liu & Uzonna 2012). Ils ingèrent les parasites qui sont ensuite confinés dans des vacuoles de phagocytose, les phagosomes. Ces derniers fusionnent avec des lysosomes pour former les phagolysosomes ou vacuoles parasitophores. Celles-ci ont pour but d'éliminer les parasites en les dégradant grâce à la présence d'enzymes lytiques et de dérivés réactifs de l'oxygène (Reactive Oxygen Species – ROS). La régulation des neutrophiles passe par leur apoptose au bout de quelques heures, voire quelques jours<sup>17</sup>. Les neutrophiles apoptotiques sont ensuite éliminés par les macrophages qui sont attirés sur le site de l'infection par, entre autre, des chimiokines<sup>18</sup> attractives produites par les neutrophiles infectés. Parmi les neutrophiles apoptotiques, certains contiennent des parasites qui ont survécu à l'environnement hostile dans lequel ils se trouvent. La phagocytose de ces neutrophiles par les macrophages permet aux parasites de s'y introduire de manière silencieuse. En effet, l'absence de contact entre le parasite et les récepteurs de surface des macrophages évite leur activation et permet à ces *Leishmania* encore vivantes de s'y multiplier. De plus, la prise de neutrophiles mourants par les macrophages conduit à la sécrétion d'IL-10 et de Transforming Growth Factor-bêta (TGF-β), ce qui conduit à une diminution de la sécrétion de l'INF-γ et du Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-α). Cela crée un environnement anti-inflammatoire qui favorise la survie des parasites dans les macrophages (Laskay et al. 2008; Saha et al. 2011; Scott &

---

<sup>15</sup> La glycoprotéine 63 est une métalloprotéase dépendante du zinc. Cette enzyme clive des protéines en présence d'un ion métallique.

<sup>16</sup> Fibrilles extracellulaires composées d'ADN associé à des protéines anti-microbiennes, telles que les élastases, les histones et les granules toxiques.

<sup>17</sup> La présence des parasites dans les neutrophiles retarde l'apoptose. Il est à noter que les études ont été menées à partir de l'espèce *L. major* et que *L. mexicana* n'entraîne pas l'apoptose des neutrophiles.

<sup>18</sup> Cytokine chimio-attractante qui favorise la migration des cellules immunitaires et leur accumulation au site de l'inflammation.

Novais 2016; Dubie & Mohammed 2020). Les macrophages sont les seules cellules permettant aux parasites d'effectuer leur cycle chez l'hôte, contrairement aux neutrophiles qui ont une durée de vie trop courte. D'autres cellules, tels que les monocytes et les cellules dendritiques, peuvent phagocyter les *Leishmania* et servir de cellule présentatrice de l'antigène (CPA) (de Menezes et al. 2015).

Les macrophages phagocytent également des *Leishmania* libres, qui se retrouvent ensuite confinées dans des phagosomes dans lesquels elles subissent, entre autres, un burst oxydatif. Ce processus consiste à produire des radicaux superoxydes et hydroxyles ayant pour rôle de dégrader les parasites ingérés. Seulement, les parasites produisent une phosphatase acide à leur surface, ce qui permet d'inhiber ce burst oxydatif. Ils possèdent également une pompe à proton au niveau de leur membrane qui maintient leur pH interne neutre. Des protéines de surface, tel que le LPG, leur permettent d'inhiber les enzymes lysosomales des macrophages (Sharma & Singh, 2009).

La résistance des parasites face au stress oxydatif rencontré dans les macrophages a certainement été acquise chez le vecteur, au sein duquel le protozoaire est soumis à de faibles niveaux de stress oxydatif, lui permettant de devenir résistant (Hartley et al. 2013).

Les parasites sont également capables d'affaiblir les macrophages en détournant l'arginine à leur profit. Cet acide aminé est initialement destiné aux macrophages pour la production de monoxyde d'azote (ou oxyde nitrique, NO). Seulement, les *Leishmania* sécrètent une enzyme, l'arginase, qui permet de dégrader l'arginine de l'hôte en polyamines qui seront absorbées par les parasites pour permettre leur croissance, privant donc les macrophages de cet acide aminé (Wanasen & Soong 2008).

#### 1.5.2.1.2. Réponse immunitaire acquise

Suite à la mise en place de la réponse immunitaire innée, vient la réponse immunitaire acquise. La réponse immunitaire précoce déterminera l'orientation de la maladie, à savoir une guérison ou une forme chronique de la maladie. La voie préférentielle permettant la guérison de l'hôte est la voie à médiation cellulaire. En effet, les lymphocytes T (LT) sont généralement responsables de l'élimination des pathogènes intracellulaires, tandis que les lymphocytes B éliminent les micro-organismes extracellulaires à l'aide de la production d'anticorps. Or, les anticorps produits au cours de la leishmaniose sont inefficaces puisque les parasites ont tendance à se cacher dans les vacuoles parasitophores des macrophages. De plus, il semblerait que les anticorps anti-*Leishmania* induisent la production d'IL-10, une cytokine clé impliquée dans la persistance de la maladie, puisqu'à vocation anti-inflammatoire (Saha et al. 2011; Scott & Novais 2016). Néanmoins, les lymphocytes B pourraient jouer un rôle protecteur dans la réponse immunitaire. Chez les souris infectées par *L. major*, la sécrétion des Immunoglobulines G favoriserait la phagocytose des antigènes de *Leishmania* par les cellules dendritiques et, ainsi, la présentation des antigènes. Cela a pour conséquence une augmentation de la production des cytokines de type Th1 (Ikeogu et al. 2020).



### 1.5.2.1.3. Réponse Th1/Th2

Lorsque les cellules dendritiques ont ingéré des micro-organismes, elles migrent vers les ganglions lymphatiques drainants afin de présenter les antigènes aux LT CD8+ (LT cytotoxiques, L<sub>Tc</sub>) et aux LT CD4+ (L<sub>Th0</sub>) naïfs, ce qui entraîne leur activation. En fonction de l'antigène impliqué, les CPA vont produire des cytokines qui vont entraîner la différenciation des L<sub>Th0</sub>, entre autres, en lymphocytes T auxiliaires de type 1 (lymphocyte T helper 1 - L<sub>Th1</sub>) ou en lymphocytes T auxiliaires de type 2 (L<sub>Th2</sub>) (Figure 11).

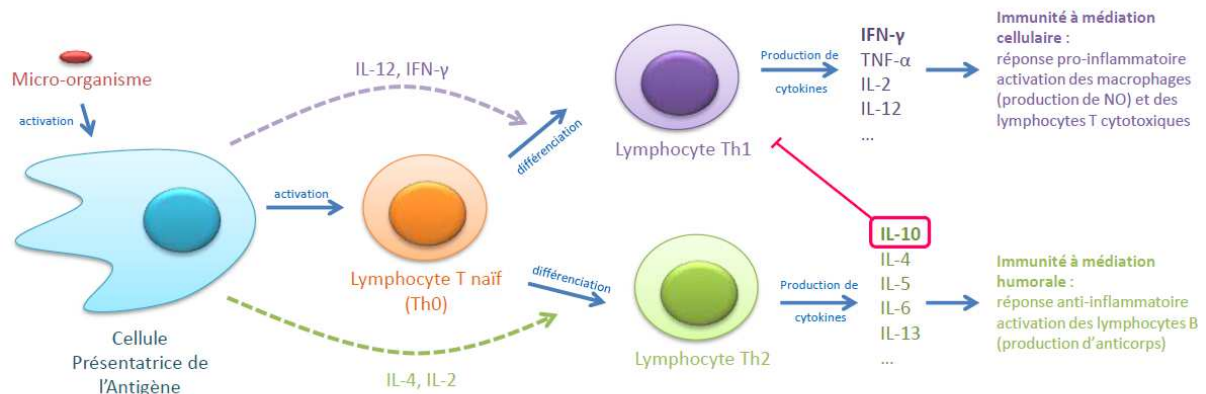


Figure 11 : Schéma de la réponse Th1/Th2

Les L<sub>Th1</sub> activés synthétisent des cytokines pro-inflammatoires, principalement l'IFN- $\gamma$  qui induit la production de NO dans les macrophages, permettant la destruction des parasites intracellulaires (Scott & Novais 2016; Dubie & Mohammed 2020).

D'autres cellules immunitaires produisent également des cytokines pro-inflammatoires. Cette production peut passer par l'activation de récepteurs, tels que le Toll-like Receptor 9 (TLR9) médié par la réponse primaire de différenciation myéloïde 88 (Myeloid differentiation primary response 88, MyD88). Cette activation, qui fait suite à la reconnaissance des motifs CpG<sup>19</sup> des *Leishmania*, module la production de cytokines telle que l'IL-12, qui oriente la réponse immunitaire vers la voie Th1 (Ives et al. 2014). S'ensuit l'activation des macrophages et des cellules dendritiques qui produisent à leur tour de l'IL-12, ce qui active les cellules Natural Killer (NK). Ces dernières produisent de l'INF- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$ , qui activent les macrophages et les cellules dendritiques infectées, qui à leur tour vont produire de l'INF- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-12. Les cellules NK ont également une activité cytotoxique, elles lysent les macrophages et les cellules dendritiques infectés. La production d'INF- $\gamma$  par les cellules NK est régulée par le TGF- $\beta$  (Scott & Novais 2016; Dubie & Mohammed 2020).

<sup>19</sup> Motifs cytosine-phosphate-guanine qui, lorsqu'ils ne sont pas méthylés, sont reconnus par les TLR9.

Les lymphocytes T cytotoxiques activés (LTCD8+) ont également une activité cytotoxique à travers les granzymes et les perforines qui lysent les macrophages infectés. Ils produisent également de l'INF- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$ , qui activent les macrophages et les cellules dendritiques. Bien que les LTCD8+ participent au contrôle de l'infection, ils peuvent également engendrer des dommages tissulaires, en particulier à cause des granzymes. Dans la LCM, ils peuvent favoriser le développement de lésions métastatiques à des sites distants de l'infection suite à une réponse inflammatoire destructive (Dubie & Mohammed 2020).

Les *Leishmania* peuvent stimuler, chez l'hôte, une production exagérée de cytokines pro-inflammatoires, responsable d'une réponse inflammatoire excessive à l'origine de dommages tissulaires incontrôlés. Un équilibre au sein de la réponse immunitaire est indispensable pour maîtriser l'infection. Cet équilibre passe par la production de cytokines anti-inflammatoires, associées à une réponse de type Th2 (Reithinger et al. 2007). Parmi ces cytokines, on compte l'IL-10, qui induit une réponse anti-inflammatoire, les IL-4 et IL-5 qui sont impliquées dans l'activation des lymphocytes B. Néanmoins, un excès de la réponse Th2 empêche l'action destructrice des microbes médiée par la voie Th1 (Reithinger et al. 2007; Hartley et al. 2012). Ainsi, un équilibre entre les deux réponses Th1/Th2 permet d'obtenir une réponse optimale, avec la production de cytokines pro-inflammatoires par la voie Th1 et des cytokines anti-inflammatoires via la voie Th2. Les cytokines de la voie Th2 désactivent les macrophages et permettent de limiter la production de cytokines de la voie Th1. Ce mécanisme permet probablement de prévenir la destruction massive des tissus, mais peut favoriser l'infection (Reithinger et al. 2007; Gabriel et al. 2019).

Chez le modèle murin, une réponse à médiation cellulaire engendrée par les LTh1 est associée à une protection contre la leishmaniose, avec une forte production d'IFN- $\gamma$  et une efficacité du NO dans les macrophages ; tandis qu'une réponse à médiation humorale de type Th2 est associée à une sensibilité à la maladie avec un fort taux d'IL-4 et IL-13, et une faible production de NO. Chez l'homme, cela est effectivement observé dans les cas de LD, où une diminution de la réponse de type Th1 permet la propagation des parasites, et de LCD, où une réponse de type Th2 conduit à une anergie complète face aux antigènes de *Leishmania* et une aggravation de la maladie (Reithinger et al. 2007; Machado et al. 2019). Cependant, les LCM induisent une réponse immunitaire différente de celle des autres formes de leishmaniose. D'une part, la réponse immunitaire est en inadéquation avec la charge parasitaire, car même en présence d'une très faible quantité de parasites (parfois indétectable), on observe une réponse immunitaire caractérisée par une hyperactivité des cellules T. Cette réponse incontrôlée conduit à une infiltration massive de cellules inflammatoires, ce qui engendre une destruction importante des tissus sains où les particules antigéniques du parasite sont localisées, en particulier dans les muqueuses nasopharyngées. D'autre part, la production d'IL-10, qui permettrait de maintenir un équilibre dans la réponse pro-inflammatoire et ainsi de limiter le torrent de signaux stimulateurs autour de la lésion, se voit diminuée dans le cas de la LCM, ce qui entraîne un déséquilibre de la réponse qui se retrouve exacerbée (Ronet et al. 2011; Scott 2011; Hartley et al. 2012, 2013).

#### 1.5.2.1.4. Réponse Th17 et T reg

Les cellules dendritiques peuvent également induire la différenciation des LTh0 en LTh17 ou LT régulateurs (LT reg). Le rôle de des cellules (LTh17 et LT reg) dépend de l'espèce de *Leishmania* impliquée et du modèle murin étudié.

L'IL-17, produite par les LTh17, est impliquée dans la réponse pro-inflammatoire et entraîne la migration, le recrutement et l'activation des cellules immunitaires. La voie LTh17 peut conférer une sensibilité ou une résistance aux souris. En présence de *L. guyanensis* ou *L. major*, la réponse immunitaire induite excessive entraîne une sensibilité à la maladie ; tandis qu'en présence de *L. braziliensis*, *L. infantum* ou *L. donovani*, la voie Th17 confère une résistance à la maladie (Rossi & Fasel 2018; Ikeogu et al. 2020). Chez l'homme infecté par *L. tropica*, la production d'IL-17 (qui peut être synthétisé par différents types cellulaires) semble être impliquée dans la pathogenèse (Katara et al. 2013). Le taux d'IL-17 peut être régulé par la présence d'IL-10, une cytokine produite notamment par les LT reg et les LTh2 (Scott & Novais 2016).

Les LT reg permettent la suppression d'une réponse immune nuisible, mais peuvent, d'un autre côté, conduire à la suppression d'une réponse immune bénéfique pour l'hôte. Les LT reg produisent de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  qui agissent sur les macrophages et les cellules dendritiques, limitant ainsi la libération de médiateurs inflammatoires par ces cellules. Chez les souris C57BL/6 infectées par *L. panamensis*, les LT reg sont associés à un contrôle de la pathologie. En revanche, en présence de *L. major*, les LT reg inhibent l'activité des LTCD4<sup>+</sup> (Scott & Novais 2016; Dubie & Mohammed 2020).

En ce qui concerne la mémoire immunitaire, il semblerait que l'homme acquiert une immunité à long terme après un contact avec le parasite (Scott 2003), mais ne semble pas présenter d'immunité croisée entre les différentes espèces de *Leishmania* (Ito et al. 2015).

Le système immunitaire ne parvient généralement pas à éliminer la totalité des parasites, ce qui conduit à la persistance de ces parasites chez l'hôte. Cela permet d'entretenir une population de LTCD4<sup>+</sup> effecteurs en capacité d'agir immédiatement en cas de nouvelle infection. Cependant ces cellules T effectrices ont des durées de vie relativement courtes. D'autres populations de lymphocytes T sont également présentes : les cellules mémoires, qui ont une durée de vie beaucoup plus longue. Parmi ces cellules mémoires, on compte les cellules T effectrices mémoire et les cellules T à mémoire centrale – qui sont toutes des cellules circulantes – et les cellules T mémoires résidents des tissus. Ces cellules sont retrouvées au niveau des lésions primaires ou à des sites distants. Les cellules mémoires effectrices et les cellules T mémoires résidents ont la capacité d'agir immédiatement en cas d'infection secondaire. En revanche, les cellules T à mémoire centrale nécessitent une étape de prolifération et de différenciation en cellules T effectrice avant d'être opérationnelles (Scott & Novais 2016; Glennie & Scott 2016).

## 1.6. Les formes cliniques de la leishmaniose

### 1.6.1. La leishmaniose cutanée

La LC (Figure 12), ou bouton d'orient, est la forme la plus fréquente de la leishmaniose. Les régions cutanées généralement touchées sont celles qui sont exposées aux piqûres du vecteur à savoir : les mains, les pieds, les jambes et le visage (Bastien & Lachaud 2016).



Figure 12 : Leishmaniose cutanée localisée (LCL) à *L. guyanensis*. Ulcération cutanée unique à bords infiltrés d'un avant-bras (P. Couppié, Service Dermatologie, Centre Hospitalier de Cayenne)

Les lésions cutanées apparaissent après une durée d'incubation allant de 15 jours à quelques mois. L'infection débute par un petit érythème au point d'inoculation, qui évolue en papule<sup>20</sup> puis en nodule<sup>21</sup> (Bastien & Lachaud 2016). Quelques semaines après, apparaît une ulcération<sup>22</sup>, généralement non douloureuse, caractérisée par une dépression du centre et des bords surélevés.

La LC peut rester localisée ou, dans certains cas, le parasite peut se disséminer dans l'hôte et conduire à une évolution de la maladie vers des formes plus sévères, telles que la LCD, la LD ou la LCM, en fonction de l'espèce de parasite impliquée et du statut immunitaire de l'hôte. Les métastases provoquées par les espèces de *Leishmania* du sous-genre *Viannia* sont plus fréquentes et plus agressives (Bañuls et al. 2011; Hartley et al. 2014).

La LC est principalement retrouvée en Afrique, en Asie et dans la plupart des pays d'Amérique latine (Gramiccia & Gradoni, 2005) (Figure 13).

---

<sup>20</sup> Bouton non purulent et ne présentant pas d'écoulement liquidien, légèrement saillant. Forme une petite tache inflammatoire et irritée sur la peau.

<sup>21</sup> Masse arrondie.

<sup>22</sup> Perte de substance de la peau touchant l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

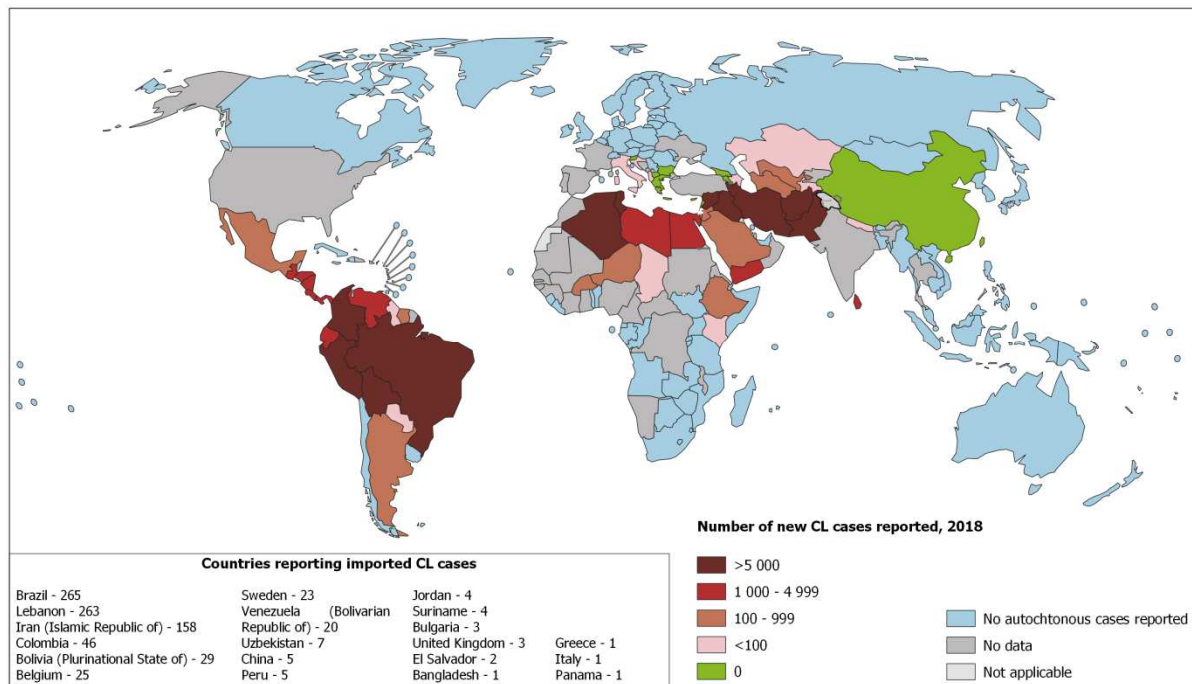


Figure 13 : La Leishmaniose cutanée dans le monde (WHO 2018a)

Les espèces de *Leishmania* dermatotropiques impliquées dans la LC sont, dans l'Ancien Monde : *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* ; et dans le Nouveau Monde : *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. shawi*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis* (Tableau 1) (Gramiccia & Gradoni 2005; Bañuls et al. 2011; Hartley et al. 2014).

Les traitements disponibles permettent d'éliminer les parasites, mais dans près de 10% des cas, le parasite n'est pas totalement éliminé. En effet, des cas de résurgences *in-situ* et à distance se manifestent notamment sous forme de nodules en périphérie des lésions cicatrisées (Bastien & Lachaud 2016).

### 1.6.2. La leishmaniose viscérale

La LV, également connue sous le terme de kala-azar qui signifie fièvre noire, est la forme la plus grave de la leishmaniose. En effet, en absence de traitement cette forme de la maladie est mortelle. Elle représente 10% de toutes les leishmanioses dans le monde (Bañuls et al. 2011).

La durée d'incubation est généralement de quelques semaines à quelques mois chez les personnes symptomatiques. En revanche, chez les personnes asymptomatiques, la maladie peut se manifester au bout de quelques années ou décennies suite, notamment, à une immunosuppression (WHO 2010).

La LV se manifeste généralement par une fièvre, une perte de poids, une hépatosplénomégalie<sup>23</sup>, une pancytopenie<sup>24</sup> et dans quelques cas des lymphadénopathies<sup>25</sup> (Figure 14) (Bañuls et al. 2011; Prevention 2017; Maxfield & Crane 2020).



Figure 14 : Leishmaniose viscérale (WHO Visceral leishmaniasis n.d.)

La LV touche l'Ancien Monde, dont l'Europe du Sud, l'Afrique de l'Ouest et du Nord, l'Asie Centrale ; mais également le Nouveau Monde, à savoir l'Amérique centrale et du Sud (Figure 15) (WHO 2010).

L'espèce de *Leishmania* incriminée dans le Nouveau et l'Ancien Monde est *L. infantum*. *L. donovani* est responsable de cas de LV en Inde et au Bangladesh, tandis que l'espèce *L. tropica*, responsable de LC, entraîne rarement des atteintes viscérales (Tableau 1) (WHO 2010).

La LV due à *L. donovani* peut se compliquer en évoluant vers une leishmaniose dermique post kala-azar (Post Kala azar Dermal Leishmaniasis, PKDL) parfois diffuse et difficile à traiter. Cette forme, qui se manifeste par de nombreuses lésions cutanées, pourrait provenir des parasites persistant sous forme quiescente dans l'organisme, réactivés par des traitements à base d'antimoniés ou par un stress immunologique (Hartley et al. 2014).

Concernant les traitements, ils sont d'autant plus efficaces qu'ils sont administrés tôt (Prevention 2017).

---

<sup>23</sup> Augmentation du volume du foie et de la rate.

<sup>24</sup> Diminution du nombre de globules rouges, globules blancs et plaquettes.

<sup>25</sup> Augmentation du volume des ganglions lymphatiques qui peuvent devenir douloureux.

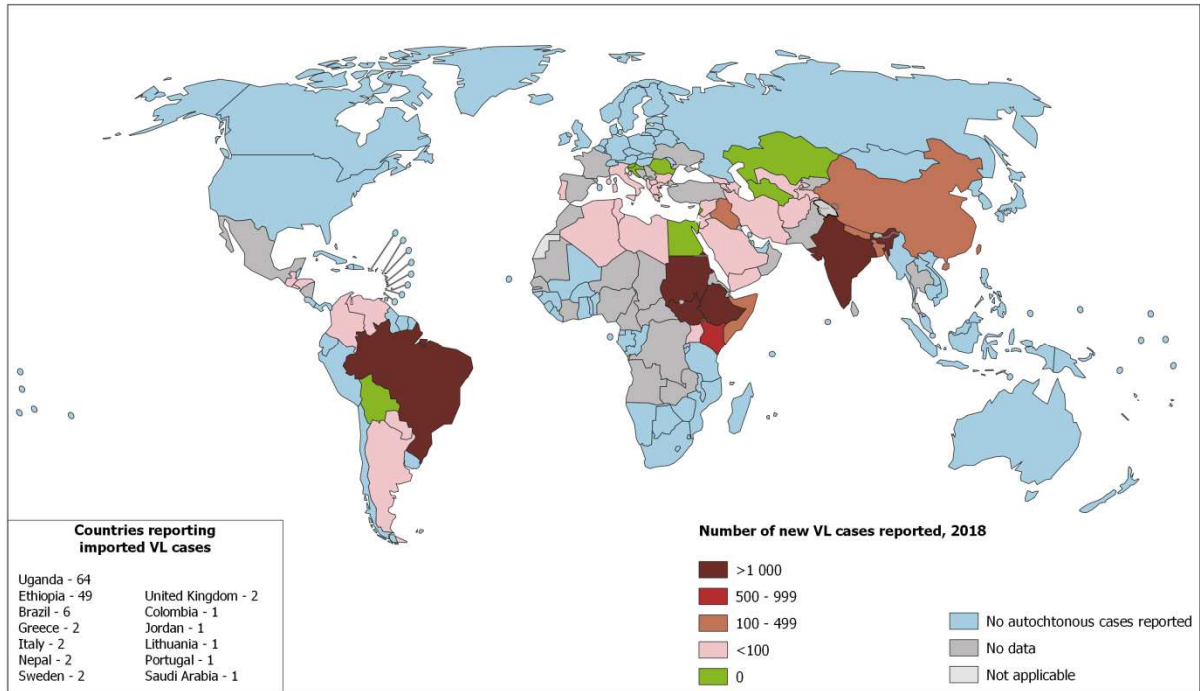


Figure 15 : La leishmaniose viscérale dans le monde (WHO 2018b)

### 1.6.3. Les leishmanioses cutanées diffuse et disséminée

La LCD est une forme grave, mais extrêmement rare de la maladie. Bien que difficile à traiter, elle nécessite impérativement une prise en charge thérapeutique (Reithinger et al. 2007). Elle se manifeste par une lente dissémination de nodules non ulcérés (ce qui la différencie des CL multiples et des LD) chargés de parasites sur l'ensemble du corps, qui s'agrandissent au cours du temps jusqu'à former des plaques (Figure 16) (Bastien & Lachaud 2016; Maxfield & Crane 2020).

La LCD touche les sujets anergiques<sup>26</sup> vis-à-vis des antigènes de certaines espèces de *Leishmania* et les sujets immunodéprimés, chez lesquels les parasites se disséminent dans les tissus, la lymphe et le sang. Les espèces impliquées sont *L. aethiopica* dans l'Ancien Monde et *L. amazonensis* dans le Nouveau Monde (Bañuls et al. 2011; Gramiccia & Gradoni 2005; Torres-Guerrero et al. 2017).

<sup>26</sup> Patients ne développant pas de réponses immunitaires vis-à-vis du pathogène.



*Figure 16 : Leishmaniose diffuse (LCD) à L. amazonensis. Lésion à type de plaque non ulcérée du bras (R. Pradinaud, P. Couppié, Service Dermatologie, Centre Hospitalier de Cayenne)*

La LD (Figure 17) est une forme sévère des leishmanioses cutanées. Elle se déclare 2 à 6 semaines suite à une (ou plusieurs) lésion ulcérée initiale, à partir de laquelle le parasite se dissémine dans l'hôte via le système lymphatique et/ou sanguin. La LD se caractérise par l'apparition de plus de 10 lésions mixtes (acnéiforme, papule, nodule, ulcération...), pouvant aller jusqu'à quelques centaines de lésions. Celles-ci ont la particularité d'être localisées à plus de deux sites différents sur le corps, en particulier sur le tronc et les jambes. Le visage peut également être atteint, avec une implication des muqueuses nasales dans plus de 53% des cas, qui se manifeste par une inflammation non ulcérée des muqueuses. Dans de plus rares cas, une infiltration et une ulcération de la cloison nasale peuvent survenir (Machado et al. 2019; Maxfield & Crane 2020).



*Figure 17 : Leishmaniose disséminée (LD) à L. guyanensis. Présence d'une lésion ulcérée présente initialement et de multiples papules apparues secondairement (Couppié et al. 2004)*



L'espèce majoritaire incriminée dans la LD est *L. braziliensis*. Des cas dus à *L. panamensis* et *L. guyanensis* ont également été rapportés (Couppié et al. 2004; Darmon et al. 2016; Machado et al. 2019).

Cette forme de la maladie, particulièrement difficile à traiter compte tenu du nombre de lésions engendré, présente un taux de guérison de 23% chez des patients traités aux antimoniés pentavalents au Brésil (Machado et al. 2019).

La LD se différencie de la LCD et de la LC à lésions multiples (chez les sujets immunodéprimés) par le fait que la LD génère principalement des papules superficielles et dans une moindre mesure des ulcérations. En revanche, la LCD occasionne des plaques<sup>27</sup> infiltrées et des nodules. Quant à la LC multiple, elle correspond à des ulcérations localisées aux points de piqûres multiples des phlébotomes.

#### 1.6.4. La leishmaniose cutanéomuqueuse

La LCM ou espundia est une forme tégumentaire sévèrement mutilante, qui s'attaque aux muqueuses du visage, préférentiellement le nez (Figure 18) (Reithinger et al. 2007; Bastien & Lachaud 2016).



Figure 18 : Leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) à *L. guyanensis*. Perforation de la cloison nasale (P. Couppié, Service Dermatologie, Centre Hospitalier de Cayenne)

Dans 1 à 10% des cas, la LC évolue vers une LCM. Cette forme peut également apparaître spontanément en absence de LC, on parle alors de leishmaniose muqueuse (LM), ou simultanément avec une LC. Elle peut également se manifester quelques mois, voire des années (1 à 5 ans) après la guérison d'une LC (Reithinger et al. 2007; WHO 2010). Cela est dû au fait que certains parasites en dormance dans les phagolysosomes

---

<sup>27</sup> Lésion solide plus large qu'épaisse, pouvant résulter de l'association de plusieurs nodules ou papules.

des macrophages peuvent se réactiver des années après l'infection initiale, suite à un stress ou une immunodépression, et provoquer des LCM et des métastases (Ronet et al. 2011; Jara et al. 2019).

Dans l'Ancien Monde, la LCM fait suite à l'extension des lésions primaires, tandis que dans le Nouveau Monde, la LCM résulte de la dissémination lymphatique du parasite à partir de la lésion primaire (LC) vers les sites secondaires (LCM) (Reithinger et al. 2007; Bastien & Lachaud 2016). Cette forme se caractérise par l'atteinte des muqueuses et des cartilages de la voie oro-nasopharyngée pouvant entraîner la perforation du palais. Cela provoque une communication entre les fosses nasales et la cavité buccale, pouvant s'étendre au larynx, ce qui altère la parole, la respiration et la déglutition. Ces dégradations peuvent conduire à une détresse respiratoire aiguë ou à une surinfection broncho-pulmonaire provoquant la mort (Bañuls et al. 2011; Gramiccia & Gradoni 2005; Maxfield & Crane 2020).

La détection de parasites dans les muqueuses saines de patients atteints de LC montre que la présence même du parasite et sa dissémination ne constituent pas des facteurs de risque obligatoires dans l'évolution de la maladie vers une LCM. Le type de réponse immunitaire de l'hôte jouerait donc un rôle primordial dans l'évolution de cette forme clinique (Figuerola et al. 2009).

Le traitement de la LCM est impératif pour permettre la résorption de la lésion. Cependant, cette forme a la particularité d'être résistante aux antimoniés et d'entraîner des rechutes fréquentes. Une association des antimoniés à la pentoxyphylline, un inhibiteur du TNF- $\alpha$ , permettrait de pallier ces résistances (Ronet et al. 2011).

La région du monde la plus touchée par cette forme est le nord du Brésil (Cantanhêde et al. 2015). La LCM est principalement causée par *L. braziliensis*, qui est responsable des complications les plus sérieuses. Plus rarement, elle peut être provoquée par *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis*, *L. major*, *L. tropica* ou *L. infantum* (Reithinger et al. 2007; Bañuls et al. 2011).

## 1.7. Les traitements

Les traitements actuellement disponibles contre la leishmaniose sont basés sur les médicaments. Des vaccins anti-*Leishmania* destinés aux chiens sont disponibles dans le cadre de la prévention de la maladie. Mais aucun vaccin humain n'a, à ce jour, montré d'efficacité satisfaisante (Ghorbani & Farhodi 2017; Moafi et al. 2019). Quant à la lutte anti-vectorielle, elle reste difficile en raison de l'écologie du vecteur et de ses types d'habitats particuliers.

Le choix des thérapies repose sur l'espèce de *Leishmania* impliquée, la forme de la maladie, la zone géographique et les recommandations locales (Buffet et al. 2011; Blum et al. 2014; Aronson et al. 2016). Les médicaments administrés, tels que les antimoniés, l'amphotéricine B, le fluconazole, la miltéfosine, la paromomycine ou encore la pentamidine, présentent une toxicité avérée et peuvent entraîner des effets secondaires

parfois graves. De plus, ces traitements ne permettent pas toujours l'éradication totale des parasites chez les patients.

Les antimoniés ont longtemps constitué le traitement de première intention, mais l'apparition de cas de résistance ont conduit à l'utilisation de traitements alternatifs tels que l'amphotéricine B ou la miltéfosine. Toutefois, au bout d'une dizaine d'année d'utilisation de la miltéfosine, des cas de résistance ont commencé à émerger en Inde (Sundar et al. 2012). De plus, la mutation d'un transporteur de la miltéfosine chez les *Leishmania* pourrait également être impliquée dans la résistance à l'amphotéricine B, conduisant à une résistance croisée. En effet, la chimiorésistance est généralement la conséquence de mutations qui surviennent lorsque le parasite se retrouve sous pression médicamenteuse. Ces mutations peuvent toucher des gènes codant pour des transporteurs membranaires impliqués dans l'accumulation des composés médicamenteux. Ces mutations conduisent à une diminution de l'influx de ces composés, comme cela est observé pour l'aquaporine 1 (AQP1), avec une diminution de l'entrée de la forme trivalente des antimoniés dans le parasite, ou encore le transporteur P-type ATPase, avec une diminution de l'absorption de la miltéfosine ou de l'amphotéricine B (Ponte-Sucre et al. 2017).

On constate également une surexpression des transporteurs ATP-binding cassette (ABC), qui permettent l'efflux des composés médicamenteux, augmentant ainsi la résistance aux traitements. Parmi ceux-ci, on compte le transporteur MRPA qui permet l'efflux des antimoniés, le transporteur Pentamidine Resistance Protein 1 (PRP1) qui permet l'efflux de la pentamidine (ABCC7), ou encore le transporteur ABCB4 qui confère une résistance à la miltéfosine. La régulation de l'expression de ces transporteurs passe par les mécanismes d'aneuploïdie des parasites, permettant un dosage génique (Ponte-Sucre et al. 2017).

La durée de demi-vie des médicaments pourrait également jouer un rôle dans leur efficacité. Par exemple, la durée de demi-vie de l'antimonié de meglumine est de 20h, contre 7 à 30 jours pour la miltéfosine. Cela peut entraîner une faible exposition des parasites intracellulaires au médicament, ce qui entraîne une persistance plus fréquente des parasites (Martínez-Valencia et al. 2017).

### 1.7.1. L'amphotéricine B

L'amphotéricine B est un antifongique utilisé dans le traitement des mycoses systémiques. Elle est également utilisée dans le traitement des leishmanioses graves (viscérales et muqueuses) ou dans les cas de résistance aux antimoniés. Elle est administrée par voie intraveineuse (Buffet et al. 2011; Blum et al. 2014; Bastien & Lachaud 2016; Aronson et al. 2016).

Cet antifongique provoque des modifications de perméabilité de la membrane cellulaire du parasite en se liant spécifiquement aux ergostérols<sup>28</sup>, créant un canal

---

<sup>28</sup> Stérol qui constitue un composant essentiel de la membrane des parasites.

transmembranaire qui conduit à la fuite des composants intracellulaires et par conséquent à la mort de la cellule (Bastien & Lachaud 2016).

L'amphotéricine B augmente la réponse de type Th1, stimulant la production des macrophages et leurs capacités phagocytaires. En revanche, elle diminue la production d'IL-10 (Saha et al. 2011).

Les effets secondaires, parfois lourds mais exceptionnels, observés au cours de ce traitement peuvent être un choc anaphylactique, un collapsus cardiovasculaire, voire un arrêt cardiaque. De plus, des cas de néphrotoxicité et de thrombopénie ont également été observés (Drugbank Amphotericin B n.d.; Bastien & Lachaud 2016). Néanmoins, une forme liposomale (Ambisome®) moins toxique est disponible (Hay 1994).

### 1.7.2. L'azithromycine

L'azithromycine, qui est administrée par voie orale, est utilisée dans le traitement des infections bactériennes, fongiques ... (Drugbank Azithromycin n.d.). Son mode d'action reste peu connu chez les *Leishmania*, mais ce composé inhibe la synthèse des protéines chez *Toxoplasma gondii* (Blais et al. 1993).

Bien que l'azithromycine soit considérée comme un médicament sûr avec une bonne tolérance chez l'adulte et l'enfant, des cas d'œdèmes de Quincke<sup>29</sup> et de jaunisse ont été reportés chez moins de 1% des patients (Das 2011).

Son rendement reste variable dans le traitement des leishmanioses dues à *L. braziliensis*, allant d'une bonne efficacité au Brésil, avec 85% de guérison (Prata et al. 2003), à une efficacité moyenne (45,5% de guérison) en Argentine (Krolewiecki et al. 2007). L'efficacité de ce traitement semble insuffisant dans les infections dues à *L. guyanensis* (7,3% de guérison) au Brésil (Teixeira et al. 2007).

### 1.7.3. Le fluconazole

Ce traitement antifongique est administré par voie orale. Il inhibe la voie de synthèse des ergostérols (Drugbank Fluconazole n.d.).

Ce médicament peut provoquer des atteintes hépatiques sévères (Collazos et al. 1995).

Le fluconazole présente dans certaines études une bonne efficacité dans les leishmanioses dues à *L. major* (Alrajhi et al. 2002; Emad et al. 2011) et *L. braziliensis* (Sousa et al. 2011). En revanche la guérison des patients infectés par *L. guyanensis* n'est pas satisfaisante (Francesconi et al. 2018).

---

<sup>29</sup> Symptôme grave d'allergie.

#### 1.7.4. L'antimoniote de meglumine (Glucantime®)

Parmi les antimonies pentavalents utilisés, on compte l'antimoniote de N-méthylglucamine (Glucantime®) et le stibogluconate de sodium (Pentostam®), qui se différencient par leur teneur en antimoine (85 mg d'antimoine pentavalent (Sb<sup>V</sup>)/ml pour le premier et 100 mg Sb<sup>V</sup>/ml pour le second).

L'antimoine nécessite d'être concentré dans les macrophages pour être efficace. Il agit par inhibition de la synthèse de l'adénosine triphosphate (ATP), des acides gras et de l'oxydation glycolytique (Bastien & Lachaud 2016).

Les antimonies activent la voie de mort cellulaire dans de nombreuses espèces de *Leishmania*, par génération de stress oxydatif, sous la forme de peroxyde d'hydrogène et d'oxyde nitrique (Hartley et al. 2012). Ils augmentent aussi la capacité de phagocytose des neutrophiles et la production d'ions superoxydes (Saha et al. 2011).

L'administration du Glucantime® s'effectue par injection intramusculaire ou, plus rarement, par injection intraveineuse.

Ce médicament, qui est largement utilisé dans le traitement de première intention de la leishmaniose, a l'avantage d'être facilement disponible et peu onéreux. Cependant son efficacité reste variable et des cas de résistance ont été rapportés depuis les années 1980, à Bihar en Inde, où plus de 60% des leishmanioses viscérales dues à *L. donovani*, espèce dont le réservoir est l'homme, ne répondent plus au traitement (WHO 2010).

De plus, cet antiparasitaire peut occasionner des myalgies, pancréatites, arythmies cardiaques et des hépatites (WHO 2010; Saha et al. 2011; Bastien & Lachaud 2016).

#### 1.7.5. La miltéfosine

Initialement utilisée comme traitement oral anticancéreux, la miltéfosine a vu son usage s'élargir au traitement de la leishmaniose de par son efficacité contre cette maladie.

La miltéfosine est un inhibiteur de la voie de biosynthèse des stérols et des phospholipides. Elle agirait donc dans le processus de synthèse de la membrane des parasites (Drugbank Fluconazole n.d.; WHO 2010).

Elle permet également l'activation des macrophages et des cellules T, augmentant la réponse de type Th1 (Saha et al. 2011).

Ce composé potentiellement embryotoxique et tératogène est proscrit chez la femme enceinte. Il peut également provoquer des effets secondaires lourds pouvant, dans de rares cas, aller jusqu'à l'insuffisance rénale (WHO 2010).

Son efficacité est satisfaisante dans les infections dues à *L. panamensis* en Colombie, avec un taux de guérison de 91%. La miltéfosine présente également des résultats intéressants dans le traitement des LC dues à *L. guyanensis* à Manaus, au Brésil, avec

71,4% de guérison (Chrusciak-Talhari et al. 2011). En revanche, le taux de guérison dans les cas d'infections dues à *L. braziliensis* atteignent 53% au Guatemala (Soto et al. 2004). Ce traitement est disponible en autorisation temporaire d'utilisation en France, chez les patients n'ayant pas guéri sous pentamidine ou sels d'antimoine.

#### **1.7.6. La paromomycine**

Cet antibactérien qui s'est révélé efficace contre la LV, semble inhiber la voie de synthèse des protéines en agissant sur les ribosomes du parasite, sans perturber les ribosomes de l'hôte mammifère (Drugbank Paromomycin n.d.; Fernandez et al. 2011). Cependant, une ototoxicité<sup>30</sup> du fœtus a été reportée pour ce médicament (WHO 2010).

Le traitement peut être administré sous forme de pommade dans les cas de LC. Son efficacité varie selon l'espèce impliquée, pouvant aller de 16,6% de guérison dans les infections dues à *L. major* et *L. tropica* en Iran (Faghihi & Tavakoli-kia, 2003) à 74,2% dans les infections dues à *L. major* en Israël (El-On et al. 1992).

#### **1.7.7. La pentamidine**

L'isethionate de pentamidine perturbe le métabolisme nucléaire des parasites conduisant à l'inhibition de la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des phospholipides et des protéines (Bastien & Lachaud 2016).

Ce traitement est administré par voie intramusculaire ou intraveineuse. Il peut provoquer des effets secondaires lourds tels que le diabète sucré, l'hypoglycémie sévère, la myocardite<sup>31</sup> et une toxicité rénale (Drugbank Pentamidine n.d.; WHO 2010).

La pentamidine présente un taux de guérison de 90% dans les cas de LC au Suriname où il est utilisé en première intention (Lai A Fat et al. 2002). En Guyane, ce traitement est également utilisé en première intention dans le traitement des LC, sauf dans les cas dus à *L. braziliensis* où un recours aux antimoniés est nécessaire (Buffet et al. 2011)

---

<sup>30</sup> Toxicité relative à l'appareil auditif.

<sup>31</sup> Inflammation des muscles cardiaques.

## 1.8. La leishmaniose en Guyane

### 1.8.1. Épidémiologie des *Leishmania*

La première description d'un cas de leishmaniose en Guyane remonte à 1943. Depuis, les cas reportés au fil des années ont permis d'établir une incidence de 2,3‰ entre 1979 et 1986. Quelques décennies plus tard, on observe une chute de cette incidence atteignant les 0,56‰ entre 2006 et 2013, ce qui pourrait être expliqué par une forte croissance démographique d'un côté et une stabilité des cas de leishmaniose de l'autre (Dedet et al. 1989; Simon et al. 2017).

Les espèces retrouvées en Guyane appartiennent majoritairement au sous-genre *Viannia*, dont l'espèce la plus fréquente est *L. guyanensis* (86%) (Simon et al. 2017). Une recrudescence de cas d'infections dues à *L. braziliensis* a été observée ces dernières années. On rapporte également des cas sporadiques dus à *L. amazonensis*, *L. naiffi* et *L. lainsoni* (Simon et al. 2017).

La forme clinique la plus fréquente en Guyane est la LCL (95% de cas). Elle est nommée de différentes manières par les populations locales. Les Amérindiens nomment cette maladie « kalasapau » chez les Wayampi et « yatuwe » chez les Palikur. Les Bushinengues la nomment « tatajasa » chez les Saramaka et « buchijasi » chez les Bonis et Djuka. Les créoles la nomment « pian bois » (Dedet et al. 1989).

Le type de lésion cutané le plus fréquent est une ulcération recouverte d'une croûte, parfois entourée de petites papules. Plus rarement les lésions cutanées ne s'ulcèrent pas, elles ont alors un aspect de papule, nodule ou plaque, parfois kératosique<sup>32</sup>. Des lymphangites sous-cutanées peuvent se manifester sous la forme de petits nodules sous-cutanés dans la zone de drainage lymphatique de la lésion (Dedet 1990). Une adénopathie locorégionale est fréquemment associée aux lésions cutanées. Les autres formes cliniques rencontrées en Guyane sont la LD (4,5%), la LCM (0,5%) et la LCD (0,01%).

### 1.8.2. La transmission de la maladie

La transmission de la leishmaniose est corrélée aux précipitations saisonnières. En effet, des pics de transmission sont observés en fin de saison sèche-début de saison des pluies (octobre-décembre) et à l'inverse, de faibles transmissions sont observées en saison des pluies.

Les transmissions sont également corrélées aux phénomènes El Niño, responsable d'un climat plus chaud et sec, et La Niña, responsable d'un climat plus froid et humide, avec respectivement des augmentations ou des diminutions de cas (Roger et al. 2013). Ces

---

<sup>32</sup> Épaississement de la couche cornée de l'épiderme (couche la plus externe).

phénomènes météorologiques ont un impact sur le comportement des phlébotomes qui sont sensibles aux pluies et par conséquent sur les cycles de transmission du parasite.

Les activités professionnelles et ludiques en forêt constituent les principaux facteurs de risque d'infection avec respectivement 84,2% et 15,8% des cas de leishmaniose. Les militaires, orpailleurs et agriculteurs font partie des individus les plus exposés à la maladie (Dedet et al. 1989; Loiseau et al. 2019).

Les parties du corps non couvertes sont les zones les plus touchées, comme les jambes dans 20,7% des cas et les avants bras dans 19,8% des cas (Dedet et al. 1989).

La proximité des habitations avec la forêt est également un facteur de risque, puisque les phlébotomes s'aventurent dans les habitats proches la nuit (Dedet et al. 1989).

La plupart des infections sont primaires (86,6% des cas), mais des cas de récurrence peuvent survenir dans 6,8% des cas, 2 mois à 3 ans après la cicatrisation. Il s'agit de lésions traitées pour lesquelles la totalité des parasites n'ayant pas disparue, resurgissent au même point d'infection primaire, provoquant une nouvelle infection. Ces résurgences peuvent également se manifester à un point différent du site initial, dans 5,9% des cas (Dedet et al. 1989).

### 1.8.3. Les vecteurs

En Guyane, 74 espèces de phlébotomes ont été recensées, dont 71 du genre *Lutzomyia*. *Lu. umbratilis* est l'espèce majoritairement impliquée dans la transmission de la leishmaniose, notamment de *L. guyanensis* (Dedet 1990). Le vecteur de *L. braziliensis* n'est pas identifié avec certitude, mais *Lu. wellcomei* et *Lu. intermedia* sont des vecteurs suspectés (Tableau 2).

Tableau 2 : Les vecteurs et hôtes animaux de la leishmaniose en Guyane (WHO 2010)

Country or territory	<i>Leishmania</i> spp.	Clinical form	Proven or suspected <i>Lutzomyia</i> vector	Proven or suspected animal reservoir
French Guiana	<i>L. guyanensis</i>	ZCL	<i>Lu. umbratilis</i>	<i>Choleopus didactylus</i> , <i>Proechimys</i> spp., <i>Didelphis marsupialis</i>
	<i>L. braziliensis</i>	ZCL, MCL	<i>Lu. wellcomei</i> , <i>Lu. intermedia</i>	Unknown
	<i>L. amazonensis</i>	ZCL	<i>Lu. flaviscutellata</i>	<i>Proechimys</i> spp.
	<i>L. naiffi</i>	ZCL	Unknown	Unknown
	<i>L. lainsoni</i>	ZCL	Unknown	Unknown

ZCL : Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (leishmaniose cutanée zoonotique),  
MCL : Muco-Cutaneous Leishmaniasis (leishmaniose muco-cutanée)



*Lu. umbratilis* est une espèce de phlébotome arboricole particulièrement abondante dans la canopée et dans les troncs d'arbres creux et larges des forêts primaires. Bien que rarement retrouvés au niveau du sol, ces phlébotomes y sont exceptionnellement abondants sur une courte période qui se situe entre la fin de la saison sèche et le début de la saison des pluies, d'octobre à décembre, moment où les précipitations sont faibles (Pajot et al. 1982; Dedet 1990; Lainson et al. 1994).

Les femelles ne sont généralement pas agressives en journée, sauf en cas d'intrusion dans leur habitat, puisqu'elles sont plutôt actives au crépuscule (au niveau de la canopée) ou après le crépuscule (au niveau du sol et dans les différents niveaux des arbres). L'abattage des arbres, qui perturbe leur habitat, conduit à l'agression des hommes par les phlébotomes (Pajot et al. 1982; Dedet 1990; Lainson et al. 1994).

C'est au cours de la période sèche et au début de la saison des pluies que le taux d'infection des femelles est le plus élevé. Ce taux est particulièrement élevé chez les phlébotome de la canopée (21,6%, avec un taux 3,9 piqûres/humain/heure) comparativement à ceux présents au niveau du sol (15%, avec un taux de 1,3 piqûres/humain/heure) (Pajot et al. 1982).

*Lu. flaviscutellata* est le vecteur de *L. amazonensis*, espèce parasitaire à l'origine des LCD. Ce vecteur a une faible anthropophilie et une activité plutôt nocturne, ce qui pourrait expliquer les rares cas de LCD observés (Weill et al. 2000).

#### 1.8.4. Les réservoirs

Les réservoirs primaires de *L. guyanensis* sont le paresseux à deux doigts (*Choloepus didactylus*) et le fourmilier (*Tamandua tetradactyla*) (Figure 19). En effet, les paresseux représentent une grande partie des mammifères de la canopée et ces animaux sédentaires et lents constituent une proie idéale pour les phlébotomes (Dedet et al. 1989; Dedet 1990; Lainson et al. 1994).



Figure 19 : Réservoirs primaires de la leishmaniose en Guyane (*Choloepus didactylus* à gauche et *Tamandua tetradactyla* à droite) – source : Wikipedia (Buffalo Zoo - Sinara Conessa)

Le marsupial (*Didelphis marsupialis*) et les rongeurs du genre *Proechimys* constituent des réservoirs secondaires (Figure 20) (Lainson et al. 1994).



Figure 20 : Réservoirs secondaires de la leishmaniose en Guyane (Didelphis marsupialis à gauche et rongeur du genre Proechimys à droite) – source wikipedia (Alex Popovkin - Guilherme Garbino, Brazil)

### 1.8.5. Diagnostic et traitements

En Guyane, le diagnostic est suspecté cliniquement, néanmoins compte tenu des diagnostics différentiels possibles (notamment l'ecthyma streptococcique<sup>33</sup>, l'ulcère de *Buruli*<sup>34</sup>, les ulcères d'origine vasculaire<sup>35</sup>, le carcinome spinocellulaire et certaines mycoses pour ne citer que les plus fréquents), celui-ci doit être confirmé par des examens microbiologiques. Les prélèvements microbiologiques sont effectués par les personnels médicaux des hôpitaux de Cayenne (dont les centres de santé (CDS)), Kourou, Saint-Laurent du Maroni et par les biologistes de certains des laboratoires de biologie (laboratoires privés, Institut Pasteur de Guyane).

L'examen microbiologique consiste au grattage de la plaie afin d'en prélever le granulome dermique où siègent les parasites extracellulaires ou contenus dans les macrophages. Le prélèvement est étalé sur une lame, puis coloré au May-Grünwald-Giemsa. La lame est ensuite observée au microscope pour mettre en évidence la présence des parasites (Simon et al. 2010). Cet examen permet de déceler 2/3 des cas positifs, confirmant ainsi le diagnostic de leishmaniose cutanée, les 1/3 restants ressortant cependant négatifs. Par ailleurs, cet examen ne permet pas de préciser l'espèce de *Leishmania* incriminée.

En parallèle, une biopsie cutanée de 4 mm de diamètre est prélevée sur le bord interne de la lésion, dans des conditions stériles et sous anesthésie locale (lidocaïne). La biopsie est mise en culture dans du milieu RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO) additionné de 20% de sérum de veau fœtal, 1% d'acides aminés non essentiels et 50 UI / ml de pénicilline-streptomycine, puis incubé à 24 °C. La culture est maintenue jusqu'à ce que les parasites soient visibles au microscope, dans un délai maximum de 4 semaines (Simon et al. 2010). La culture, ne permettant pas non plus de préciser l'espèce de *Leishmania* en

<sup>33</sup> Infection cutanée provoquée par des streptocoques, qui se caractérise par des petits ulcères, conduisant à des démangeaisons légèrement douloureuses.

<sup>34</sup> Infection cutanée due à la bactérie *Mycobacterium ulcerans*, provoquant généralement des nodules.

<sup>35</sup> Ulcères veineux ou artériels dus à des problèmes vasculaires, se caractérisant par une plaie au niveau d'un membre (par exemple la jambe) qui ne cicatrise plus depuis plus d'un mois.

cause, une réaction de polymérisation en chaîne, suivi d'un polymorphisme de longueur des fragments de restriction (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP) est ensuite effectuée à partir des parasites contenus dans le milieu de culture, afin de déterminer l'espèce de *Leishmania* incriminée (Simon et al. 2010). L'espèce peut également être déterminée par spectrophotométrie (Malditoff). En l'absence de croissance du parasite dans le milieu de culture, qui peut être due à des parasites morts suite aux conditions de transport des échantillons, la recherche d'ADN de *Leishmania* est entreprise à partir de la biopsie récupérée dans le milieu de culture, puis une RFLP est effectuée afin de déterminer l'espèce correspondante.

Lorsqu'une infection due à *L. guyanensis*, *L. naiffi*, *L. amazonensis*, ou *L. lainsoni* est confirmée, le traitement administré en première intention est la pentamidine. Dans le cas d'une infection due à *L. braziliensis* ou dans le cas d'un échec de traitement à la pentamidine, un traitement au Glucantime® est effectué. En effet, en Guyane Française, l'espèce *L. guyanensis* est moins sensible aux antimonies que *L. braziliensis* et *L. braziliensis* présente une faible sensibilité à la pentamidine (Buffet et al. 2011).

## 2. Les virus de parasites : acteurs potentiels des interactions hôtes-parasites

De nombreux facteurs sont impliqués dans la pathogénèse de la leishmaniose, tels que les facteurs génétiques de l'hôte liés à la réponse immunitaire. Ceux-ci se caractérisent par des mutations au niveau des gènes impliqués dans la réponse immunitaire, tels que l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , les interleukines 2, 4, 6, 10, le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)... Ces mutations conduisent à une modification de la régulation de ces gènes qui sont sur- ou sous-régulés. Il en découle une modification de la réponse immunitaire qui oriente différemment la clinique du patient.

On compte également les facteurs liés au parasite, qui, selon l'espèce impliquée, induira une forme pathologique spécifique (Sakthianandeswaren et al. 2009; Sardinha et al. 2011).

Des facteurs exogènes, tels que les virus contenus dans les parasites, peuvent également être impliqués dans la pathogénèse. En effet, ces entités virales peuvent modifier la virulence des parasites et conduire à une hypervirulence comme chez *Trichomonas vaginalis* et *Cryptosporidium parvum*. Dans d'autres cas, le virus ne semble avoir aucun impact sur la pathogénèse, tels que les virus abrités par *Entamoeba histolytica* ou *Giardia lamblia*. Pour d'autres virus, l'effet sur l'hôte n'a pas encore été déterminé, comme chez *Trypanosoma cruzi* et *Plasmodium vivax* (annexe 3).

### 2.1. Le Virus de *Trichomonas vaginalis*

Le *Trichomonas vaginalis virus* (TVV), un virus à ARN double brin de la famille des Totiviridae, est retrouvé dans 18,7 à 100% des isolats de *Trichomonas vaginalis* d'origine humaine (Weber 2003; Fraga et al. 2012; El-Gayar et al. 2016; Khanaliha et al. 2017; Masha et al. 2017; Rivera et al. 2017; Graves et al. 2019). Ce virus semble être associé aux manifestations cliniques de la maladie, telles que des écoulements vaginaux, une dysurie<sup>36</sup> et un érythème vaginal (Wendel et al., 2002; Fraga et al., 2007, 2011, 2012b; El-Gayar et al., 2016; Jehee et al., 2017). Quatre génotypes du TVV ont été décrits (Khoshnan & Alderete, 1993; Goodman et al., 2011b; Malla et al., 2011), dont 2 (TVV 1 et 2) seraient liés à la sévérité de ces symptômes (Fraga et al. 2012b).

Le TVV ne semble pas engendrer d'effets cytopathiques chez sa cellule hôte. En revanche, il semble engendrer des variations dans la sensibilité *in vitro* du parasite au métronidazole (Wang & Wang, 1985; Snipes et al., 2000; Fraga et al., 2005, 2007, 2011; Malla et al., 2011; Conrad et al., 2012; da Luz Becker et al., 2015; Graves et al., 2019).

Le TVV semble avoir un impact sur l'expression d'une glycoprotéine parasitaire de 270 kDa fortement immunogène, la protéine de surface P270 (Khoshnan & Alderete, 1994). La présence du virus entraîne une sur-régulation de la synthèse de cette protéine, ce qui

---

<sup>36</sup> Difficulté à uriner

entrave l'infection des cellules de l'hôte par le parasite. De plus, l'expression membranaire de cet immunogène expose le parasite au système immunitaire de l'hôte, ce qui induit la lyse des *T. vaginalis* (Petrin et al. 1998)(Khoshnan & Alderete, 1994).

La présence du virus entraîne également l'expression différentielle qualitative et quantitative de protéases à cystéine, des facteurs de virulence parasitaires qui contribuent à la survie des *T. vaginalis*. Ainsi, le TVV joue un rôle dans l'intensification de la virulence du parasite à travers ces protéases à cystéine (Provenzano et al. 1997).

Le TVV semble être reconnu par le système immunitaire de l'hôte humain et induire une sur-régulation de la réponse pro-inflammatoire. En effet, dans un modèle de culture *in vitro* d'épithélium humain, la mise en contact du parasite infecté avec des cellules endocervicales humaines induit la synthèse d'IFN- $\beta$ , de Nuclear Factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) et d'IL-8, témoins d'une infection virale. Cela déclenche également une réaction inflammatoire dépendant du Toll-Like Receptor 3/ TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  (TLR-3/TRIF), un récepteur intra- et extra- cellulaire, spécifique des ARN db viraux (Fichorova et al. 2012).

Par ailleurs, cette réponse inflammatoire semble être amplifiée en présence de métronidazole. Cette intensification pourrait être la conséquence de l'action du médicament qui provoque la mort des parasites et par conséquent leur lyse. Le grand nombre de virus ainsi libérés activerait de nombreux récepteurs spécifiques des virus (Fichorova et al. 2012).

L'exacerbation de l'inflammation due à la présence du TVV pourrait outrepasser les effets bénéfiques de la réponse immunitaire. Cela pourrait également favoriser la pathogenèse du VIH, due à la production de certains médiateurs inflammatoires qui favorisent l'infection et la multiplication de ce virus dans les cellules de l'hôte (McClelland et al. 2007; Fichorova et al. 2012).

## **2.2. Le virus de *Cryptosporidium parvum***

Le *Cryptosporidium parvum virus 1* (CSpV-1) est un virus à ARN db bisegmenté appartenant à la famille des Partitiviridae et au genre *Cryspovirus* (Nibert et al. 2009) Khramtsov et al., 2000, 1997; Khramtsov & Upton, 2000, 1998).

Ce virus ne semble pas être impliqué dans le développement des symptômes de la maladie (diarrhées, vomissements, toux et fièvre) (Jenkins et al., 2008; Sharma et al., 2016). En revanche, une association entre une forte charge virale dans *C. parvum* et une forte production d'oocystes a été observée dans deux isolats bovins issus de régions géographiques différentes. Cela pourrait indiquer un rôle du virus dans la fécondité du parasite, donc dans sa capacité à se propager et par conséquent dans sa virulence (Jenkins et al. 2008).

### 2.3. Autres virus de parasites

La présence de virus dans d'autres parasites a également été mise en évidence, très récemment pour certains, mais leur rôle dans la pathologie n'a pas encore été décrite.

Cela est le cas du virus de *P. vivax*, un virus bisegmenté de la famille des Narnaviridae, nommé Matryoshka<sup>37</sup> RNA virus 1 (MaRNAV-1) – en analogie aux poupées Russes puisqu'un virus infecte un parasite, qui infecte un animal – (Charon et al. 2019). Ou encore le virus de *Trypanosoma cruzi*, qui pourrait abriter des virus appartenant à la famille des Totiviridae, mais également des Flaviviridae (Fernández-Presas et al. 2017).

Le *Giardia lamblia* virus (GLV) (Wang et al. 1993), de la famille des Totiviridae et le virus d'*Entamoeba histolytica*, un virus à ADN (Deutsch & Zaman 1959; Miller & Schwartzwelter 1960) ne semblent pas être impliqués dans les pathologies dues à ces parasitoses.

Les virus de parasites pourraient jouer un rôle dans la virulence des parasites, comme cela semble être le cas du *Leishmania* RNA virus (LRV). En effet, ce virus – de la famille des Totiviridae – hébergé par les *Leishmania*, engendre une exacerbation de la maladie chez la souris (Ives et al. 2011). La présence de ce virus dans les *Leishmania* infectant les patients pourrait également engendrer ce type de manifestation clinique, ce qui en fait un virus d'une importance particulière.

---

<sup>37</sup> Signifie poupées russes.

### 3. Le *Leishmania* RNA virus (LRV)

La première observation de VLP dans les Trypanosomatidae a été rapportée par Molyneux en 1974 (Figure 21), dans un isolat de *Leishmania hertigi* issu d'un porc-épic (*Coendou rothschildi*) (Molyneux 1974).



Figure 21 : Micrographie de *Leishmania* montrant la présence de LRV (V = virus like-particles) (x22 000) (Molyneux, 1974)

Puis, c'est en 1988 que le *Leishmania* RNA Virus (LRV), initialement nommé LR1, a été mis en évidence dans un isolat de *L. guyanensis* (LRV1 LgyCUMC1-1A) provenant d'un patient infecté au Suriname (Tarr et al. 1988). Ce virus de la famille des Totiviridae appartient au genre *Leishmaniavirus* (Adams et al. 2014).

Depuis, le virus a été recensé dans plusieurs isolats de *Leishmania* du Nouveau Monde (annexe 2). Chaque isolat de LRV mis en évidence a été identifié comme étant un sous-type unique (

Tableau 3), allant du sous-type 1 (LRV1-1) au sous-type 12 (LRV1-12), selon l'ordre de découverte. Le LRV a également été mis en évidence dans l'Ancien Monde (annexe 2), dans les espèces *L. major*, *L. infantum*, *L. aethiopica*, ce qui a conduit à la création d'un nouveau type, le LRV2 (Widmer & Dooley, 1995; Zangger et al., 2014; Hajjaran et al., 2016). L'attribution d'un nouveau sous-type à chaque isolat de LRV identifié a conduit le comité international de taxonomie des virus (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)) à réorganiser la nomenclature des LRV. Ainsi, depuis 2014, les 11 espèces de LRV allant du sous-type LRV1-2 à LRV1-12 ont été supprimées. L'espèce nommée LRV1-1 a été remplacée par LRV1 et l'espèce LRV2-1 par LRV2 (Adams et al. 2014).

Le LRV a également été mis en évidence – occasionnellement – dans un autre Trypanosomatidae, le *Blechnomonas*, un parasite flagellé des puces (ordre des Siphonaptera) (Grybchuk et al. 2018c).

Ce virus est transmis à la descendance par ségrégation aléatoire, au cours de la division des parasites. Une potentielle transmission horizontale pourrait avoir lieu par l'intermédiaire des exosomes parasitaires, dont plus de 30% renferment le LRV (Atayde et al. 2019).

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des anciennes et nouvelles nomenclatures de Leishmaniavirus identifiés entre 1992 et 1995

Espèce	souche	Sous-type	Ancien nom	Pays de provenance de la souche	Nom actuel	Références
<i>L. guyanensis</i>	CUMC1-1A	LRV1-1	LR1	Surinam	LRV1 LgyCUMC1-1A	(Guilbride et al. 1992)
<i>L. braziliensis</i>	CUMC3	LRV1-2	LR2	Pérou		(Guilbride et al. 1992)
<i>L. braziliensis</i>	M2904	LRV1-3	LBV	Brésil (Bassin Amazonien)		(Guilbride et al. 1992)
<i>L. guyanensis</i>	M4147	LRV1-4		Brésil (Bassin Amazonien)	LRV1 LgyM4147	(Guilbride et al. 1992)
<i>L. guyanensis</i>	M1142	LRV1-5		Brésil		(Guilbride et al. 1992)
<i>L. guyanensis</i>	M1176	LRV1-6		Brésil		(Guilbride et al. 1992)
<i>L. guyanensis</i>	Bos12	LRV1-7		Brésil		(Guilbride et al. 1992)
<i>L. guyanensis</i>	Bos16	LRV1-8		Brésil		(Guilbride et al. 1992)
<i>L. guyanensis</i>	M6200	LRV1-9		Brésil (Bassin Amazonien)		(Guilbride et al. 1992)
<i>Leishmania sp.</i>	LC76	LRV1-10		Pérou		(Guilbride et al. 1992)
<i>Leishmania sp.</i>	LH77	LRV1-11		Pérou		(Guilbride et al. 1992)
<i>Leishmania sp.</i>	I.C59	LRV1-12		Pérou		(Guilbride et al. 1992)
<i>L. braziliensis</i>	FY	LRV1-13		Bolivie		(Widmer & Dooley, 1995)
<i>L. braziliensis</i>	NC	LRV1-14		Bolivie		(Widmer & Dooley, 1995)
<i>L. major</i>	ASKH	LRV2-1		Union Soviétique (CL)	LRV2-Lmj-ASKH	(Widmer & Dooley, 1995)



### 3.1. Les LRV dans le monde

#### 3.1.1. La prévalence du LRV dans le monde

Depuis la découverte du LRV dans les isolats de *Leishmania* et son potentiel rôle dans la physiopathologie de la leishmaniose, de nombreuses études ont été menées dans l'Ancien et le Nouveau Monde.

La prévalence du LRV varie grandement d'une étude à l'autre au sein d'un même continent (Tableau 4). Ces différences peuvent être liées au type de prélèvement, à l'espèce de *Leishmania* étudiée, à la zone géographique et à la technique de détection employée. En effet, différentes techniques permettent de mettre en évidence la présence du LRV dans les *Leishmania*, telles que la Reverse Transcription PCR (RT-PCR), la quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR), le western blot, le southern blot, le northern blot, le dot blot et l'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Zangger et al. 2013). Le dot blot est une technique très sensible qui permet de détecter les LRV dans moins de 100 parasites. Il permet également de détecter le virus à partir de 25 à 50 ng d'ARN total, aussi bien sous sa forme promastigote qu'amastigote. L'anticorps (nommé J2) employé dans cette technique a la particularité d'être spécifique aux ARN à structure double brin. La détection de la cible n'étant pas séquence-spécifique, la présence de mutations génétiques n'a aucun impact sur la détection du virus. D'autres anticorps peuvent être utilisés, tels que les anticorps de capsid. Mais la variabilité des protéines de capsid rend ces anticorps moins fiables que les anticorps J2 (Zangger et al. 2013). De plus, le dot blot permet de s'affranchir des risques de contaminations aéroportées, une contrainte rencontrée au cours de la technique de PCR. Les différences de prévalence peuvent être également liées au stade parasitaire étudié, comme l'a souligné Molyneux et al., indiquant que la quantité de VLP diminue lorsque le parasite se trouve sous la forme amastigote, comparativement à la forme promastigote (Molyneux 1974). Ainsi, une différence du taux de LRV peut être observée dans un même pays, notamment au Brésil où la prévalence oscille entre 0 (Macedo et al. 2016) et 70,3 % (Ito et al. 2015).

Le LRV, particulièrement présent dans la région amazonienne, a été essentiellement mis en évidence dans les parasites du sous-genre *Viannia*, notamment chez *L. guyanensis* et *L. braziliensis* (

Tableau 3). Récemment, il a été mis en évidence dans d'autres espèces du Nouveau Monde, telles que *L. lainsoni* (Cantanhêde et al. 2015), *L. shawi* (Cantanhêde et al. 2018) et *L. panamensis* (Kariyawasam et al. 2019). Le LRV a également été identifié dans le sous-genre *Leishmania*, à savoir *L. major* (Widmer & Dooley, 1995), *L. aethiopica* (Zangger et al. 2014), *L. amazonensis* (Cantanhêde et al. 2015) et *L. infantum* (Hajjarian et al. 2016).

Tableau 4 : Prévalence des LRV dans le Nouveau et l'Ancien Monde (1996 à 2016)

Année	Lieu	Espèces étudiées	Forme maladie	Matériel biologique	Technique de détection	Prévalence (nb pos./nb total et %)	Espèce LRV+	Référence
1996	Colombie	LG LB <i>L. panamensis</i>	nd	culture	Northern blot (plusieurs régions du génome) et Western blot (protéines de capsid)	4/69 5,8% (dont 4/27 (14,8%) dans le biome Amazonien)	LB	(Salinas et al. 1996)
1996	Pérou	nd	LC	culture	RT-PCR et Northern blot région 5' du LRV1-1 et 1-4	2/11 18%	nd	(Saiz et al. 1998)
2003	Brésil (Minas Gerais)	LB probable	LC LM (lésions cicatrisées et en cours de cicatrisation)	écouvillon	RT-q-PCR Région 5' (3 <sup>ème</sup> tige-boucle)	12/47 25,5%	LB (LC)	(Ogg et al. 2003)
2013	Brésil	LB LG	LC LM LCM LC récidivantes Cicatrices	biopsies	RT-PCR nichée	2/48 4,1% (dont 2/8 (25%) dans le biome Amazonien)	LG	(Pereira et al. 2013)
2014	Afrique	<i>L. aethiopica</i>	LM LC	culture	Dot blot (anticorps J2)	5/11 45%	<i>L. aethiopica</i> (CL)	(Zangger et al. 2014)
2015	Brésil	LG LB	LC LM LD LCD	brosses cervicales	RT-PCR ORF1	71/156 45,5% (dans le biome Amazonien)	LB et LG (CL + LM)	(Cantanhêde et al. 2015)
2015	Brésil (Nord)	LB LG LG+LB (mixte)	LM	brosses cervicales	RT-PCR ORF1	26/37 70,3% (dans le biome Amazonien)	LB LG LG+LB (mixte)	(Ito et al. 2015)
2007 à 2015	Iran	<i>L. tropica</i> <i>L. major</i> <i>L. infantum</i>	LC LV	culture	RT-PCR RdRp	2/50 4%	<i>L. infantum</i> (VL) <i>L. major</i> (CL)	(Hajjarian et al. 2016)
2016	Brésil (Pará, Bahia, Minas Gerais)	LB	LC LC atypiques*	culture	RT-PCR capsid	0/40		(Macedo et al. 2016)

LG = *L. guyanensis*, LB = *L. braziliensis*, nd = non-dit, LC = Leishmaniose cutanée, LM : Leishmaniose muqueuse, LD : Leishmaniose disséminée, LCD : Leishmaniose cutanée disséminée, RdRp : RNA polymerase RNA dependant, bleu : LRV issus du biome amazonien

\*Les LC atypiques se caractérisent par la formation de lupoïdes (lésions récidivantes généralement présentes sur le visage, les bras ou les jambes), de végétations ou de verrues

### 3.2. Le génome viral

La plupart des virus de parasites appartiennent à la famille des Totiviridae. La levure, un micro-organisme particulièrement étudié, a également la particularité d'abriter un virus de la famille des Totiviridae, le virus de *Saccharomyces cerevisiae* (ScV). Ce virus lui confère un avantage sélectif dû à son phénotype « killer », grâce à une toxine qu'il libère et qui lui permet de tuer les levures environnantes. Le ScV a beaucoup été étudié et peut ainsi servir de base pour la compréhension des mécanismes de reproduction des autres virus de la même famille, notamment le LRV.

Le *Leishmaniovirus* possède un génome ARN db d'environ 5,2 kb, délimité par une capsidie icosaédrique non enveloppée de 32 nm de diamètre (Tarr et al., 1988; Widmer et al., 1989). Ce virus est localisé exclusivement dans le cytoplasme des *Leishmania*, lesquelles peuvent renfermer entre 500 (Tarr et al. 1988) et 610 000 copies de ce génome viral par cellule (Ogg et al. 2003).

Le LRV est un virus non infectieux qui se transmet majoritairement aux *Leishmania* de manière verticale, c'est-à-dire au moment de la division du parasite. De ce fait, l'infection *in vitro* des *Leishmania* par des LRV reste laborieuse et transitoire. En effet, Armstrong et al. ont constaté qu'un contact direct entre le virus LRV1-1, provenant de la souche de *L. guyanensis* CUMC1-1A, et la souche *L. guyanensis* M4147, porteuse du LRV 1-4, ne permettait pas le transfert du virus dans la cellule hôte M4147. En revanche, le transfert par électroporation du virus LRV 1-1 dans la souche M4147 conduit à la production d'ARN viraux de LRV1-1 au bout de 24h. Mais le maintien du virus cesse au-delà de 4 jours, sa présence n'étant plus perceptible (Armstrong 1993). Le transfert du virus de *L. guyanensis* vers d'autres espèces de *Leishmania* dépourvues de virus a également été tenté par le biais des exosomes. Le virus a subsisté plus de deux semaines dans l'espèce *L. panamensis*, avec un niveau de LRV décroissant au cours du temps (Atayde et al. 2019).

L'élimination du LRV de sa cellule hôte semblerait être possible, comme l'affirme une équipe américaine. C'est au cours de travaux sur le clivage de la protéine de fusion que les auteurs se sont aperçus que l'hygromycine, un agent qui se fixe sur les ARN et qui inhibe la traduction, bloque la production des protéines de capsidie ou de la polymérase virale, inhibant ainsi la synthèse du virus (Ro et al. 1997a). L'utilisation d'une molécule, la 2C-méthyladenosine triphosphate (2CMA), permettrait également l'élimination du virus en inhibant l'activité polymérase des virions (Robinson & Beverley 2018).

En ce qui concerne le cycle chez le vecteur, le passage des *Leishmania* porteuses du LRV chez le phlébotome n'entraîne pas la perte du virus (Tarr et al., 1988; Weeks et al., 1992a; Zamora et al., 1995).

Les grandes similarités que le LRV partage avec d'autres virus de la famille des Totiviridae, tel que le ScV (génome L-A) de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, à savoir un génome ARN db non segmenté de taille similaire, une RdRp de séquence homologue, une localisation cytoplasmique, sa non infectiosité (Weeks et al., 1992a), pourraient

servir de base permettant de comprendre le fonctionnement potentiel du LRV, sachant que son cycle n'a pas été défini à ce jour.

### 3.2.1. Le LRV1

Le LRV1-1 est le sous-type qui a été le plus étudié. Il est constitué de 3 ORF (Figure 22), l'ORF1 dont la fonction n'est pas clairement établie à ce jour, l'ORF2 qui correspond à la protéine de capsid et l'ORF3 qui code pour la RdRp (Stuart et al. 1992).



Figure 22 : Organisation du génome du LRV1-1 (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 2011)

L'ORF 1 correspond à une protéine prédictionnelle de 71 aa ne présentant aucune similarité avec les protéines connues. Elle ne semble pas non plus avoir d'homologie avec la protéine toxique codée par le ScV. Aucun décalage du cadre de lecture, pouvant supposer une protéine de fusion avec l'ORF2, n'a été décelé (Stuart et al. 1992). Cette région, particulièrement conservée, semble plutôt contenir des structures secondaires qui pourraient être impliquées dans la régulation et l'initiation de la traduction de l'ORF 2. En effet, l'ORF 1 constituerait un site de fixation des ribosomes, un Internal Ribosome Entry Site (IRES), pour la traduction des protéines virales qui sont coiffe-indépendante. L'ORF 1 aurait également un rôle dans la stabilisation des ARN viraux (Guilbride et al., 1992; Stuart et al., 1992; Maga et al., 1995).

L'ORF2 code pour une protéine de capsid de 80 kDa (Zamora et al. 1995).

L'ORF3, de par son chevauchement avec l'ORF2, produit une protéine de fusion de type gag-pol de 180 kDa (Zamora et al. 1995). Cette séquence chevauchante, qui implique 71 nt, contient des structures secondaires en tige-boucle et des pseudo-nœuds responsables du décalage du cadre de lecture ribosomique en +1 (Stuart et al. 1992; Scheffter et al. 1994).

De grandes structures en tige/boucle sont également présentes en 3' ter du génome du LRV (Stuart et al. 1992). Ces structures, similaires à celles retrouvées en 3' ter du génome du ScV, pourraient être impliquées dans le processus d'encapsidation de l'ARN sb (+). En effet, la protéine de fusion gag-pol du virus ScV possède un domaine de liaison à de l'ARN sb en C terminal, le Virus Binding Site (VBS). La fixation de l'ARN sb (+) viral à ce domaine déclenche ensuite l'assemblage des particules virales au niveau du domaine N terminal de cette même protéine de fusion. Cela conduit à l'encapsidation à la fois de l'ARN sb (+) et de la polymérase – fusionnée à une protéine de capsid – et par

conséquent à la réplication du génome viral dans la particule virale (Fujimura et al. 1990).

Le LRV1-4 a également été décrit dans la littérature. Il a la particularité de posséder un ORF supplémentaire en 5', nommé ORFx, en plus de la présence des 3 ORF habituellement décrits (Patterson 1993). L'ORFx code pour une protéine prédictive de 60 aa, qui n'a pas été isolée à ce jour. Cet ORFx ne semble pas modifier la pathologie dans le modèle murin (Patterson 1993). Son rôle n'a pas été déterminé à ce jour.

### 3.2.2. Le LRV2

Les LRV2 sont des virus retrouvés dans les *Leishmania* de l'Ancien Monde. L'étude de leur génome, menée chez l'espèce *L. major*, affiche des différences avec celui des LRV1 (Figure 23).

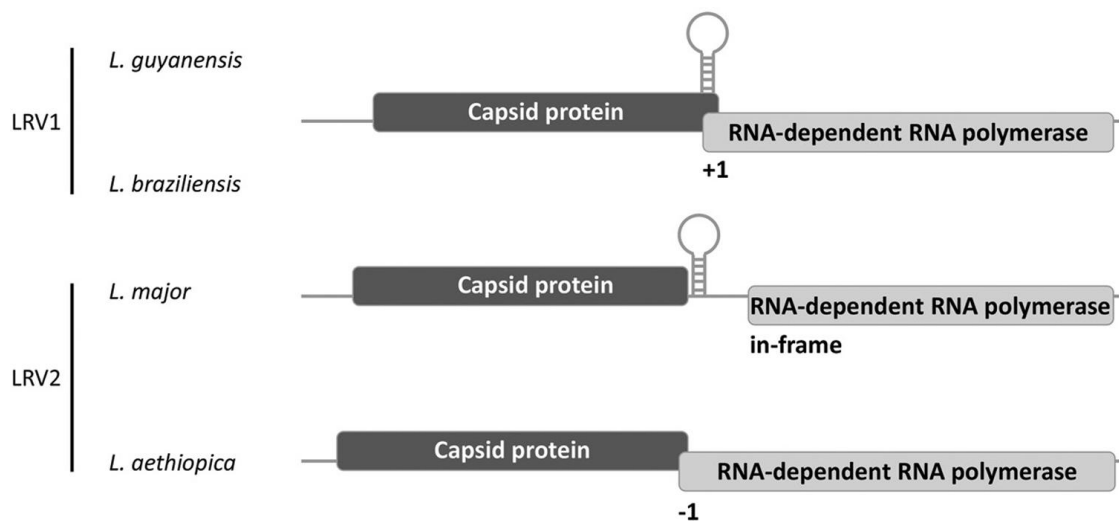


Figure 23 : Schéma des génomes de LRV1 et 2 (Grybchuk et al. 2018b).

En effet, le génome des LRV2 possède un 5' UTR plus petit de 144 nt comparativement à celui du virus LRV1. Malgré cette différence de taille, on observe tout de même la présence potentielle de structures secondaires dans cette région. Le 3' ter du LRV2 a une taille similaire à celle du LRV1-4, à savoir 44 et 53 nt respectivement (Scheffter et al. 1995).

L'ORF1 du LRV2 pourrait coder pour une protéine prédite de 4,4 kDa, qui ne possède aucune homologie avec d'autres protéines connues (Scheffter et al. 1995).

L'ORF2 code pour une protéine de capsid de 78 kDa qui possède 36% d'identité et 55% de similarité avec celle du LRV1-4 (Scheffter et al. 1995).

L'ORF 3 code pour une protéine RdRp de 102 kDa. Cette protéine possède 43% d'identité et 60% de similarité avec celle du LRV1-4 (Scheffter et al. 1995).

Les ORF 2 et 3 du LRV2 de *L. major* ne se chevauchent pas. En revanche, on observe la présence d'un codon stop entre les deux gènes viraux. Le codon stop est également suivi de structures en pseudo-nœuds, qui ne semblent pas être associées à une séquence de glissement de la traduction (Scheffter et al. 1995). Ainsi, un autre processus de fusion des protéines que celui des LRV1 pourrait avoir lieu (Scheffter et al. 1995).

En ce qui concerne le génome du LRV2 de *L. aethiopica*, on observe le chevauchement sur 46 nt des ORF 2 et 3, avec un décalage du cadre de lecture ribosomique en -1 (Figure 23) (Zangger et al. 2014).

### 3.3. Reproduction

Le LRV, étant très proche du virus ScV (Weeks et al., 1992b), son cycle de reproduction est calqué sur celui-ci.

Pour pouvoir accomplir leur cycle de reproduction, ces virus à ARN db possèdent une RdRp attachée à la cavité interne de la capsid, correspondant à la protéine de fusion gag-pol (ORF2-ORF3). La RdRp présente une double activité, à savoir une activité réplécase et une activité transcriptase qui se déroulent dans la capsid virale. L'activité réplécase consiste à synthétiser le brin (-) complémentaire au brin matrice viral (+), afin d'obtenir un ARN db (Widmer et al., 1990; Widmer & Patterson, 1991; Weeks et al., 1992a; Castón et al., 1997) qui servira à son tour de support à la synthèse du brin (+). L'activité transcriptase permet la synthèse du brin (+) du virus dans la capsid, à partir de l'ARN db viral. Ce brin (+), qui correspond à l'ARN messenger viral, est synthétisé abondamment et est externalisé via des pores présents dans la capsid virale (Figure 24). Une fois dans le cytoplasme, l'ARNm viral est traduit par la machinerie cellulaire de l'hôte ou encapsidé à l'aide des protéines néo-synthétisées du virus (Widmer et al., 1990; Widmer & Patterson, 1991; Weeks et al., 1992a; Castón et al., 1997). Les pores de la capsid virale permettent également l'afflux de métabolites dans la particule, tels que les nucléotides, tout en excluant les enzymes de dégradation de l'hôte (Castón et al. 1997).

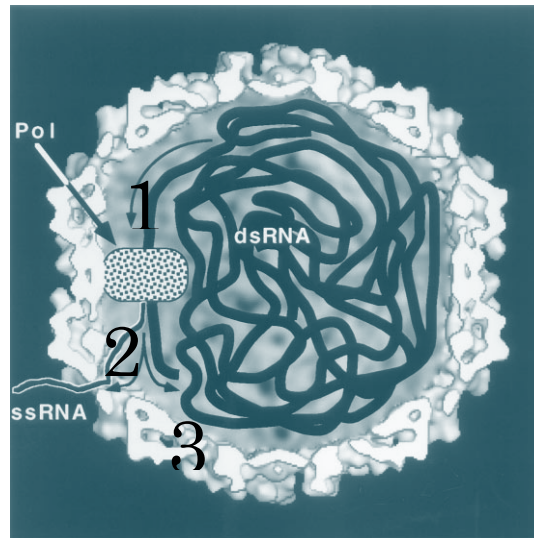


Figure 24 : Modèle hypothétique de l'activité transcriptionnelle du virion L-A. La polymérase (Pol) est fixée de manière covalente à la sous-unité de la capside, gag. (1) L'ARN sb viral est répliqué par la polymérase. (2) Le brin néo-synthétisé est extrudé de la capside, tandis que (3) le brin matriciel reste conservé dans la capside pour être répliqué à nouveau. Modifié à partir de (Castón et al. 1997)

En culture cellulaire, la phase au cours de laquelle le nombre de virus est le plus abondant est la phase stationnaire. Cela se justifie par l'importante multiplication des parasites en phase exponentielle, conduisant à une forte quantité de virus en phase stationnaire (132 transcrits/cellule) (Weeks et al., 1992b; Chung et al., 1998).

### 3.4. Régulation du cycle viral

La présence persistante des LRV dans les *Leishmania* supposerait un mécanisme de régulation pour le maintien d'un nombre optimal de virions par cellule, afin de concilier le cycle du virus avec les fonctions cellulaires de l'hôte parasite (Wickner, 1989; Weeks et al., 1992b).

Parmi ces mécanismes, on compte la régulation des protéines de fusion (gag-pol) grâce à la faible fréquence de formation des pseudo-nœuds, qui permet de maintenir une production pondérée des protéines de fusion comparativement aux protéines de capside (Stuart et al. 1992; Patterson 1993; Lee et al. 1996).

La protéase cystéine-like trypsine (CyPs) des *Leishmania* clive la protéine de fusion virale au niveau du domaine de jonction gag-pol, ce qui prévient sa dimérisation. Or, la dimérisation de cette protéine de fusion lui permet de se lier au génome viral et de l'encapsider. Ce mécanisme a pour conséquence de réguler le nombre de particules virales, afin de maintenir un niveau de virus compatible avec la survie de l'hôte parasite (Ro et al. 1997b; Carrion et al. 2003).

La présence d'un site de clivage dans la région 5'-UTR du LRV1-4 serait également impliquée dans la régulation du cycle viral. Le clivage serait réalisé par une

endonucléase virale présente dans les capsides virales complètes, conduisant à la formation d'un transcrit de 320 nt (MacBeth & Patterson, 1995). Cette coupure pourrait permettre de rendre un domaine cryptique du génome viral accessible aux facteurs de l'hôte et ainsi permettre une meilleure traduction des transcrits clivés comparativement aux transcrits complets (Saiz et al. 1999). De ce fait, une faible activité de cette enzyme permettrait de maintenir une infection persistante dans les cellules de *Leishmania* tout en contrôlant le nombre de copies de génome viral (Ro et al. 2004). Quatre structures en tige-boucle semblent être situées en amont du site spécifique de clivage. La tige boucle 4 pourrait être un déterminant essentiel pour ce clivage (Figure 25) (Ro & Patterson, 2000).

L'absence de coiffe dans le génome du LRV permettrait de limiter la synthèse intensive du virus. En effet, l'ajout d'une coiffe *in vitro* au génome viral multiplie par 20 son taux d'expression, ce qui pourrait déséquilibrer l'harmonie établie entre le virus et son hôte parasite (Maga et al. 1995).

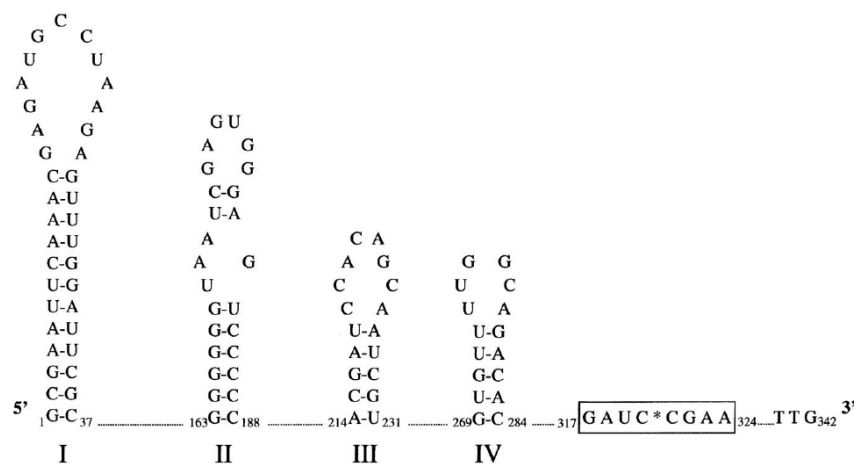


Figure 25 : Structure en tige-boucle prédite en 5'UTR des transcrits de LRV1-4. L'Astéris indiquée au niveau de la séquence encadrée correspond au site de clivage du génome viral (Ro & Patterson, 2000)

La voie de l'ARNi, un mécanisme visant généralement à éliminer les virus, a été mise en évidence dans les parasites du sous-genre *Viannia*, tels que *L. guyanensis*, *L. braziliensis* et *L. panamensis*. Ces espèces renferment le gène argonaute-1 (AGO1), impliqué dans le silencing de la voie ARNi, et le gène DCL1 codant pour l'enzyme Dicer, qui a pour rôle de cliver les fragments d'ARN db (Peacock et al. 2007; Lye et al. 2010; Atayde et al. 2013; Brettmann et al. 2016). La présence à la fois d'une voie ARNi et la persistance d'un virus au sein d'un même hôte est généralement en opposition. Par exemple, l'introduction d'une voie ARNi chez les levures *S. cerevisiae* abritant le virus ScV conduit à la perte de celui-ci (Wickner 1989). Cependant, chez les *Leishmania*, cette voie ne semble pas conduire à l'élimination des LRV, ce qui suggère que la rétention du virus est maintenue par un équilibre entre l'activité de la voie ARNi et la réplication du LRV1. Il est



également possible que la séquestration du génome d'ARN db des LRV dans la capsidie permette d'esquiver la voie ARNi, notamment l'enzyme Dicer (Brettmann et al., 2016; Patterson, 2017). En revanche, la voie ARNi n'a pas été mise en évidence dans les *Leishmania* de l'Ancien Monde, telles que *L. major*, *L. donovani*, *L. tarentolae* et *L. mexicana*. Cette voie semble avoir été perdue chez ces derniers qui semblent ne contenir que des restes de pseudogènes hautement dégénérés du gène AGO1, ou avoir subi des délétions de gènes (Lye et al. 2010).

### 3.5. La réponse immunitaire face aux LRV

La première étude évoquant l'impact du LRV chez le modèle murin remonte à 1988. Il s'agit d'une étude décrivant un cas d'infection à *L. guyanensis* (LRV1 LgyCUMC1-1A) d'un visiteur au Suriname, présentant des lésions satellites et une atteinte ganglionnaire. Ce patient avait guéri suite à l'administration de stibogluconate de sodium (Pentostam®). En revanche, l'injection de cette souche parasitaire à un hamster a conduit au développement d'une forme muco-cutanée (Tarr et al. 1988).

C'est en 2011 qu'une autre équipe relance la question du rôle du LRV dans le développement des métastases dans le modèle murin (Ives et al. 2011). Leurs travaux visaient à comprendre la modulation de la réponse immunitaire en présence de souches métastatiques versus non métastatiques. Ces souches de *L. guyanensis* (LRV1-LgyM5313) étaient issues d'un patient présentant une LCM. Les clones métastatiques induisaient une forte production *in vitro* de cytokines et chimiokines dans les macrophages comparativement aux clones non métastatiques (issus de LC dues à *L. guyanensis* ou à *L. major*). En effet, la comparaison de l'expression génique sur puce à ADN de macrophages infectés par des parasites métastatiques et de macrophages infectés par des parasites non métastatiques, montrait une modification de l'expression de 294 gènes annotés. Parmi ces gènes, on retrouvait ceux codant pour des chimiokines (C-X-C motif chemokine Ligand 10 (CXCL10) et CCL5) et des cytokines (IL-6 et TNF- $\alpha$ ), qui sont fortement exprimées en présence de souches métastatiques (Ives et al. 2011; Ronet et al. 2011). Ils ont également observé une forte expression d'INF- $\beta$  dépendante des TLR3 dans les souches métastatiques, ce qui impliquait la présence d'ARN double brin dans ces souches de *Leishmania* et par conséquent de LRV (Ives et al. 2011). Dans le modèle murin, la présence du virus entraînait une subversion de la réponse immune conduisant à une augmentation de la charge parasitaire au niveau de la lésion, un œdème et la métastase des parasites. Ces travaux montraient que le LRV jouait un rôle d'immunogène induisant une amplification de la réponse immunitaire chez la souris et, par conséquent, l'aggravation des lésions. Cependant, une quantité seuil de virus était requise pour induire cette réponse. Ainsi, les souches de *Leishmania* dépourvues de LRV ou possédant de très faibles quantités du virus n'induisaient pas cet accroissement de la réponse immunitaire (Ives et al. 2011).

Le déclenchement de cette réponse serait initié suite à la pénétration des *Leishmania* dans l'organisme hôte. Une fois dans la vacuole parasitophore des macrophages, les promastigotes lysés libèrent les virus dans ces vacuoles. Les LRV, également lysés,

libèrent leurs génomes ARN db reconnus par les TLR3 endosomaux, présents dans les vacuoles parasitophores des macrophages, ce qui provoque leur activation (Ronet et al. 2011). L'activation des TLR3 via le TRIF déclenche une cascade d'activation en commençant par la synthèse de NFκ-B qui conduit à la synthèse d'INF-β. Une fois fixé à son récepteur, l'INF-β entraîne la transcription de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, tels que les gènes codant pour le CCL5, le CXCL10, l'IL-6, le TNF-α et le NO (Ives et al. 2011; Ronet et al. 2011). Les cytokines et chimiokines produites conduisent à l'attraction des cellules dendritiques et des cellules T (Ronet et al. 2011), ainsi qu'à la mise en place d'une réponse immunitaire de type Th1, engendrant une inflammation chronique et des métastases. Cette réponse, qui promeut également la persistance du LRV dans l'hôte (Hartley et al. 2012, 2014), serait susceptible de favoriser sa transmission et celle du parasite (Márquez & Roossinck, 2012).

La production d'INF-β (suite à l'activation des TLR3 par les LRV) active également la machinerie d'autophagie dans les macrophages, ce qui entraîne la dégradation du NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3). Or, le NLRP3 a pour vocation de restreindre la multiplication des *Leishmania* dans les macrophages. Cette dégradation du NLRP3 limite l'activation de l'inflammasome NLRP3 favorisant ainsi la survie des parasites dans les macrophages, leur dissémination et le développement de la forme muco-cutanée (de Carvalho et al. 2019; Olivier & Zamboni 2020).

Dans le modèle murin infecté par *L. guyanensis*, la présence du virus induit la sécrétion d'IL-17A. Cette sécrétion pourrait être dépendante du TLR-3, mais semble surtout passer par les microRNA-155<sup>38</sup> (miR-155). La production d'IL-17A s'accompagne d'une diminution d'INF-γ, ce qui contribuerait à la virulence du parasite, à la sévérité de la maladie caractérisée par la dissémination du parasite et la chronicité des lésions. La diminution d'INF-γ pourrait être le résultat de l'action des LT reg (Hartley et al. 2016).

Les mi-R155 sont indispensables au développement et la maintenance des LTh17. L'expression amplifiée de ces microARN passerait par l'activation des TLR3/ TRIF et favoriserait la survie des macrophages et par conséquent des parasites y résidant. Cela se manifeste par une augmentation de la charge parasitaire et un gonflement des pattes des souris (Hartley et al. 2016; Eren et al. 2016).

Comme indiqué plus haut (cf. 1.5.2.1.3), la LCM est une forme tégumentaire sévère de la leishmaniose qui résulte d'une réponse immunitaire majoritairement orientée vers le type Th1. D'autre part, la prise de médicaments tels que les antimoniés de meglumine, l'amphotéricine B ou la miltéfosine induisent également une réponse de type Th1, ce qui entraîne une sur-régulation de cette voie. Bien que cette réponse permette la stimulation des macrophages afin d'éliminer les parasites (Saha et al. 2011), la sur-régulation de la voie Th1 peut également conduire à une réponse immune incontrôlée et excessive (Hartley et al. 2013). De plus, la présence du LRV oriente également la réponse immunitaire vers la voie Th1, pouvant aggraver la maladie, comme cela est le cas chez le modèle murin.

---

<sup>38</sup> microARN qui pourraient être impliqués dans l'inhibition de la croissance maligne, des infections virales et dans l'amélioration de la progression des maladies cardiovasculaires.

Le LRV2 semble également induire une réponse de type Th1. La présence d'une forte charge de LRV2 dans les souches de *L. aethiopica* était corrélée à une forte expression *in vitro* d'IL-6 et TNF- $\alpha$  dépendant du TLR3, dans des macrophages de moelle osseuse de souris. En revanche, les souches de *L. aethiopica* dépourvues de LRV2 ou renfermant une faible quantité de LRV2 induisaient une faible expression de ces cytokines. Cela suggère que la production d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  via le TLR3 nécessite une quantité seuil de LRV. Ces résultats rejoignent ceux décrits par Ives et al. (2011). Toutefois, le taux de cytokines produit par les macrophages infectés par *L. aethiopica* LRV2 était plus faible que celui produit par les macrophages infectés par *L. guyanensis* LRV1. Cela peut être dû à une plus faible quantité de LRV chez l'espèce *L. aethiopica* et une plus forte résistance de ces parasites dans les macrophages. Cela conduirait à une libération plus faible de LRV et donc à l'activation d'un nombre plus faible de TLR3. L'absence de signes cliniques dans le modèle murin infecté par *L. aethiopica* ne permet pas de déterminer l'impact du LRV dans la pathologie et dans le niveau de production des cytokines (Zangger et al. 2014).

Ainsi, le LRV pourrait potentiellement présenter un effet immuno-modulateur chez l'homme. La détermination du rôle de ce virus dans la pathologie humaine est donc essentielle, d'autant plus que d'autres virus de parasites, dont certains de la famille des Totiviridae, ont une influence dans la pathogenèse (annexe 3). Si le LRV constitue effectivement un immunogène chez l'hôte humain, il pourrait constituer un marqueur de pronostic dans l'évolution de la maladie, ainsi qu'une cible thérapeutique dans le traitement des patients.

## OBJECTIFS DE LA THESE

---

Une particularité de la leishmaniose réside dans la complexité de cette maladie qui se manifeste par une grande diversité à tous les niveaux : diversité des réservoirs, des vecteurs, des habitats de ces vecteurs et réservoirs, des espèces de *Leishmania*, des cycles de transmission du parasite, des manifestations cliniques et de la réponse thérapeutique. On note également une diversité des stratégies mises en place par le parasite pour déjouer les processus de défense immunitaire de l'hôte, tels que la subversion des macrophages ou de l'action du complément grâce à la présence de protéines de surface, telle que la GP63. Les multiples combinaisons possibles entre ces différents paramètres conduisent à une diversité remarquable des mécanismes impliqués dans la relation entre les *Leishmania* et leurs hôtes. Tous ces aspects font de la leishmaniose un modèle de choix dans l'étude des interactions hôtes-parasites.

En Guyane Française, les cas de leishmaniose rencontrés sont majoritairement dus au sous-genre *Viannia*, comprenant les espèces *L. guyanensis* et *L. braziliensis*. Ces deux espèces peuvent être responsables de 3 formes cliniques différentes : la LCL, la LCM et la LD, avec une fréquence élevée de LCM pour *L. braziliensis* et une prédominance de la LCL pour *L. guyanensis*. Les mécanismes par lesquels ces espèces vont induire une LCL, une LD ou une LCM ne sont pas clairement définis. Leur caractérisation permettrait de mieux comprendre et prévoir l'évolution de l'infection, et de fait, assurer une meilleure prise en charge des patients.

Comme indiqué au chapitre 2, différents facteurs sont impliqués dans l'évolution de la leishmaniose, tels que les facteurs de nature génétique, dont certains sont liés à l'hôte humain et plus particulièrement à la réponse immunitaire. En effet, des mutations au sein des gènes impliqués dans la réponse immunitaire de l'hôte peuvent affecter le niveau de synthèse de ces gènes et conduire à une résistance ou à une sensibilité à la maladie. Par exemple, la synthèse de cytokines telles que l'INF- $\gamma$  confère une protection contre les infections, dont celles dues à *L. guyanensis* (Bourreau et al. 2003). Cependant, la présence de mutation au niveau de ce gène influence la progression de la maladie vers des LC chroniques dues à *L. major* (Kamalisarvestani et al. 2006). D'autres sont liés aux parasites, telle que l'espèce impliquée, le niveau d'aneuploïdie (Samarasinghe et al. 2018) ou l'expression de facteurs de virulence comme les protéines GP63, LPG et A2 (Bifeld & Clos, 2015). Quant aux facteurs non génétiques, ils regroupent les paramètres environnementaux, le statut socio-économique, le comportement de l'hôte, le traitement thérapeutique administré...

Parmi tous ces facteurs, nous avons porté une attention toute particulière à la présence d'un virus au sein des *Leishmania*, le *Leishmaniavirus*. Ce virus semble constituer un immunogène puissant conduisant à l'intensification de la réponse immunitaire et par conséquent à une exacerbation de la maladie dans le modèle murin (Ives et al. 2011). De ce fait, il apparaît essentiel d'étudier l'influence du LRV sur la relation hôte-parasite, notamment sur l'évolution clinique de cette maladie chez l'homme.

C'est dans cette optique que ce travail de thèse a été mené, en se déclinant en 3 axes qui ont permis, dans un premier temps, de faire un état des lieux de la proportion des *Leishmania* infectées en Guyane, puis d'étudier la diversité génétique de ce virus et son impact dans la clinique des patients.

- L'axe 1 a pour objectif, d'une part, d'estimer la prévalence des LRV dans les parasites de *Leishmania* isolés de patients diagnostiqués en Guyane Française, afin d'apprécier l'abondance et la répartition de ce virus sur le territoire guyanais. D'autre part, le but est de développer des outils moléculaires permettant d'évaluer la diversité génétique de ces virus en Guyane Française, afin de définir par la suite si certains clusters génétiques de LRV ont une influence sur la clinique des patients (cf. axe 3).
- L'axe 2 porte sur la détermination de l'influence du LRV sur la sensibilité des parasites aux médicaments. Pour cela, une première étape a consisté à évaluer, pour la première fois, le niveau de sensibilité des *Leishmania* en Guyane Française à un panel de médicaments. La seconde étape a été de déterminer si la présence du virus affecte l'action des médicaments sur les parasites.
- L'axe 3 vise à déterminer l'influence du LRV dans la leishmaniose chez l'homme. Pour cela, les données cliniques des patients ont été collectées afin de déterminer si la présence du LRV et ses différents génotypes ont une influence sur la pathologie.

# AXE 1 :

## PREVALENCE ET PHYLOGENIE DU LRV EN GUYANE FRANÇAISE

---

La présence du LRV, mise en évidence notamment dans des isolats de *L. guyanensis* de Guyane Française qui est l'espèce majoritaire à 86% sur ce territoire (Simon et al. 2017)<sup>39</sup>, semble influencer la réponse immunitaire de l'hôte murin, conduisant à la formation de métastases, de lésions plus larges avec un nombre de parasites plus important dans ces lésions (Ives et al. 2011). De ce fait, un intérêt est porté à ce virus dans la mesure où il pourrait également entraîner des répercussions dans la pathologie humaine.

Ainsi, la première étape de ce travail de thèse a été de déterminer la prévalence de ce virus dans les isolats de *Leishmania* circulant en Guyane, ce qui fait référence à la publication n°1.

### **Publication n°1 : Prévalence et distribution du LRV en Guyane Française**

**Prevalence and Distribution of *Leishmania* RNA Virus 1 in *Leishmania* Parasites from French Guiana.** Ginouvès M, Simon S, Bourreau E, Lacoste V, Ronet C, Couppié P, Nacher M, Demar M, Prévot G. Am J Trop Med Hyg. 2016 Jan;94(1):102-6. doi: 10.4269/ajtmh.15-0419. Epub 2015 Nov 23.

La prévalence des LRV a été déterminée à partir de 129 isolats de *Leishmania* issus de patients pris en charge au Centre Hospitalier de Cayenne (CHC) ou dans l'un des centres de santé (CDS) de Guyane, entre 2012 et 2014. La détection des LRV a été effectuée par RT-PCR à partir des ARN totaux extraits des promastigotes cultivés *in vitro*.

La présence du LRV a été mise en évidence dans 74% (96/129) des isolats de *Leishmania* spp.. Parmi les 112 isolats de *L. guyanensis*, 90 étaient LRV (+), soit 80% (90/112) des isolats. Six sur onze (6/11) isolats de *L. braziliensis* abritaient le LRV, soit 55%. En revanche, aucun LRV n'a été détecté dans les 6 isolats de *L. amazonensis*.

En ce qui concerne la répartition géographique des LRV, leur présence était plus marquée dans l'intérieur des terres, ce qui pourrait être expliqué par la proximité avec l'écosystème amazonien, zone d'une extrême biodiversité, probablement propice au maintien et à la propagation des micro-organismes dont les *Leishmania* porteuses du LRV.

---

<sup>39</sup> Co-auteur de cette publication.

## Prevalence and Distribution of *Leishmania* RNA Virus 1 in *Leishmania* Parasites from French Guiana

Marine Ginouvès,\* Stéphane Simon, Eliane Bourreau, Vincent Lacoste, Catherine Ronet, Pierre Couppié, Mathieu Nacher, Magalie Demar, and Ghislaine Prévot

Ecosystèmes Amazoniens et Pathologie Tropicale–EA 3593–Labex CEBA–Medicine Department, University of French Guiana, Cayenne, French Guiana; Laboratoire Associé–Centre National de Référence *Leishmania*, Laboratory of Parasitology and Mycology, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana; Immunology Laboratory of Leishmaniasis, Pasteur Institute of French Guiana, Cayenne, French Guiana; Laboratory of Virus-Host Interactions, Pasteur Institute of French Guiana, Cayenne, French Guiana; Department of Biochemistry, University of Lausanne, Epalinges, Switzerland; Guianan Institute of Tropical Dermatology, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana; Centre d'Investigation Clinique Epidémiologie Clinique Antilles Guyane, Cayenne General Hospital, Cayenne, French Guiana; Laboratory of Parasitology and Mycology, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana

**Abstract.** In South America, the presence of the *Leishmania* RNA virus type 1 (LRV1) was described in *Leishmania guyanensis* and *Leishmania braziliensis* strains. The aim of this study was to determine the prevalence distribution of LRV1 in *Leishmania* isolates in French Guiana given that, in this French overseas department, most *Leishmania* infections are due to these parasite species. The presence of the virus was observed in 74% of *Leishmania* sp. isolates, with a highest presence in the internal areas of the country.

### INTRODUCTION

Virus-like particles (VLPs) discovery began in the 1960s with the first report in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*.<sup>1</sup> Since then similar structures have been identified in an ever-expanding list of unicellular eukaryotes: *Leishmania*,<sup>2</sup> *Plasmodium*,<sup>3</sup> *Naegleria*,<sup>3</sup> *Giardia*,<sup>4</sup> *Trichomonas*,<sup>5</sup> as well as in other parasite species and fungi.<sup>6</sup> The first discovery of VLPs in *Leishmania* was reported by Molyneux<sup>2</sup> in *Leishmania hertigi*, a nonhuman parasite species. The presence of VLPs in another *Leishmania* species was then highlighted by Tarr and others,<sup>7</sup> namely the *Leishmania (braziliensis) guyanensis* species. *Leishmania* RNA virus (LRV) is an icosahedral encapsidated double-stranded 5.3-kb RNA virus, belonging to the *Totiviridae* family. This virus has been observed in the New World *Leishmania* species: *L. (Viannia) guyanensis* and *L. (Viannia) braziliensis*, in one strain of the Old World parasite *Leishmania major*, and in *Leishmania aethiopica*.<sup>8,9</sup> New World strains are grouped into the LRV1 type, which is divided in 14 subtypes (LRV1-1 to LRV1-14) that spread over South America.<sup>7,10,11</sup> Old World strains belong to the LRV2 type.<sup>9</sup>

The LRV complementary DNA (cDNA) was first completely sequenced by Stuart and others<sup>12</sup> for the prototype virus termed LRV1-1. Then, complete cDNA sequences were reported by Scheffter and others<sup>13,14</sup> for the LRV1-4 and LRV2-1 isolates. The LRV1-1 and LRV1-4 sequences share 77% nucleotide identity between themselves.<sup>14</sup>

In French Guiana, *Leishmania* species predominantly diagnosed are *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, and occasionally *Leishmania amazonensis* (Simon and others, submitted data).<sup>15</sup> Leishmaniasis represents a significant risk for those in contact with the forest. Our study aimed to determine the prevalence of LRV1 in the circulating isolates of *Leishmania*

spp. in French Guiana and to establish its repartition on the territory.

### MATERIALS AND METHODS

**Parasites.** A total of 129 isolates of *Leishmania* spp. successfully cultured, from 424 patients infected in French Guiana between 2012 and 2014, were kindly supplied by the parasitology and mycology laboratory of the Cayenne General Hospital, with strict respect for patient anonymity. Promastigote parasites were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (Gibco, Paisley, Scotland, UK) containing L-glutamine, 20 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid, phenol red and supplemented with 20% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco), 50 IU/mL penicillin (Invitrogen), 0.05 mg/mL streptomycin (Invitrogen), and nonessential amino acids (Gibco).

*Leishmania* isolates identification was performed by polymerase chain reaction (PCR) restriction fragment length polymorphism as previously described.<sup>16</sup>

When parasites reached a stationary phase, counting was performed in a Malassez cell. Pellets containing  $1 \times 10^7$  parasites were constituted after culture by centrifugation for 5 minutes at 514 g and removal of the supernatant. The pellets were stored at  $-80^\circ\text{C}$  until RNA extraction.

**Total RNA extraction.** Total RNA was extracted using Trizol<sup>®</sup> (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's recommendations, with minor modifications. Pellets were thawed at room temperature (RT) and homogenized with 1 mL of Trizol. After 15–30 minutes of incubation at RT, 0.2 mL of chloroform per milliliter of Trizol was added, vortexed for 15 seconds, and incubated for 2–15 minutes at RT. Phase separation by centrifugation for 10 minutes at 12,000 g and  $4^\circ\text{C}$  allowed recovering the upper phase to which 0.5 mL of isopropanol was added. The mixture was then incubated for 10 minutes at RT and centrifuged for 10 minutes at 12,000 g at  $4^\circ\text{C}$ . The RNA pellet was then washed with 75% ethanol, dried, and dissolved in 10  $\mu\text{L}$  of diethylpyrocarbonate water. The RNA was stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

**Reverse transcription PCR.** cDNA was synthesized using the SuperScript<sup>™</sup> II Reverse Transcriptase (Invitrogen), according to the manufacturer's recommendations with random hexamers (Invitrogen). Then, PCR amplification of a 124-bp

\*Address correspondence to Marine Ginouvès, Ecosystèmes Amazoniens et Pathologie Tropicale–EA 3593–Labex CEBA–Medicine Department, University of French Guiana, Campus Saint Denis, Avenue d'Estrees, Cayenne 97300, French Guiana. E-mail: marine.ginouvès@univ-guyane.fr

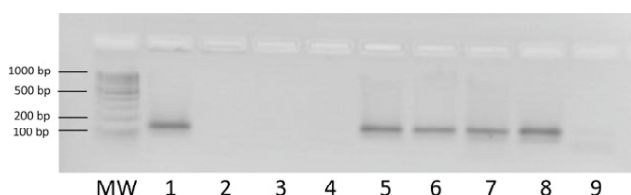


FIGURE 1. *Leishmania* RNA virus type 1 (LRV1) detection in different *Leishmania* isolates. MW (molecular weight marker 100 bp, Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO); 1, 5, and 6: LRV1 positive *Leishmania guyanensis* isolates; 2: LRV1 negative *L. guyanensis* isolate; 3 and 4: LRV1 negative *Leishmania amazonensis* isolates; 7: LRV1 positive *Leishmania braziliensis* isolate; 8: LRV1 positive control (reference strain of *L. guyanensis* MHOM/GF/97/LBC6); 9: LRV1 negative control (water).

LRV fragment located in the most conserved LRV1 region was done with the LRV1 forward primer, LRV1-F1: 5'-CTGACTGGACGGGGGTAAT-3' and LRV1 reverse primer, LRV1-R1: 5'-CAAAACACTCCCTTACGC-3' enabling to amplify all LRV1 subtypes that have been slightly modified from those of Ives and others.<sup>17</sup> These primers were based on LRV1-1 and LRV1-4 genome sequences (Genbank accession nos.: LRV1-1: NC002063 and LRV1-4: NC003601). A denaturation step at 94°C for 2 minutes was followed by 40 cycles at 94°C for 30 seconds, 54°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute. The PCR was completed by a final elongation at 72°C for 5 minutes. PCR products were analyzed on a 2% gel agarose to verify the presence of amplification products at the expected size. The reference strain of *L. guyanensis* (MHOM/GF/97/LBC6) and water were used as positive and negative controls, respectively, in each reverse transcriptase (RT) PCR experiment.

**Ethical aspects.** The study was retrospective. All patients were informed (during consultation, with posters) that data and analysis of results may be used in research and that they have a right to refuse.

**Statistical analysis.** Statistical significance between proportion of LRV from coastal communes and inland communes and proportion of LRV from coastal area (seaside) and the rest of the territory were determined by  $\chi^2$  test;  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

Search for LRV1 was performed on 129 *Leishmania* isolates including 112 isolates of *L. guyanensis*, 11 isolates of *L. braziliensis*, and six isolates of *L. amazonensis*. Its presence was detected in 96 of the 129 isolates (74%).

Figure 1 shows RT-PCR products obtained from a panel of different LRV1 positive or negative *Leishmania* species. Table 1 groups the results per site and *Leishmania* species. Eighty percent (90/112) of *L. guyanensis* isolates and 55% (6/11) of *L. braziliensis* isolates were LRV positive. Sequencing of the PCR fragment obtained from an *L. braziliensis* isolate confirmed the detection of LRV1-4. No LRV1 was detected from *L. amazonensis* isolates.

Figure 2 shows the distribution of *Leishmania* isolates carrying or not LRV across French Guiana. There were no significant differences between the proportion of LRV from coastal and inland communes ( $P = 0.22$ ), however, there was a significant difference between the seaside and the rest of the territory ( $P < 0.001$ ). Indeed, apart from Kourou, where the only available isolate was positive to LRV, isolates from Mana, Iracoubo, and Macouria were negative. Half isolates from Rémire were positive to LRV. In all inland communes, more than half of the isolates were LRV positive. In communes with the highest sampling effort, LRV presence was predominant: Regina with 82% (14/17) of positive isolates, Maripasoula 82% (14/17), Saül 100% (10/10), Cacao 75% (6/8), and Papaïchton 86% (6/7).

The presumed site of infection was unknown, or outside French Guiana ( $N = 2$ ), for 37 of 129 isolates. Among them,

TABLE 1  
*Leishmania* LRV positive or negative summary isolates

Species	<i>Leishmania guyanensis</i>		<i>Leishmania braziliensis</i>		<i>Leishmania amazonensis</i>		<i>Leishmania</i> spp.		POS (%)
	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	
Presumed site of infection									
Cacao	6	2	0	0	0	0	6	2	75
Camopi	3	1	0	0	0	0	3	1	75
Grand-Santi	3	0	1	0	0	3	4	3	57
Iracoubo	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Kourou	1	0	0	0	0	0	1	0	100
Macouria	0	4	0	0	0	0	0	4	0
Mana	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Maripasoula	12	2	2	1	0	0	14	3	82
Montsinery	1	0	0	0	0	0	1	0	100
Nouragues	1	0	0	0	0	0	1	0	100
Papaïchton	6	1	0	0	0	0	6	1	86
Régina	14	2	0	1	0	0	14	3	82
Rémire	1	1	0	0	0	0	1	1	50
Roura	4	0	0	0	0	0	4	0	100
Saint Elie	1	1	0	0	0	0	1	1	50
Saint Georges de l'Oyapock	2	1	0	0	0	0	2	1	67
Saint Laurent du Maroni	1	1	0	0	0	0	1	1	50
Saül	9	0	1	0	0	0	10	0	100
Unknown/outside	25	4	2	3	0	3	27	10	73
Total	90	22	6	5	0	6	96	33	
%	80		55		0		74		

LRV = *Leishmania* RNA virus; NEG = negative; POS = positive.



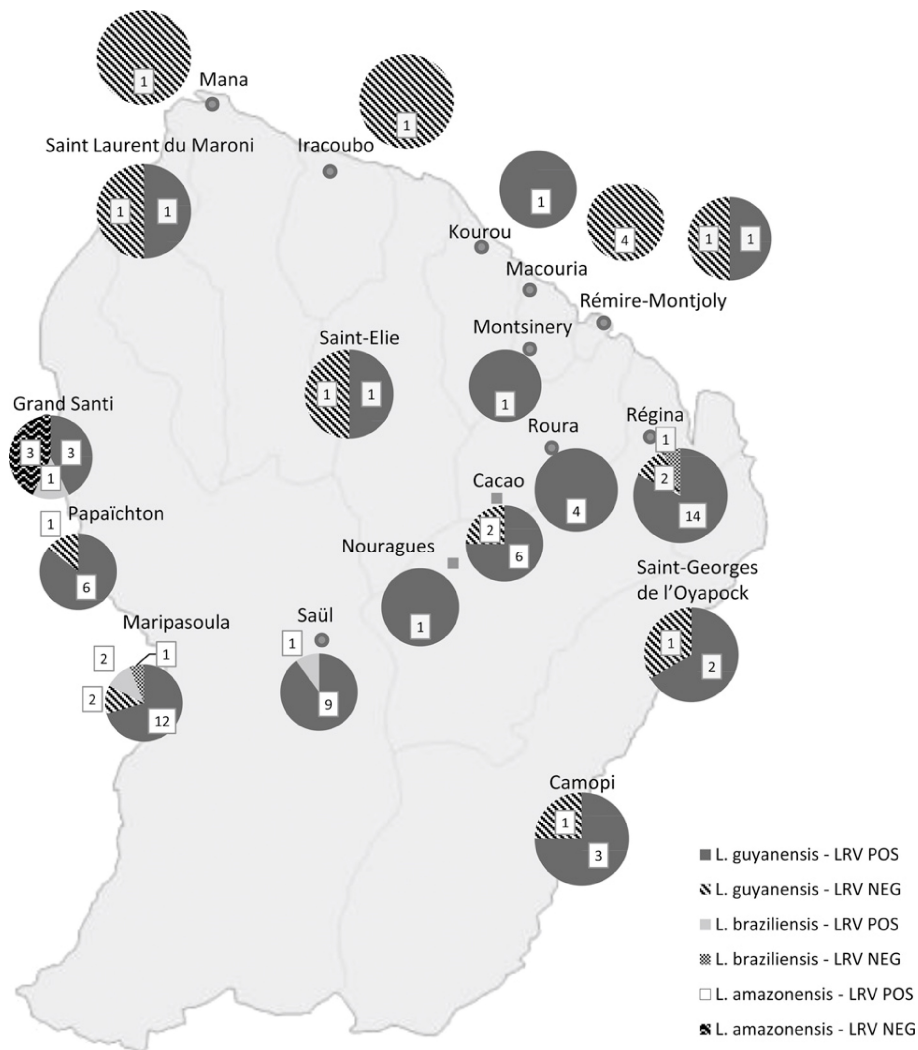


FIGURE 2. Distribution of *Leishmania* isolates carrying or not the *Leishmania* RNA virus (LRV), in French Guiana. Pie charts full correspond to positive LRV and pie charts with patterns correspond to negative LRV.

73% proved to be LRV positive. The two isolates, whose suspected infection sites were outside French Guiana, were contracted in Manaus and Suriname and were LRV-positive *L. guyanensis* isolates.

## DISCUSSION

*Leishmania* RNA viruses can infect different *Leishmania* species. Surveys of New World parasites have identified LRV1 only in isolates that originated from the Amazon basin, such as *L. guyanensis* and *L. braziliensis*.<sup>7,10,18–20</sup> The average molecular prevalence of LRV that we report here in *Leishmania* sp. isolates circulating in French Guiana is equivalent to the one described by Bourreau and others,<sup>21</sup> but substantially higher (74%) than those reported in other South American countries, which ranged from 5.8% in Colombia, 18% in Peru, and 25.5% in the Brazilian city of Caratinga, Minas Gerais.<sup>18–20</sup> This difference can first be explained by the geographical origin of the *Leishmania* isolates and, second, by the type of biological material used for LRV detection. Indeed, in Colombia, the virus was detected

from parasites originating from the Amazon area of the country whereas no virus was detected in other regions.<sup>18</sup> In Brazil, Pereira and others<sup>22</sup> reported two LRV1 positive isolates of 48 tested (4.1%). These two *L. guyanensis* positive isolates were from the Amazon region. In this study, we report the presence of LRV throughout the whole territory. This could be correlated to tropical climate conditions encountered in French Guiana. In contrast, the weaker presence of LRV along the coastal area was presumably due to the low density of vectors and reservoirs implying a low parasite transmission in this more urbanized area.<sup>23,24</sup> Ecologic and epidemiologic factors related to Amazon region might be involved in the repartition of *Leishmania* parasites susceptible to harbor the LRV.<sup>18</sup>

Concerning the type of biological material used for the search of LRV in all previous studies, this search was performed on human biopsies containing low amounts of the amastigote form of the parasite.<sup>18–20,22</sup> In our study, we used cultured parasites corresponding to the promastigote form ( $10^7$  cells) in which the quantity of LRV has been reported to be higher due to virus multiplication in culture<sup>25</sup> (personal

communication). This could thus explain the large difference of prevalence observed between our results and those previously published.<sup>18–20,22</sup>

We here report the detection of LRV1 from different *L. guyanensis* and *L. braziliensis* isolates.<sup>7,10,18–20</sup> None of the six *L. amazonensis* isolates tested were positive for LRV1. With the exception of the *Leishmania panamensis* species for which no LRV1 has been identified,<sup>18</sup> no information is currently available for the other New World *Leishmania* species. Therefore, LRV1 has so far only been detected in parasite species of the *Leishmania Viannia* subgenus.

LRV infection of parasites seems to affect their virulence in a murine model of mucosal cutaneous leishmaniasis.<sup>17,26,27</sup> To determine if the clinical evolution of infected patients can be affected by the presence of the virus or can be correlated, at least in part, to the genetic variability of the virus for which at least 14 subtypes have been identified, we plan to, based on the present results, to characterize the genetic diversity of different LRV1 isolates at the genomic level. These results should enable us to gain insights into the role LRV1 plays in the evolution of leishmaniasis lesions and deepen the achievements of Bourreau and others<sup>21</sup> describing the impact of LRV on first-line treatment failure and symptomatic relapse.

Received June 5, 2015. Accepted for publication September 20, 2015.

Published online November 23, 2015.

Acknowledgments: Thank to trainees, Claudiane Flora and Yasmina Auguste, for their participation in this research work.

Financial support: This work was supported by the University of the French West Indies and French Guiana and the Ministère Français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique. It has benefited from an Investissement d'Avenir grant managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA, reference no. ANR-10-LABX-25-01).

Conflict of interest: Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

Authors' addresses: Marine Ginouvès and Stéphane Simon, Ecosystèmes Amazoniens et Pathologie Tropicale—EA 3593—Labex CEBA—Médecine Department, University of French Guiana, Cayenne, French Guiana, and Laboratoire Associé—Centre National de Référence Leishmania, Laboratory of Parasitology and Mycology, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana, E-mails: marine.ginouvès@univ-guyane.fr and stephane.simon@guyane.univ-ag.fr. Eliane Bourreau, Immunology Laboratory of Leishmaniasis, Pasteur Institute of French Guiana, Cayenne, French Guiana, E-mail: ebourreau@pasteur-cayenne.fr. Vincent Lacoste, Laboratory of Virus Hosts Interaction, Pasteur Institute of French Guiana, Cayenne, French Guiana, E-mail: vlacoste@pasteur-cayenne.fr. Catherine Ronet, Department of Biochemistry, University of Lausanne, Epalinges, Switzerland, E-mail: catherine.ronet@unil.ch. Pierre Couppié, Ecosystèmes Amazoniens et Pathologie Tropicale—EA 3593—Labex CEBA—Médecine Department, University of French Guiana, Cayenne, French Guiana, and Guianan Institute of Tropical Dermatology, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana, E-mail: pierre.couppie@ch-cayenne.fr. Mathieu Nacher, Ecosystèmes Amazoniens et Pathologie Tropicale—EA 3593—Labex CEBA—Médecine Department, University of French Guiana, Cayenne, French Guiana, and Centre d'Investigation Clinique Epidémiologie Clinique Antilles Guyane, Cayenne General Hospital, Cayenne, French Guiana, E-mail: mathieu.nacher@ch-cayenne.fr. Magalie Demar, Ecosystèmes Amazoniens et Pathologie Tropicale—EA 3593—Labex CEBA—Médecine Department, University of French Guiana, Cayenne, French Guiana, Laboratoire Associé—Centre National de Référence Leishmania, Laboratory of Parasitology and Mycology, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana, and Laboratory of Parasitology and Mycology, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana, E-mail: magalie.demar@ch-cayenne.fr. Ghislaine Prévot, Ecosystèmes Amazoniens et Pathologie Tropicale—EA 3593—Labex

CEBA—Médecine Department, University of French Guiana, Cayenne, French Guiana, E-mail: fac.prevot@gmail.com.

## REFERENCES

1. Miller JH, Schwartzwelter JC, 1960. Virus-like particles in an *Entamoeba histolytica* trophozoite. *J Parasitol* 46: 523–524.
2. Molyneux DH, 1974. Virus-like particles in *Leishmania* parasites. *Nature* 249: 588–589.
3. Diamond LS, Mattern CF, 1976. Protozoal viruses. *Adv Virus Res* 20: 87–112.
4. Wang AL, Wang CC, 1986. Discovery of a specific double-stranded RNA virus in *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 21: 269–276.
5. Wang AL, Wang CC, 1986. The double-stranded RNA in *Trichomonas vaginalis* may originate from virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7956–7960.
6. Tipper DJ, Bostian KA, 1984. Double-stranded ribonucleic acid killer systems in yeasts. *Microbiol Rev* 48: 125–156.
7. Tarr PI, Aline RF Jr, Smiley BL, Scholler J, Keithly J, Stuart K, 1988. LRV1: a candidate RNA virus of *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9572–9575.
8. Cadd TL, Keenan MC, Patterson JL, 1993. Detection of *Leishmania* RNA virus 1 proteins. *J Virol* 67: 5647–5650.
9. Zangger H, Hailu A, Desponds C, Lye LF, Akopyants NS, Dobson DE, Ronet C, Ghalib H, Beverley SM, Fasel N, 2014. *Leishmania aethiops* field isolates bearing an endosymbiotic dsRNA virus induce pro-inflammatory cytokine response. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2836.
10. Guilbride L, Myler PJ, Stuart K, 1992. Distribution and sequence divergence of LRV1 viruses among different *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol* 54: 101–104.
11. Widmer G, Dooley S, 1995. Phylogenetic analysis of *Leishmania* RNA virus and *Leishmania* suggests ancient virus-parasite association. *Nucleic Acids Res* 23: 2300–2304.
12. Stuart KD, Weeks R, Guilbride L, Myler PJ, 1992. Molecular organization of *Leishmania* RNA virus 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8596–8600.
13. Scheffter SM, Ro YT, Chung IK, Patterson JL, 1995. The complete sequence of *Leishmania* RNA virus LRV2-1, a virus of an old world parasite strain. *Virology* 212: 84–90.
14. Scheffter S, Widmer G, Patterson JL, 1994. Complete sequence of *Leishmania* RNA virus 1–4 and identification of conserved sequences. *Virology* 199: 479–483.
15. Rotureau B, Ravel C, Nacher M, Couppié P, Curtet I, Dedet JP, Carme B, 2006. Molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) guyanensis* in French Guiana. *J Clin Microbiol* 44: 468–473.
16. Simon S, Veron V, Carme B, 2010. *Leishmania* spp. identification by polymerase chain reaction—restriction fragment length polymorphism analysis and its applications in French Guiana. *Diagn Microbiol Infect Dis* 66: 175–180.
17. Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, Zangger H, Revaz-Bretton M, Lye L, Hickerson SM, Beverley SM, Acha-Orbea H, Launois P, Fasel N, Masina S, 2011. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science* 331: 775–778.
18. Salinas G, Zamora M, Stuart K, Saravia N, 1996. *Leishmania* RNA viruses in *Leishmania* of the *Viannia* subgenus. *Am J Trop Med Hyg* 54: 425–429.
19. Saiz M, Llanos-Cuentas A, Echevarria J, Roncal N, Cruz M, Muniz MT, Lucas C, Wirth DF, Scheffter S, Magill AJ, Patterson JL, 1998. Short report: detection of *Leishmania* virus in human biopsy samples of leishmaniasis from Peru. *Am J Trop Med Hyg* 58: 192–194.
20. Ogg MM, Carrion R Jr, Botelho AC, Mayrink W, Correa-Oliveira R, Patterson JL, 2003. Short report: quantification of *Leishmania* virus RNA in clinical samples and its possible role in pathogenesis. *Am J Trop Med Hyg* 69: 309–313.
21. Bourreau E, Ginouvès M, Prévot G, Hartley M, Gangneux J, Robert-Gangneux F, Dufour J, Marie DS, Bertolotti A, Pralong F, Martin R, Schütz F, Couppié P, Fasel N, Ronet C, 2015. *Leishmania* RNA virus presence in *L. guyanensis*

- parasites increases the risk of first-line treatment failure and symptomatic relapse. *J Infect Dis.* [epub ahead of print].
22. Pereira Lde O, Maretti-Mira AC, Rodrigues KM, Lima RB, Oliveira-Neto MP, Cupolillo E, Pirmez C, de Oliveira MP, 2013. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with *Leishmania* RNA virus 1 infection in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 665–667.
  23. Rotureau B, Gaborit P, Issaly J, Carinci R, Fouque F, Carme B, 2006. Diversity and ecology of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in coastal French Guiana. *Am J Trop Med Hyg* 75: 62–69.
  24. Fouque F, Gaborit P, Issaly J, Carinci R, Gantier JC, Ravel C, Dedet JP, 2007. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with changing patterns in the transmission of the human cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 35–40.
  25. Croft SL, Molyneux DH, 1979. Studies on the ultrastructure, virus-like particles and infectivity of *Leishmania hertigi*. *Ann Trop Med Parasitol* 73: 213–226.
  26. Ronet C, Beverley SM, Fasel N, 2011. Muco-cutaneous leishmaniasis in the new world: the ultimate subversion. *Virulence* 2: 547–552.
  27. Ives A, Masina S, Castiglioni P, Prevel F, Revaz-Breton M, Hartley MA, Launois P, Fasel N, Ronet C, 2014. MyD88 and TLR9 dependent immune responses mediate resistance to *Leishmania guyanensis* infections, irrespective of *Leishmania* RNA virus burden. *PLoS One* 9: e96766.

Les résultats présentés dans la publication n°1 indiquent une présence non négligeable du LRV en Guyane. Ces résultats inattendus affichent des prévalences bien supérieures à celles rapportées dans les autres régions d'Amazonie, et pourraient même être sous-estimées dans la mesure où seuls les isolats obtenus après culture *in vitro* ont pu être analysés. Néanmoins, à notre connaissance, cette étude de prévalence des LRV reste la première à inclure un nombre d'isolats aussi important.

L'étape suivante a consisté à développer des outils moléculaires afin de déterminer la diversité génétique des LRV en Guyane. Nous avons défini ces marqueurs en nous appuyant sur des séquences de génomes complets de LRV. Ainsi, la publication n°2 présente le séquençage de près d'une vingtaine de génomes viraux, ainsi que les outils moléculaires destinés au génotypage des LRV.

## **Publication n°2 : Phylogénie des LRV**

**Unraveling the genetic diversity and phylogeny of *Leishmania* RNA virus 1 strains of infected *Leishmania* isolates circulating in French Guiana.** Tirera S, Ginouves M, Donato D, Caballero IS, Bouchier C, Lavergne A, Bourreau E, Mosnier E, Vantilcke V, Couppié P, Prevot G, Lacoste V. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Jul 17;11(7): e0005764. doi: 10.1371/journal.pntd.0005764. eCollection 2017 Jul.

Le séquençage des génomes de LRV, isolés de promastigotes en culture, a été réalisé à partir de 19 isolats (18 *L. guyanensis* et 1 *L. braziliensis*) issus de patients ayant consulté une structure de santé en Guyane (CHC ou CDS) entre 2011 et 2014.

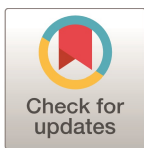
Les données de séquençage indiquent la présence de 24 génomes de LRV différents parmi les 19 isolats séquencés. Cette différence provient du fait que certains isolats de *Leishmania* sont porteurs de plusieurs génotypes viraux au sein d'une même cellule. En effet, 2 isolats de *L. guyanensis* abritent chacun 2 génotypes de LRV différents et un autre isolat de *L. guyanensis* abrite 3 génotypes de LRV différents. Ces infections multiples ne sont pas à l'origine d'une population mixte de parasites au sein d'un même isolat, mais de la présence de plusieurs génotypes de LRV au sein d'un même parasite. L'analyse phylogénique des virus montre que ces différents LRV présents dans un même parasite peuvent appartenir à des clusters de gènes différents. Les 24 séquences génomiques virales générées se répartissent en 6 groupes phylogéniques différents, classés de A à F. Les groupes A à E renferment des virus issus de l'espèce *L. guyanensis*, tandis que le groupe F, ceux de l'espèce *L. braziliensis*. La majorité des LRV sont confinés dans les groupes A et B.

Des marqueurs génétiques ont été définis, dont un couple d'amorces particulièrement sensible nommé LRV1s-LRV2as, qui cible à la fois l'ORF1 et l'ORF2 du LRV. Ces amorces conduisent à un taux de détection de 100% des virus. Elles pourront donc être utilisées dans l'étude phylogénétique des LRV (cf. axe 3).

RESEARCH ARTICLE

# Unraveling the genetic diversity and phylogeny of *Leishmania* RNA virus 1 strains of infected *Leishmania* isolates circulating in French Guiana

Sourakhata Tirera<sup>1</sup>, Marine Ginouves<sup>2,3</sup>, Damien Donato<sup>1</sup>, Ignacio S. Caballero<sup>1,4</sup>, Christiane Bouchier<sup>5</sup>, Anne Lavergne<sup>1</sup>, Eliane Bourreau<sup>6</sup>, Emilie Mosnier<sup>2,7,8</sup>, Vincent Vantilcke<sup>9</sup>, Pierre Couppié<sup>2,3,10</sup>, Ghislaine Prevot<sup>2‡</sup>, Vincent Lacoste<sup>1,11‡\*</sup>



**1** Laboratoire des Interactions Virus-Hôtes, Institut Pasteur de la Guyane, Cayenne, French Guiana, **2** Ecosystèmes Amazoniens et Pathologie Tropicale, EA 3593, Medicine Department, University of French Guiana, Cayenne, French Guiana, **3** National Reference Center for Leishmania, associated laboratory, Laboratory of Parasitology and Mycology, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana, **4** Bioinformatics Graduate Program, Boston University, Boston, MA, United States of America, **5** Plate-forme Génomique, Pôle Biomics, Institut Pasteur, Paris, France, **6** Laboratoire d'Immunologie des Leishmanioses, Institut Pasteur de la Guyane, Cayenne, French Guiana, **7** Unité des Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana, **8** Centres Délocalisés de Préventions et de Soins, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana, **9** Department of Medicine, Centre Hospitalier de l'Ouest Guyanais, Saint Laurent du Maroni, French Guiana, **10** Dermatology Unit, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana, **11** Department of Virology, Institut Pasteur, Paris, France

☯ These authors contributed equally to this work.  
 ‡ GP and VL also contributed equally to this work.  
 \* [vlacoste@pasteur-cayenne.fr](mailto:vlacoste@pasteur-cayenne.fr)

**OPEN ACCESS**

**Citation:** Tirera S, Ginouves M, Donato D, Caballero IS, Bouchier C, Lavergne A, et al. (2017) Unraveling the genetic diversity and phylogeny of *Leishmania* RNA virus 1 strains of infected *Leishmania* isolates circulating in French Guiana. *PLoS Negl Trop Dis* 11(7): e0005764. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005764>

**Editor:** Michel Tihayrenc, IRD, FRANCE

**Received:** April 21, 2017

**Accepted:** June 30, 2017

**Published:** July 17, 2017

**Copyright:** © 2017 Tirera et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** Sequences reported in this paper were deposited in the GenBank nucleotide database under accession numbers KY750607 to KY750630. The raw sequencing data are available in the Sequence Read Archive under accession number PRJNA371487 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/371487](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/371487)).

**Funding:** This study was funded by a European commission "REGPOT-CT-2011-285837-STRonGer" grant within the FP7 and an "Investissement d'Avenir" grant managed by the

## Abstract

### Introduction

*Leishmania* RNA virus type 1 (LRV1) is an endosymbiont of some *Leishmania* (*Vianna*) species in South America. Presence of LRV1 in parasites exacerbates disease severity in animal models and humans, related to a disproportioned innate immune response, and is correlated with drug treatment failures in humans. Although the virus was identified decades ago, its genomic diversity has been overlooked until now.

### Methodology/Principles findings

We subjected LRV1 strains from 19 *L. (V.) guyanensis* and one *L. (V.) braziliensis* isolates obtained from cutaneous leishmaniasis samples identified throughout French Guiana with next-generation sequencing and *de novo* sequence assembly. We generated and analyzed 24 unique LRV1 sequences over their full-length coding regions. Multiple alignment of these new sequences revealed variability (0.5%–23.5%) across the entire sequence except for highly conserved motifs within the 5' untranslated region. Phylogenetic analyses showed that viral genomes of *L. (V.) guyanensis* grouped into five distinct clusters. They further showed a species-dependent clustering between viral genomes of *L. (V.) guyanensis* and *L.*

Agence Nationale de la Recherche (CEBA, Ref. ANR-10-LABX-25-01). High-throughput sequencing was performed at the Genomics Platform, a member of the “France Génomique” consortium (ANR10-INBS-09-08). ISC was funded by a Calmette & Yersin grant from the Institut Pasteur International division. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors declare that they have no competing financial interests.

(*V.*) *braziliensis*, confirming a long-term co-evolutionary history. Noteworthy, we identified cases of multiple LRV1 infections in three of the 20 *Leishmania* isolates.

## Conclusions/Significance

Here, we present the first-ever estimate of LRV1 genomic diversity that exists in *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* parasites. Genetic characterization and phylogenetic analyses of these viruses has shed light on their evolutionary relationships. To our knowledge, this study is also the first to report cases of multiple LRV1 infections in some parasites. Finally, this work has made it possible to develop molecular tools for adequate identification and genotyping of LRV1 strains for diagnostic purposes. Given the suspected worsening role of LRV1 infection in the pathogenesis of human leishmaniasis, these data have a major impact from a clinical viewpoint and for the management of *Leishmania*-infected patients.

## Author summary

Leishmaniasis is a well-known parasitosis due to an infection by the protozoan *Leishmania* parasites firmly established in South America. In French Guiana, where leishmaniasis is a public health problem, having an annual incidence of 5.6 cases/10,000 inhabitants, 80% of *Leishmania* spp. parasites are infected by an endosymbiotic virus, *Leishmania* RNA virus 1 (LRV1). The purpose of this study was to gain insights on the genetic variability and evolution of LRV1 at the genomic level. We subjected 20 *Leishmania* isolates obtained from cutaneous lesions with next generation sequencing and *de novo* sequence assembly. This allowed generating 24 LRV1 full-length coding sequences presenting among themselves a significant genetic diversity. The inferred phylogenetic relationships enabled to identify distinct well-supported genotypes and support the hypothesis of co-evolution between LRV1 strains and their parasite hosts. In addition, we identified multiple LRV1 infections in three parasite isolates. Based on these data, future characterization of new strains from other geographic areas and other parasite species should extend knowledge of LRV1 diversification processes. Finally, these results allowed us to identify genomic regions where best to allocate resources for subsequent analyses of LRV1 viral diversity and genotyping that could serve for accurate routine molecular diagnostic applications.

## Introduction

Protozoan parasites of the genus *Leishmania* are unicellular eukaryotes with a complex digenetic cycle. In the vertebrate host, they are obligatory intracellular parasites. They cause a broad spectrum of diseases, collectively known as leishmaniases, that occur predominantly in tropical and subtropical regions [1]. Given their frequency and the severity of certain clinical forms, these diseases represent a major public health problem in endemic countries. Depending on their behavior in the vector’s gut, parasites of the *Leishmania* genus are divided into two subgenera: *Leishmania* and *Viannia*. The *Leishmania* subgenus *Viannia*, endemic in Latin America, is the etiological agent of cutaneous (CL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL) [2]. Within this subgenus, *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.) braziliensis* are hosts of a double-stranded RNA virus called *Leishmania* RNA Virus (LRV).

*Leishmania* RNA viruses are small, nonenveloped double-stranded RNA viruses [3]. LRV (genus *Leishmaniavirus*) are members of the *Totiviridae* family, along with several other groups of protozoal or fungal viruses, including *Giardia lamblia* virus (GLV), *Trichomonas vaginalis* viruses and *Eimeria* spp. viruses [3–9]. They have a nonsegmented genome approximately 5 kb (4.9–5.3 kb) in length with two long, partially overlapping, open reading frames on the positive strand encoding the capsid/coat protein (CP; *orf2*) and the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp; *orf3*) and a small 5'-proximal potential *orf1* [10]. LRV *orf1* presents similarities with *orf1* of ScV-L-A virus, a totivirus of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a toxin, but its function remains unsolved. LRV genomic RNA is flanked at its extremities by 5' and 3' untranslated regions (UTR). It has been shown that the 5'UTR promotes internal initiation of translation with the presence of an internal ribosomal entry site (IRES) [11]. The 5'UTR also possesses five predicted stem-loop structures (I to V) and a consensus cleavage sequence [12–14]. Stem-loop IV and the consensus cleavage site represent the minimal essential components for the viral capsid-dependent RNA cleavage that might play a regulatory role for maintaining persistent infection of host cells [13, 15].

The presence of virus-like particles in *Leishmania* parasites was first reported in the early 1970s [16]. Since then, two types of LRV have been identified: LRV1 carried by some New World *Leishmania* species and LRV2 by Old World species [3, 8, 17]. To date, LRV1 was detected in *Leishmania* parasites from Colombia, Brazil, Peru, Bolivia, Suriname and French Guiana, all originating in the Amazon basin [18–22]. LRV2 was first isolated from *L. hertigi*, a non-human parasite species [16]. It was then found in a single isolate of *L. major* and, more recently, in strains of *L. aethiopica* isolated from biopsies of cutaneous leishmaniasis patients in the Ethiopian highlands as well as in two different *Leishmania* isolates from Iran belonging to the *L. infantum* and *L. major* species [17, 23, 24]. At the time of their discovery, arbitrary identifiers were given to type 1 *Leishmania* RNA viruses showing a certain degree of sequence conservation on the basis of hybridization analysis, namely LRV1-1 to LRV1-12 [20]. Two additional types, LRV1-13 and LRV1-14, were then described based on sequence comparison of fragments of two genomic regions, i.e., the 5'UTR and *orf3* regions [25]. Several subtypes were isolated from *L. (V.) guyanensis*, LRV1-(1, 4, 5, 6, 7, 8 and 9), others from *L. (V.) braziliensis*, LRV1-(2, 3, 13 and 14) and untyped *Leishmania* spp., LRV1-(10, 11, 12). In addition to *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.) braziliensis*, Cantanhêde et al. recently reported the identification of LRV1 in *L. (V.) lainsoni* and *L. (Leishmania) amazonensis* parasites [26]. So far, no LRV1 has been detected in other *L. (V.)* species and none in *L. (L.)* species [18, 21]. These results, proving the wide distribution of LRV1 in the different New World parasite species, combined with the lack of an infectious phase for these viruses, suggested that LRV1 arose prior to the divergence of New World parasites and further supported the theory that LRVs are ancient viruses [25]. Nevertheless, most of these viruses have only been characterized on short stretches of sequences a few hundred base-pairs long and, depending on the studies, different regions of the genome have been amplified. Complete cDNA sequences are only available for two New World virus isolates (LRV1-1 and LRV1-4), one LRV2-1 isolated from *L. major* and three more LRV2-1 strains from *L. aethiopica* [10, 12, 23, 27]. The LRV1-1 and LRV1-4 entire genomic sequences share 77% overall nucleotide identity.

Little is known on the biology of LRV, which persistently infects *Leishmania* parasites and is unable to produce extracellular infectious particles. Nevertheless, LRV1 infection of parasites seems to affect their virulence. Indeed, Ives et al. showed that metastasizing parasites have a high LRV1 burden that is recognized by host Toll-like receptor 3 (TLR3) to induce proinflammatory cytokines and chemokines in murine models [28]. They also showed that LRV1 in the metastasizing parasites subverted the host immune response to *Leishmania*, promoting parasite persistence and affecting treatment efficiency. We and others recently showed that LRV1

status in *L. (V.) guyanensis*- and *L. (V.) braziliensis*-infected patients was significantly predictive of first-line treatment failure and symptomatic relapse, and might stand to guide therapeutic choices in acute cutaneous leishmaniasis (ACL) [29, 30]. However, other studies reported contradictory results with respect to the association between the severity of leishmaniasis (cutaneous vs. mucocutaneous) and the presence of LRV1 [19, 22, 26, 31, 32].

In French Guiana, where CL is a public health problem with an average of 127 diagnosed cases per year between 2006 and 2013, oscillating between 96 and 160 cases per year, five coexisting *Leishmania* parasite species are known to infect humans: *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni* and *L. (V.) naiffi* [33, 34]. Among them, *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.) braziliensis* are the two predominant species, accounting for more than 85% and about 10% of CL cases, respectively [33]. The three other species are only occasionally diagnosed [33, 35]. For *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.) braziliensis*, patients present a broad spectrum of clinical manifestations (nodular, ulcerative, disseminated and mucous forms). In addition, symptomatic relapses and treatment failures are frequently seen in *L. (V.) guyanensis* infections during which patients variously respond to first-line anti-leishmanial treatments and are more prone to developing chronic CL. Factors underlying disease evolution are yet to be fully understood. We recently reported that 74% of *Leishmania* spp. isolates collected between 2011 and 2014 were LRV1-positive [21]. LRV1 was detected in 80% (90/112) of *L. (V.) guyanensis* isolates, 55% (6/11) of *L. (V.) braziliensis* and in none of the (0/6) *L. (L.) amazonensis* isolates. Considering the paucity of sequence data available for LRV1, because of the many questions that arise about its origin and distribution, we were interested in gaining insight into the genetic diversity, at the genomic level, and the evolution of this virus in the circulating isolates of *Leishmania* spp. in French Guiana. To this end, using Illumina deep-sequencing technology and *de novo* sequence assembly, we generated and analyzed LRV1 sequences derived from *Leishmania* parasite cultures obtained from skin lesions of 20 patients suffering of ACL, i.e., with lesions present for less than 6 months. Polymorphism and phylogenetic analyses were then performed to measure LRV1 genome-wide diversity. Here we report the full-length coding sequences of 24 LRV1 strains and use them to make the first-ever estimate of LRV1 viral diversity that exist in *Leishmania (V.) guyanensis*. These results represent the largest number of LRV1 full-length coding sequences published to date and the first time that in some parasite strains multiple viral infections have been identified.

## Materials and methods

### Ethics statement

The *Leishmania* isolates used in this study were obtained from a previously published study [21]. Briefly, these isolates had been successfully cultured from biopsies collected between 2011 and 2014 from 20 adult patients (16 males and four females; 19–66 years old) diagnosed with ACL and enrolled in the study before treatment with pentamidine isethionate (Pentacarinat; Rhone Poulenc) (Table 1). All patients, in consultation for a suspicion of leishmaniasis at the dermatology unit of the Cayenne hospital (Centre Hospitalier Andrée Rosemon, CHAR), Cayenne, French Guiana, were informed during consultation by the clinician that case records and biological data might be further used in research and that they had the right to refuse. Biological samples were taken for diagnostic purposes and oral informed consent was documented in the case records by the clinician during consultation. Patient data was anonymized at the Laboratory of Parasitology and Mycology of the Cayenne hospital, which carried out diagnostic analyzes and initial parasite culture. The project did not raise any concerns and was approved by the Ethical Committee at Cayenne Hospital. Ethical approval was granted based on the human experimentation guidelines of the “Comité consultatif sur le traitement de



**Table 1. Epidemiological features of the 20 patients with ACL, *Leishmania* species identification and characteristics of the 24 LRV1 strains sequenced.**

Strain ID <sup>a</sup>	Patient				Parasite	LRV1								
	Gender	YOB <sup>b</sup>	CD <sup>c</sup>	Age	Species ID <sup>d</sup>	Clade <sup>e</sup>	Genome <sup>f</sup>	5'UTR <sup>f</sup>	ORF2/CP <sup>f</sup>	ORF3/RdRp <sup>f</sup>	3'UTR <sup>f</sup>	G+C %	International code	Accession no.
2008	F	1993	2012	19	<i>L. guyanensis</i>	A	5268	389	2229	2637	13	0.454	LRV1-Lg-2008	KY750612
2015	M	1972	2012	40	<i>L. guyanensis</i>	A	5268	389	2229	2637	13	0.455	LRV1-Lg-2015	KY750613
WF69 <sub>G1</sub>	M	1988	2012	24	<i>L. guyanensis</i>	A	5268	389	2229	2637	13	0.455	LRV1-Lg-WF69 <sub>G1</sub>	KY750624
WF69 <sub>G2</sub>						A	5268	389	2229	2637	13	0.464	LRV1-Lg-WF69 <sub>G2</sub>	KY750625
XK73	M	1990	2013	23	<i>L. guyanensis</i>	A	5268	389	2229	2637	13	0.459	LRV1-Lg-XK73	KY750627
LF98	F	1974	2013	39	<i>L. guyanensis</i>	A	5268	389	2229	2637	13	0.454	LRV1-Lg-LF98	KY750617
YR07	M	1984	2014	30	<i>L. guyanensis</i>	A	5268	389	2229	2637	13	0.455	LRV1-Lg-YR07	KY750629
2028 <sub>G2</sub>						A	5268	389	2229	2637	13	0.456	LRV1-Lg-2028 <sub>G2</sub>	KY750615
2028 <sub>G3</sub>						A	5268	389	2229	2637	13	0.464	LRV1-Lg-2028 <sub>G3</sub>	KY750616
2028 <sub>G1</sub>	F	1971	2012	41	<i>L. guyanensis</i>	B	5268	389	2229	2637	13	0.458	LRV1-Lg-2028 <sub>G1</sub>	KY750614
LL28	M	1960	2012	52	<i>L. guyanensis</i>	B	5268	389	2229	2637	13	0.457	LRV1-Lg-LV11	KY750618
2014	M	1983	2013	30	<i>L. guyanensis</i>	B	5267	388	2229	2637	13	0.46	LRV1-Lg-2014	KY750611
YE48	M	1986	2013	27	<i>L. guyanensis</i>	B	5268	389	2229	2637	13	0.459	LRV1-Lg-YE48	KY750628
PD46	F	1948	2014	66	<i>L. guyanensis</i>	B	5268	389	2229	2637	13	0.455	LRV1-Lg-PD46	KY750621
VW21	M	1987	2013	26	<i>L. guyanensis</i>	B	5268	389	2229	2637	13	0.459	LRV1-Lg-VW21	KY750623
MJ25	M	1976	2012	36	<i>L. guyanensis</i>	B	5268	389	2229	2637	13	0.462	LRV1-Lg-MJ25	KY750620
MC71	M	1993	2012	19	<i>L. guyanensis</i>	B	5268	389	2229	2637	13	0.462	LRV1-Lg-MC71	KY750619
YZ58	M	1959	2012	53	<i>L. guyanensis</i>	B	5268	389	2229	2637	13	0.457	LRV1-Lg-YZ58	KY750630
VL91	M	1977	2012	35	<i>L. guyanensis</i>	B	5268	389	2229	2637	13	0.454	LRV1-Lg-VL91	KY750622
XJ93 <sub>G1</sub>	M	1978	2013	35	<i>L. guyanensis</i>	B	5268	389	2229	2637	13	0.458	LRV1-Lg-XJ93 <sub>G1</sub>	KY750626
XJ93 <sub>G2</sub>						C	5269	390	2229	2637	13	0.458	LRV1-Lg-XJ93 <sub>G2</sub>	KY750609
LF94	M	1955	2013	58	<i>L. guyanensis</i>	D	5266	387	2229	2637	13	0.466	LRV1-Lg-LF94	KY750608
2001	M	1978	2011	33	<i>L. guyanensis</i>	E	5270	391	2229	2637	13	0.447	LRV1-Lg-2001	KY750607
YA70	M	1983	2013	30	<i>L. braziliensis</i>	F	5262	389	2229	2631	13	0.459	LRV1-Lb-YA70	KY750610

<sup>a</sup> ID, identification;

<sup>b</sup> YOB, year of birth;

<sup>c</sup> CD, collection date.

<sup>d</sup> as formerly determined by PCR-RFLP RPOF2/R2

<sup>e</sup> based on sequence comparison and phylogenetic analysis of the complete coding sequences of CP and RdRp.

<sup>f</sup> sizes in nucleotides

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005764.t001>

l'information en matière de recherche" (CCTIRS: 2012–42). The monocentric audit of retrospective anonymized case record data was permitted by the "Commission nationale de l'informatique et des libertés" (CNIL: DR.2014-091) as well as the regulations of Cayenne Hospital (<http://www.ch-cayenne.net/Droits-et-Devoirs.html>).

## LRV1 status and parasite species confirmation

All 20 isolates of *Leishmania* spp. had formerly been tested for their LRV1 status by RT-PCR and *Leishmania* spp. were identified using PCR-RFLP, as previously described (**Table 1**) [21, 36].

## Parasite cultures

Parasites were cultured in Schneider's medium (Sigma-Aldrich) complemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco), 0.6 mg/L Biopterin (Sigma-Aldrich) and 5 mg/L folate hemin (Sigma-Aldrich) without antibiotics. Dry pellets were constituted by centrifugation 5 min at 2500 rpm and removal of supernatant. The pellets were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA extraction.

## Biological cloning

For parasite cloning, 0.5 mL of culture medium containing  $2-4.10^7$  parasites was spread onto freshly prepared Schneider plates (Schneider's medium, 10% FCS, Biopterin 0.6 mg/L and folate hemin 5 mg/L, 2% low-melting-point agarose). After 7 days, the colonies were harvested and cultured separately in tubes containing complemented Schneider's medium for an additional 5–7 days. Separate cultures were then processed for RNA isolation and conventional RT-PCR using primer pairs specific to each virus (see below).

## RNA extraction and sequence-independent amplification

Total RNA was extracted from dry pellets of parasites ( $10^8$  parasites) using the RNeasy mini kit (QIAGEN) as recommended by the manufacturer, treated with Turbo DNase (Life Technologies) for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$  and then measured on a Biophotometer (Eppendorf). Then the generation of double-stranded cDNA and SPIA amplification was performed from 50 ng of total RNA using the Ovation RNA-Seq system V2 (NuGEN Technologies, Inc.) as specified by the manufacturer's protocol.

## Generation of libraries and high-throughput sequencing

The libraries were generated using the NextFlex PCR-free DNA Seq Kit (Bioo Scientific, Austin, TX, USA) with (15 strains, with a two-letter and two-number code) or without (five strains, with a 20XX code) a 10-cycle PCR enrichment before quantification and validation. They were then sequenced on an Illumina MiSeq instrument in 250-base paired-end reads (Illumina, San Diego, CA, USA). Sequence files were generated using Illumina Analysis Pipeline version 1.8 (CASAVA).

## Bioinformatics analysis

Raw sequences were filtered and trimmed using fastq-mcf with the following parameters: duplicates were removed when 50 bases were identical between reads (-D parameter) while minimum read length was set to 50 [37]. Adapter sequences were removed using -t (% of occurrence) set to zero. The other parameters were left to their default settings. Then Deconseq was used to eliminate phiX174 phage sequences [38]. Fastq clean files were assembled using SPAdes (version 3.0.0) with the following range of k-mers: 21, 55, 77, 99 and 127 [39]. We used blastn for sequence comparison between assembled contigs and reference LRV1 genomes (LRV1-1 and LRV1-4, accession numbers M92355 and U01899, respectively) [6]. The LRV1-positive contigs were then extracted and used as references for mapping using the bwa mem algorithm (version 0.7.10-r789) with a kmer set to 55 and a minimum alignment score of 40, using a minimum fastq quality of 30

[40]. Some assembly abnormalities were manually corrected. The contigs and known LRV genomes were then multiple-aligned with MAFFT alignment software (version 7.037b) [41].

### Conventional RT-PCR and Sanger sequencing

Conventional methods were used to extend sequences when needed. Three sets of degenerate consensus primers were designed according to the NGS sequences obtained. Primers were degenerated so as to amplify products from all samples regardless of the sequence. Full information on the primers is available in Table 2. These sets of primers were used in RT-PCR reactions carried out using the Transcriptor one-step RT-PCR kit (Roche), as recommended by the manufacturer, using 500 ng of input total RNA. RT-PCR products at the expected size were sent to Beckman Coulter Genomics (<http://www.beckmangenomics.com/>) for direct sequencing. Furthermore, to specifically amplify the different viruses in case of multiple-infected *Leishmania* isolates, one set of nondegenerate specific primers per virus was designed and used for RT-PCR (Table 2).

### Phylogenetic analyses

Contigs from HTS as well as raw sequences downloaded from the Beckman Coulter Genomics website were analyzed and edited in MEGA 5.05 [42]. Multiple sequence alignments were constructed using ClustalW with all published complete and partial LRV1 sequences. Alignments were checked manually. Sequences were translated into amino acids and both nucleotide and amino acid sequences were checked for irregularities. For phylogenetic trees inferred from the aligned nucleotide sequences, the MrModeltest2.3 program was used to determine the optimal

**Table 2. Sequences of oligonucleotide primers used for consensus and specific RT-PCRs.**

Oligonucleotide	Orientation <sup>a</sup>	5' → 3' sequence <sup>b</sup>	Position <sup>c</sup>	Ta <sup>d</sup>	Elongation	Size <sup>e</sup>
<i>Degenerate primers</i>						
LRV1s	+	ATTCGCTAGCTGTYBGGATGGTAGYGTAC	30–59	60°C	1 min	779
LRV2as	-	CATAGCCAAAACGTTACAWARTGTYGRGTGT	778–809			
LRV3s	+	ATGCATGTHGGTATGACATHYTRATGTC	4258–4286	50°C	1 min	922
LRV4as	-	TGAGCCATTGARGTYGCTTCRTRTAYGGA	5151–5180			
5LRVs1	+	ATCATGGCCCAGGCYAGCTG	4840–4859	50°C	30 sec	438/432
LRV11as	-	ATAGTTTATGRCACYTCTGCCATATTCC	5249–5277			
LRV14as	-	TTATGGCACTYTTGCCATATTCC	5249–5272			
<i>Specific primers</i>						
XJ93_G1_F	+	TGTCCCGATTGCTGGTTACT	1307–1326	55°C	1 min	656
XJ93_G1_R	-	GGACGCAACCTGAAATCTACGTTAG	1939–1963			
XJ93_G2_F	+	ACATGCCTTGGACCAAAACC	4079–4098	55°C	30 sec	251
XJ93_G2_R	-	TGGGTGAGGTTAGCTATTAGGT	4309–4330			
WF69_G1_F	+	CTGACTTAGGTGGGTATGCAA	2960–2980	55°C	1 min	606
WF69_G1_R	-	TAGACTTGACGCACTGCCA	3548–3566			
WF69_G2_F	+	CTGACTTGGGAGGGTACGTGA	2960–2980	55°C	1 min	639
WF69_G2_R	-	GGGTACGAAACAGACCTTTAATCT	3575–3599			

<sup>a</sup> +, sense; -, antisense.

<sup>b</sup> Positions of degeneracy follow the IUPAC-IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry-International Union of Biochemistry) codes.

<sup>c</sup> Position of primers are indicated relative to the LRV1-1 sequence, GenBank accession number M92355.

<sup>d</sup> Ta, annealing temperature.

<sup>e</sup> Size of PCR products in base pairs.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005764.t002>

model of nucleotide evolution [43]. The GTR model, with a gamma distribution shape parameter (G) and invariable sites (I), was identified and used for the Bayesian approach, which was performed with Mr. Bayes 3.2.2 to infer phylogenetic relationships [44]. Markov Chain Monte Carlo (MCMC) simulations were run for 10,000,000 generations, with four simultaneous chains, using a sample frequency of 100 and a burn-in of 25,000. Majority rule consensus trees were obtained from the output. Validation of the inference was assessed based on the standard deviation of split frequencies, which was less than the expected threshold value of 0.01. For phylogenetic trees inferred from the aligned amino acid sequences, the ProtTest3 program was used to determine the optimal model of amino acid evolution. The JTT model, with gamma (G) distribution, was identified and used for the Bayesian approach [45], which was performed with Mr. Bayes 3.2.2 [44]. MCMC simulations were run for 10,000,000 generations, with four simultaneous chains, using a sample frequency of 100 and a burn-in of 25,000. Majority rule consensus trees were obtained from the output. Validation of the inference was assessed based on the standard deviation of split frequencies, which was less than the expected threshold value of 0.01.

### Naming assignation

LRV1 strains were named according to a recent proposal to the International Committee on Taxonomy of Viruses, i.e., “LRV1” followed by two letters corresponding to the parasite species to which the strain designation was then assigned [46]. For example: LRV1-Lg-LF94 for LRV1 from *L. (V.) guyanensis* strain LF94 (Table 1).

### Accession numbers

Sequences reported in this paper were deposited in the GenBank nucleotide database under accession numbers **KY750607** to **KY750630**. The raw sequencing data are available in the Sequence Read Archive under accession number **PRJNA371487** ([www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/371487](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/371487)).

## Results

### Patients

In the context of epidemiological screening, we tested 129 isolates of *Leishmania* sp. Collected in French Guiana between 2011 and 2014 for the presence of LRV1 [21]. Here, we analyzed a subset of previously identified LRV1-positive isolates obtained from patients diagnosed with ACL. A total of 20 parasite cultures, obtained from human biopsies isolated from 16 men and four women, aged 19–66 years with a median age of 35 years, were selected for high-throughput sequencing. The data (gender and age) collected for each patient are listed in Table 1. In all, we sequenced 19 LRV1-positive *L. (V.) guyanensis* isolates and one LRV1-positive *L. (V.) braziliensis* isolate.

### Global analysis of high-throughput sequencing data

Using Illumina MiSeq sequencing technology, 24 full-length or almost full-length genomic sequences were *de novo* assembled into individual contigs with a mean 49.8 depth of coverage. Sequences were 4.8–5.3 kb long. Alignment of the full-length genome sequences obtained with those available in the database made it possible to design three sets of consensus-degenerate primers (Table 2). These primer pairs were used for conventional RT-PCR and Sanger sequencing to extend the sequences to the 5' and 3' ends that were missing for some strains. High-throughput sequencing combined with conventional RT-PCR applied to the 20 LRV1-positive isolates

generated almost complete genomic sequences (from nucleotide 60 to 5248 of LRV1-1, accession number NC\_002063) from each viral strain. This covers the full-length coding sequence of the virus. In addition, Sanger sequencing of the RT-PCR products also allowed verifying the correctness of the sequences obtained. A total of 24 different viral sequences were obtained from the 20 LRV1-positive parasite isolates tested. All sequences were 5.2 kb long with an average G+C content ranging from 44.7% to 46.6%. Detailed genome statistics are outlined in **Table 1**. Unexpectedly, co-infections by two or three LRV1 viruses were identified in three parasite isolates, 2028, WF69 and XJ93. LRV1 full-length coding sequences obtained from the same isolate were named 2028<sub>G1</sub>, 2028<sub>G2</sub> and 2028<sub>G3</sub>, WF69<sub>G1</sub> and WF69<sub>G2</sub>, XJ93<sub>G1</sub> and XJ93<sub>G2</sub>.

## Sequence features

The 24 sequences obtained had the same structural organization as partially overlapping open reading frames surrounded by untranslated regions similar to the sequence already described [10, 12]. In addition, they showed an identical genome size. All but one sequence (strain LF94) showed a double-nucleotide insertion in the 5'UTR region at positions 201–202 relative to LRV1-1 (numbers given here and below refer to the nucleotide positions in the published sequence of LRV1-1, acc. # NC\_002063). At this exception of this shared insertion, only a few other nucleotide insertions and deletions were seen in the 5'UTR region of four viral sequences relative to LRV1-1. Thus, strain 2014 exhibited one nucleotide deletion at position 363, strain 2001 possessed two nucleotide insertions at positions 142 and 198 (these two insertions were also present in LRV1-2, LRV1-8 and LRV1-9 5'UTR sequences), strain XJ93<sub>G2</sub> showed a double-nucleotide insertion at position 198–199 and one nucleotide deletion at position 446, while strain YA70 presented one nucleotide insertion at position 198 and one deletion at position 393. In addition to these indels in the 5'UTR, of the 24 sequences, only the coding sequence of the *RNA-dependent RNA polymerase* gene of the YA70 strain presented one codon insertion at positions 73–75 (D25), one codon deletion at positions 169–171 and a double codon deletion at positions 493–498. These codon indels did not alter the reading frame. YA70 shared the first amino acid insertion at position 25 (aspartic acid or lysine, respectively) and the first codon deletion with strain LRV1-Lb2169 (international code MHOM/BO/2011/2169, acc. # KC862308). These two strains were identified from *L. (V.) braziliensis* parasites. The YA70 strain also possessed a double stop codon at the end of the *coat* and *RNA-dependent RNA polymerase* genes. Three other strains also possessed a double stop codon at the end of the *RNA-dependent RNA polymerase* gene: LRV1-1, LF94 and 2001. Except for YA70, no deletions or insertions were detected in the coding sequences of the other strains. According to these results, *orf2* was 2229 bp in length and *orf3* was 2631–2637 bp, encoding a capsid protein of 742 aa and a RNA-dependent RNA polymerase of 876–878 aa, respectively.

## Sequence identities

The almost complete genome sequences obtained for each strain as well as the nucleotide and amino acid sequences of the capsid and RNA-dependent RNA polymerase were compared to one another and to those published in the databases. All sequences were unique. On the basis of the common  $\approx$  5260 bp sequences obtained for each strain, pairwise comparisons showed that nucleotide sequence identities ranged from 76.5% (2001 vs. LRV1-4) to 99.5% (PD46 vs. VL91). CP coding sequences exhibited among themselves from 76.3% (Lg1398 vs. LRV1-Lb2169) to 99.7% (2008 vs. LF98) nucleotide identity and from 89.5% (LRV1-4 vs. LRV1-Lb2169) to 100% (PD46 vs. VL91 and 2008 vs. LF98 and 2028<sub>G1</sub> vs. LL28/LV11) amino acid identity. For RdRp coding sequences, the nucleotide identities ranged from 72.4% (2001 vs. LRV1-Lb2169) to 99.4% (PD46 vs. VL91) and the amino acid identities ranged from 79.9% (2001 vs. LRV1-4 vs.

**Table 3. Nucleotide and amino acid identities between the novel LRV1 sequences and those available in the databases, as reported by clades (A-F).**

A-												
% Identity with												
	A	B	C	D	E	F						
A	90.9–98.8											
B	86.4–87.6	92.7–99.5										
C	82.9–83.9	83.4–83.6	-									
D	77.5–78.6	77.9–78.8	78–78.5	96.8								
E	76.5–77.2	76.7–77.4	77.7	77.6–77.8	-							
F	77.2–77.7	77.3–78.1	77.7	77.7–77.9	77.3	-						
B-												
% Identity with												
	A		B		C		D		E		F	
	nct	aa	nct	aa	nct	aa	nct	aa	nct	aa	nct	aa
A	89.6–99.7	95.7–100										
B	85.6–87.4	95.5–98.2	91.8–99.6	98.5–100								
C	82.3–83.2	94.5–96.5	82.4–83.3	95.8–96.5	-	-						
D	78.4–79.4	90.8–92.7	78.2–79.3	91.9–92.4	78.3–78.6	92.8–93.1	96.7	99.5				
E	77.8–79.5	89.9–91.9	77.7–79.5	91.8–92.4	78.8–79.1	91.6–92	78.6–79.3	91.6–92	98.2	99.3		
F	77.3–78.5	89.5–92.4	78–79.5	90.8–92.4	77.9–78.8	91.5–92.4	77.8–78.7	91.8–92.4	76.3–78.5	90.7–91.4	80.7	95.5
C-												
% Identity with												
	A		B		C		D		E		F	
	nct	aa	nct	aa	nct	aa	nct	aa	nct	aa	nct	aa
A	90.4–99	94.9–99.5										
B	85.4–87.1	92.3–94.9	92.4–99.4	95.8–99.4								
C	81.5–83.1	88.1–89.5	81.9–82.7	88.9–89.6	-	-						
D	74.9–76.5	82.2–83.9	75.2–76.7	82.7–84	75.6–76.3	83.8–84.2	96.5	97.7				
E	72.9–74.3	79.9–81.5	73.3–73.9	80.7–81.1	74.6	81.3	74.8–75	81.7–81.8	-	-		
F	73.7–75.9	81.9–83.9	74.7–75.4	81.8–83.7	75–75.1	82.6–82.9	74–75.4	80.8–81.8	72.4–74.7	79.9–80.7	78.8	86.3

A- Numbers refer to values obtained by comparing the common 5176 base-pair sequences of the obtained LRV1 sequences with the few other LRV1 sequences available.

B- Numbers refer to values obtained by comparing the complete coding sequences of the Coat gene (2226 base pair/742 aa). excluding the stop codon.

C- Numbers refer to values obtained by comparing the complete coding sequences of the RNA-dependent RNA polymerase (2628 base pair/876 aa). excluding the stop codon.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005764.t003>

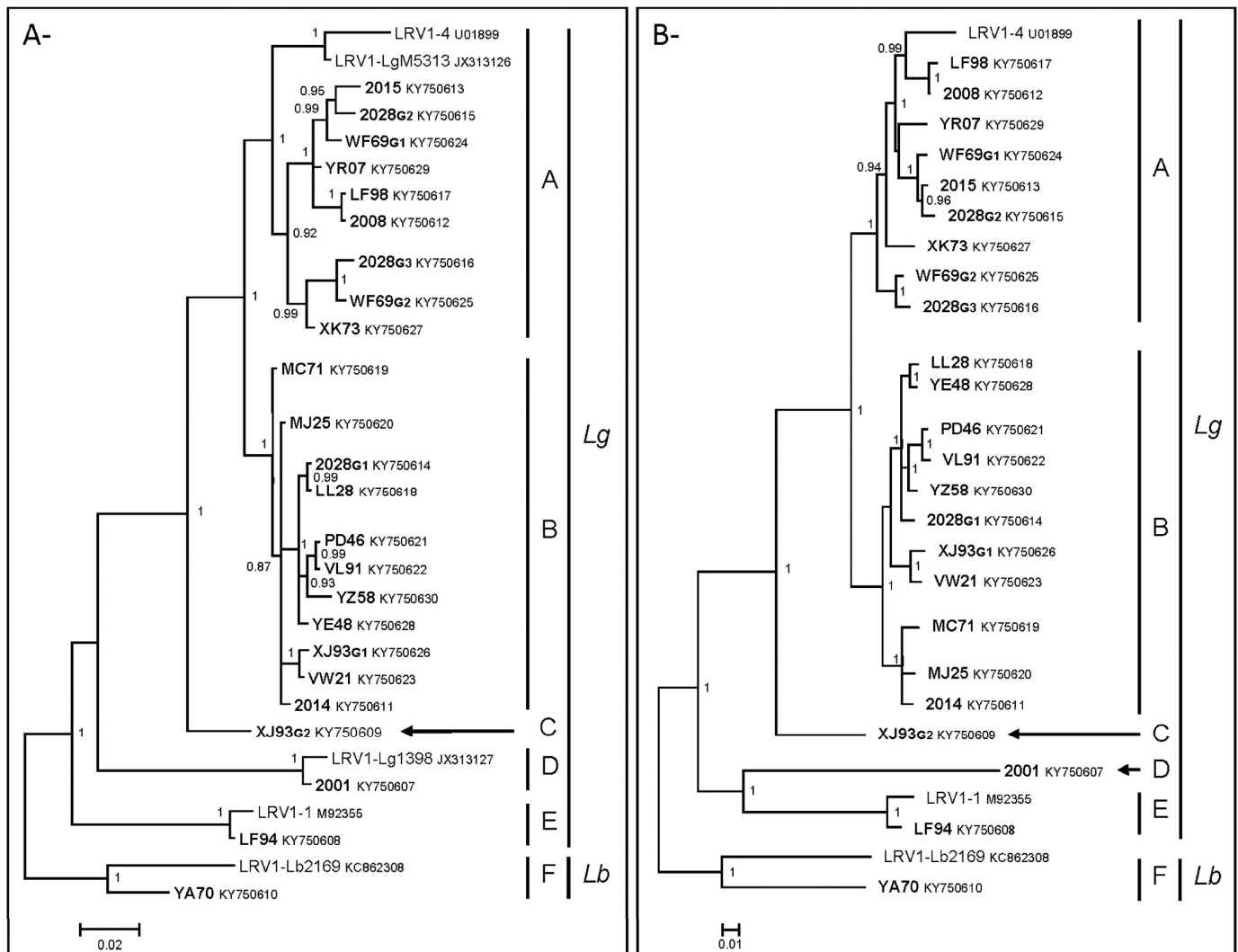
LRV1-Lb2169) to 99.5% (2008 vs. LF98). Based on the genetic distance (Table 3) and phylogenetic relationship results (see below), six clades were clearly identifiable. We tentatively called them clades A–F. With the exception of clade A sequences for which the nucleotide divergence ranged from 0.3 to 10.4%, the intra-clade variability of all clades was below 10% at both the nucleotide and amino acid levels. Moreover, except for the A-B inter-clade variability, which ranged from 95.5 to 98.2% on CP and from 92.3 to 94.9% on RdRp on amino acid sequences, the inter-clade variability was over 10% at the nucleotide and amino acid levels. It is noteworthy that the two LRV1 sequences obtained from isolate WF69, WF69<sub>G1</sub> and WF69<sub>G2</sub>, had a 91.8% nucleotide identity. Strains 2028<sub>G2</sub> vs. 2028<sub>G3</sub> gave the same percentage of nucleotide identity (91.8%), while 2028<sub>G1</sub> vs. 2028<sub>G2</sub> and 2028<sub>G1</sub> vs. 2028<sub>G3</sub> showed 86.9 and 87.4% nucleotide identity, respectively. Finally, strains XJ93<sub>G1</sub> vs. XJ93<sub>G2</sub> exhibited 83.4% nucleotide identity. Nucleotide substitutions occurred throughout the sequences.

## 5'UTR sequence comparison

5'UTR sequences (from nucleotide 60 to 450) exhibited 86.2 (YA70 vs. 2001) to 100% (VL91 vs. YZ58 and LF98 vs. 2008) nucleotide identities between them and with the LRV1-1 and LRV1-4 5'UTR sequences. Of interest, it should be noted that YA70, which corresponded to the only sequence obtained from a *L. (V.) braziliensis* isolate, was the most divergent sequence. If we exclude it from the data set, the nucleotide sequence conservation between LRV1 5'UTR sequences from *L. (V.) guyanensis* isolates ranged from 88.8 to 100%. The same analysis restricted to the LRV1 strains from *L. (V.) guyanensis* from French Guiana (excluding strain 2001, for which the geographic location of contamination was reported as the region of Manaus, Amazonas state, Brazil) demonstrated a nucleotide sequence conservation ranging from 91.1% to 100%. In addition, taking into account all the sequences analyzed, 74.7% of the 5'UTR nucleotide positions were identical. By excluding YA70, this percentage increased to 79.1%. Again, by restricting our analysis to LRV1 5'UTR sequences obtained from *L. (V.) guyanensis* strains from French Guiana, 82.1% of the nucleotide positions were identical. These 100% conserved nucleotide positions were distributed into blocks of different sizes. The longest one, a 50-bp motif, covering nucleotides 313–362, encompassed the previously identified pyrimidine-rich region (333-UUUCUUGUACUAUU-347), whose first nine nucleotides are complementary to a purine-rich region of the *Leishmania* 18S rRNA [47], as well as the nucleocapsid endoribonuclease cleavage site 314-GAUC<sup>\*</sup>CGAA-321 [13, 14]. In addition, analysis of the stem-loop IV sequences located upstream, from nucleotide 266 to 281, showed that all but two sequences were 100% conserved and identical to the published one [15]. The only two divergent sequences corresponded to strains 2001 and XJ93<sub>G2</sub>. Strain XJ93<sub>G2</sub> presented two complementary substitutions at positions U269C and A278G of the stem, while strain 2001 presented one substitution at position A278G able to form a wobble base pair with the uracil at position 269 (all positions are given relative to LRV1-1 sequence, accession number NC\_002063). This shows that LRV1 5'UTR sequences are strongly conserved in both nucleotide sequences and predicted RNA secondary structures.

## Phylogenies

Phylogenetic analyses were done on the almost-complete genome sequences (nucleotides 60–5248 relative to the LRV1-1 sequence) (S1 Fig), as well as on either nucleotide or amino acid sequences of the capsid (Fig 1A) and RNA-dependent RNA polymerase (Fig 1B). They all gave strictly identical tree topologies. As mentioned above, we identified six monophyletic “clades”, A–F, all supported by high posterior probabilities. Most of our strains clustered in clades A and B. Indeed, nine of the strains, with LRV1-4 and LRV1-LgM5313, belonged to the monophyletic clade A while clade B was composed of 11 of our strains. All LRV1 strains belonging to clades A and B were from *L. (V.) guyanensis* parasites. Clades A and B belonged to a monophyletic lineage supported by a posterior probability value of 1. In addition, in clade A, LRV1-LgM5313 and LRV1-4 sequences formed a monophyletic well-supported branch in clade A (Fig 1A). These two sequences correspond to Brazilian *L. (V.) guyanensis* isolates, whereas the others were from French Guiana. Clade C contained only a new divergent strain, XJ93<sub>G2</sub>, which is well supported phylogenetically in all analyses, while clade D was composed of strains 2001 and LRV1-Lg1398. In addition, a phylogenetic analysis restricted to a common 219-bp fragment of the 5'UTR region (S2 Fig), which allowed including sequences from most of the LRV1-1 to LRV1-13 strains (except LRV1-3, -5, -6 and -12 for which no sequence is available), demonstrated that strain 2001 was close to LRV1-8 and LRV1-9 strains. These four strains were identified from *L. (V.) guyanensis* isolates from Brazil. Clade E comprised two strains, one of our sequences, LF94, and LRV1-1. Finally, YA70 and LRV1-Lb2169, identified



**Fig 1. Phylogenetic analysis of *Leishmania* RNA virus 1 isolates.** The phylogenetic trees were inferred from A-) the complete amino acid sequences of the *capsid* gene (757 amino acids) and B-) the complete amino acid sequences of the *RdRp* gene (879 amino acids) using the Bayesian method with the JTT + G model of amino acid evolution. New LRV1 sequences generated in this study are in boldface. Sequence identifiers include the strain ID and the NCBI accession number. The major clades representing the different LRV1 genotypes identified (A–F) as well as the clades of LRV1 isolates from *L. (V.) guyanensis* (*Lg*) or *L. (V.) braziliensis* (*Lb*) parasites are labeled. Posterior probabilities of the Bayesian analysis (>90%) are shown next to each node. The scale bars indicate amino acid substitutions per site.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005764.g001>

from *L. (V.) braziliensis* strains, belonged to a separate clade, F, distinct from the other clades composed of LRV1 sequences of *L. (V.) guyanensis* (Fig 1). Interestingly enough, the two viral sequences identified from WF69 belonged to two distinct groups of sequences within clade A, two of the three strains from 2028 (2028<sub>G2</sub> and 2028<sub>G3</sub>) were also part of two distinct groups of sequences within clade A, while the third sequence, 2028<sub>G1</sub>, belonged to clade B. Finally, XJ93<sub>G1</sub> belonged to clade B and XJ93<sub>G2</sub> was the only representative of clade C.

The last phylogenetic analysis, restricted to partial capsid sequences (299bp/99aa), allowed including sequences recently published by Adauí et al. obtained from *L. (V.) braziliensis* isolates from Peru and Bolivia [29]. All of the LRV1 sequences from *L. (V.) braziliensis* isolates formed a distinct monophyletic clade, highly supported by a posterior probability of 0.91



(Fig 2). LRV1 sequences from *L. (V.) braziliensis* isolates were subdivided into distinct clades as observed for those from *L. (V.) guyanensis*. The two sequences previously identified as clade F (YA70 and LRV1-Lb2169) grouped with the other sequences from *L. (V.) braziliensis* isolates. Interestingly, YA70, which corresponded to the unique strain obtained from a *L. (V.) braziliensis* isolate from French Guiana, possessed a basal position to the clade. Nevertheless, phylogenetic relationships of LRV1 isolates from *L. (V.) guyanensis* strains were less robust given that clades D and E clustered with clade F of *L. (V.) braziliensis* viruses.

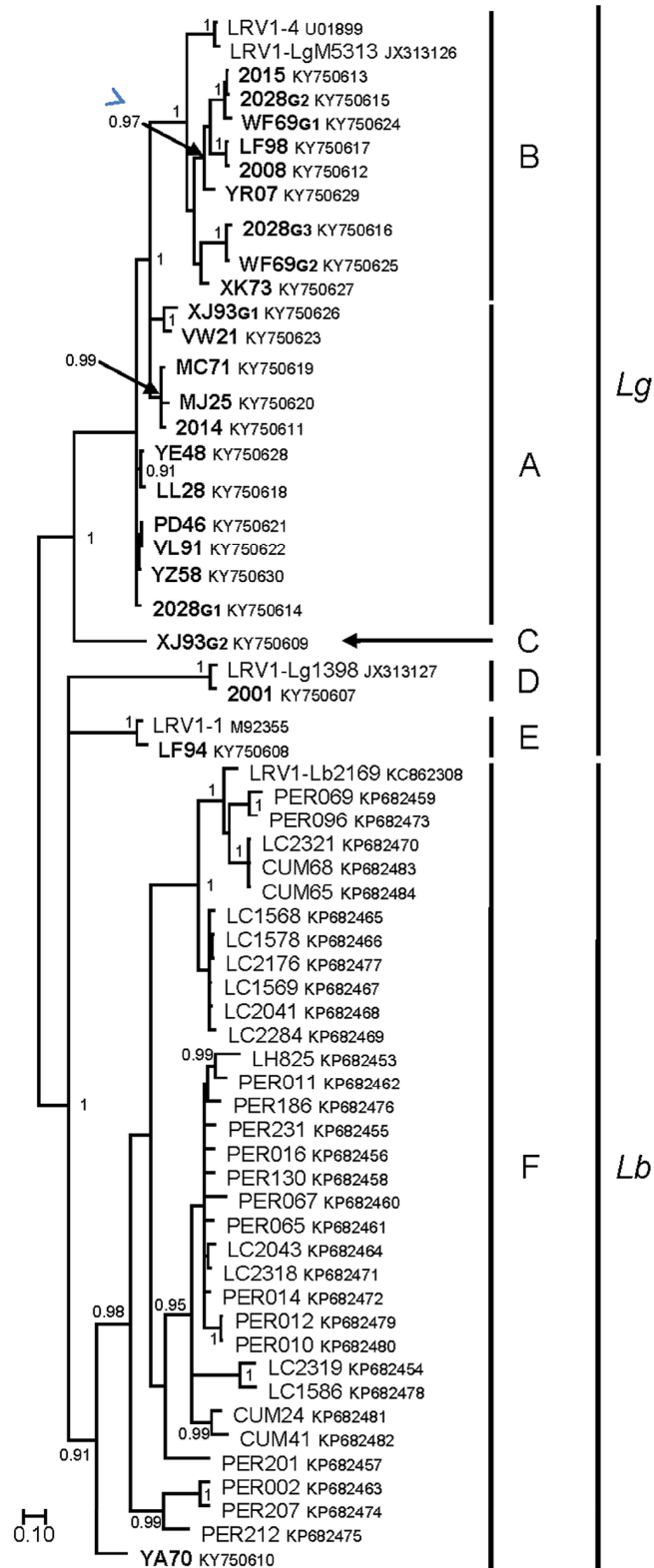
## Biological cloning

To determine if the multiple LRV1 strains identified in three *Leishmania* isolates were real viral co-infections or due to the simultaneous presence of distinct parasite populations in our cultures, we proceeded to the biological cloning of the parasites. Two of the three parasites, XJ93 and WF69, were tested. The initial parasite cultures were divided for either RNA isolation or biological cloning. Seven *Leishmania* clones and three subclones of one of the clones were obtained from XJ93. Five clones were obtained from WF69. RNA extracted from the initial cultures and from the different clones and subclones was then submitted to RT-PCR using different combinations of primers, each one specific to a virus (Table 2). RT-PCR proved the presence of co-occurring viruses in the initial cultures as well as in all the different clones and subclones.

## Discussion

Herein we present the full-length coding sequences of 24 LRV1 strains obtained from 18 *L. (V.) guyanensis* and one *L. (V.) braziliensis* isolates from across French Guiana as well as one *L. (V.) guyanensis* isolate from the Manaus area, Amazonas state, Brazil. This sequence data set is the largest analysis of LRV1 sequences undertaken so far. Analysis of these sequence data reveals that they have the same genomic organization. With the exception of a few indels detected in five strains, the 5'UTR sequences show, as previously reported, a higher degree of nucleotide sequence conservation than the coding sequences [47]. This high level of sequence conservation, with long-100% conserved-motifs (up to 50 bp in length), emphasizes the biological importance of this region in the viral life cycle and for maintaining persistent infection [13, 15, 47]. Moreover, only two sequences possessed indels in the coding sequence of the RNA-dependent RNA polymerase. Two of the three indels observed were located at the same position between the two strains. Given that both strains derived from the only two *L. (V.) braziliensis* isolates for which complete cds of the RdRp are available, these indels could correspond to a molecular signature of LRV1 strains from *L. (V.) braziliensis*. Further studies are necessary to confirm this point.

From a phylogenetic perspective, it appears that differential clustering exists between viral genomes of *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.) braziliensis* isolates and among viral genomes of *L. (V.) guyanensis* isolates. These results support the hypothesis that LRV1 is an ancient virus that has co-evolved with its parasite [25]. In addition, the intra- and inter-clade variability is, overall, below and above 10%, respectively, at both the nucleotide and amino acid levels. Finally, geographical clustering is observed with some clades related to the supposed geographical origin of the parasites. Nevertheless, insufficient geographical sampling, with many areas/countries lacking sufficient data, only based on very short sequences, currently limits phylogeographic interpretations. These results emphasize the crucial need for a better assessment of LRV1 distribution and genetic variation in the different parasite species at a wider geographical scale. Analysis of other *L. (V.) guyanensis* isolates from different geographical regions as well as of other New World *Leishmania* parasite species should thus expand our understanding of the diversification



**Fig 2. Phylogenetic analysis of partial capsid gene sequences (alignment of 299 nucleotides).** The tree was inferred using the Bayesian method with the GTR + G + I model. Novel sequences generated in this

study are shown in bold. Sequence identifiers include the strain ID and the NCBI accession number. The major clades representing the different LRV1 genotypes identified (A–F) as well as the clades of LRV1 isolates from *L. (V.) guyanensis* (Lg) or *L. (V.) braziliensis* (Lb) parasites are labeled. Posterior probabilities of the Bayesian analysis (>90%) are shown next to each node. The scale bar indicates nucleotide sequence divergence among sequences.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005764.g002>

processes and the evolutionary history of LRV1. These results are also of major importance from a taxonomic viewpoint. They should help define analytical methods and criteria to be used for virus classification and to set up an informative naming system.

A unique viral genome sequence was recovered from 17 of the 20 *Leishmania* isolates tested. Unexpectedly, the three other isolates studied contained more than one viral sequence, indicating that they were co- or super-infected with two or more viruses. The different strains identified from the same isolate showed from about 8% to almost 17% nucleotide divergence among them on the almost complete genome sequences generated. A closer look at the 5'UTR motifs identified as minimal essential elements for site-specific targeting of the capsid endoribonuclease, *i.e.* the stem-loop IV structure and single-site specific cleavage site, of the different strains showed their perfect conservation, confirming that they had exact endoribonuclease sites [15]. Furthermore, biological cloning of these parasite isolates followed by RT-PCR using primers specific to each virus confirmed the presence of multiple viruses in each clone. Taken together, these data sustain that the multiple viruses identified in these parasite isolates correspond to true persistent viral co-infections. These results suggest that co- or super-infections with divergent LRV1 strains is common given that three of 20 (15%) isolates were multiply infected. The frequency of co-infections will nevertheless have to be confirmed on a larger series. Furthermore, the relevance of viral co-infection for parasite pathogenesis is unknown. Additional surveys on their biological significance will have to be implemented.

These results provide, moreover, a unique opportunity for implementing reliable diagnostic testing methods. Indeed, knowledge of the genomic sequence of many LRV1 strains was essential for oligonucleotide design ensuring adequate detection of the virus (100% detection rate for LRV1s-LRV2as and 5LRVs1-LRV11as/LRV14as). It is noteworthy that the primers and probes that have previously been described, whether used for quantification or identification of LRV1 in clinical samples, possessed mismatches relative to our sequence data set [22, 26, 29, 32, 48–50]. This could have led to underestimation of the viral load or under-detection of divergent unknown strains. Furthermore, phylogenetic analyses conducted on sequences obtained with our primer pairs (**S3 Fig and S4 Fig**) gave an identical tree topology to those based on complete coding sequences of CP or RdRp. These couples of consensus-degenerate primers are thus robust diagnostic tools intended to be used for future screening of large panels of clinical isolates as well as for molecular phylogenetic studies. Finally, characterization of highly conserved sequence motifs, especially in the 5'UTR region, should help, by defining primers and probes with no mismatch relative to the available sequence data set, implement a pan-LRV1 real-time quantitative reverse-transcription (qRT)-PCR assay for unbiased quantitation of viral RNA. Therefore, given previous results by Ives et al. showing in murine models that a high LRV1 burden, eliciting a high pro-inflammatory profile, was associated with metastasizing parasites, it will be of particular interest to analyze various types of clinical samples to further define the role of LRV1 viral load in parasite virulence, disease progression and response to treatment [28]. These tools should contribute to drawing a more definite causal relationship of LRV1 in disease manifestation.

## Supporting information

**S1 Fig. Phylogenetic analysis of *Leishmania* RNA virus 1 isolates based on the almost complete genome sequences.** The phylogenetic trees were inferred from the almost complete nucleotide sequences (nucleotides 60–5248 relative to the LRV1-1 sequence) using the Bayesian method with the GTR + G + I model. New LRV1 sequences generated in this study are in boldface. Sequence identifiers include the strain ID and the NCBI accession number. The major clades representing the different LRV1 genotypes identified (A–F) are labeled. Posterior probabilities of the Bayesian analysis (>80%) are shown next to each node. The scale bar indicates nucleotide sequence divergence among sequences.  
(PDF)

**S2 Fig. Phylogenetic analysis of partial 5'UTR sequences (alignment of 219 nucleotides).** The tree was inferred using the Bayesian method with the GTR + G model. Novel sequences generated in this study are shown in bold. Sequence identifiers include the strain ID and the NCBI accession number. The major clades representing the different LRV1 genotypes identified (A–F) are labeled. Posterior probabilities of the Bayesian analysis (>80%) are shown next to each node. The scale bar indicates nucleotide sequence divergence among sequences.  
(PDF)

**S3 Fig. Phylogenetic analysis of partial 5'UTR—*capsid* gene sequences (alignment of 719 nucleotides corresponding to LRV1s/LRV2as PCR products excluding primers).** The tree was inferred using the Bayesian method with the GTR + G + I model. New LRV1 sequences generated in this study are in boldface. Sequence identifiers include the strain ID and the NCBI accession number. The major clades representing the different LRV1 genotypes identified (A–F) are labeled. Posterior probabilities of the Bayesian analysis (>80%) are shown next to each node. The scale bar indicates nucleotide sequence divergence among sequences.  
(PDF)

**S4 Fig. Phylogenetic analysis of partial *RdRp* gene sequences (alignment of 865 nucleotides corresponding to LRV3s/LRV4as PCR products excluding primers).** The tree was inferred using the Bayesian method with the T92 + G + I model. New LRV1 sequences generated in this study are in boldface. Sequence identifiers include the strain ID and the NCBI accession number. The major clades representing the different LRV1 genotypes identified (A–F) are labeled. Posterior probabilities of the Bayesian analysis (>80%) are shown next to each node. The scale bar indicates nucleotide sequence divergence among sequences.  
(PDF)

## Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Magali Tichit (Plate-forme Génomique, Institut Pasteur) for her technical assistance.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Eliane Bourreau, Ghislaine Prevot, Vincent Lacoste.

**Formal analysis:** Sourakhata Tirera, Ignacio S. Caballero, Christiane Bouchier, Anne Lavergne, Vincent Lacoste.

**Funding acquisition:** Eliane Bourreau, Ghislaine Prevot, Vincent Lacoste.

**Investigation:** Sourakhata Tirera, Marine Ginouves, Damien Donato, Ignacio S. Caballero, Eliane Bourreau, Emilie Mosnier, Vincent Vantilcke, Pierre Couppié, Ghislaine Prevot, Vincent Lacoste.

**Methodology:** Sourakhata Tirera, Damien Donato, Ignacio S. Caballero, Christiane Bouchier, Anne Lavergne, Vincent Lacoste.

**Project administration:** Ghislaine Prevot, Vincent Lacoste.

**Resources:** Sourakhata Tirera, Marine Ginouves, Ignacio S. Caballero, Christiane Bouchier, Anne Lavergne, Eliane Bourreau, Emilie Mosnier, Vincent Vantilcke, Pierre Couppié, Ghislaine Prevot, Vincent Lacoste.

**Supervision:** Vincent Lacoste.

**Validation:** Sourakhata Tirera, Damien Donato, Ignacio S. Caballero, Vincent Lacoste.

**Visualization:** Anne Lavergne, Vincent Lacoste.

**Writing – original draft:** Sourakhata Tirera, Vincent Lacoste.

**Writing – review & editing:** Sourakhata Tirera, Marine Ginouves, Damien Donato, Ignacio S. Caballero, Christiane Bouchier, Anne Lavergne, Eliane Bourreau, Emilie Mosnier, Vincent Vantilcke, Pierre Couppié, Ghislaine Prevot, Vincent Lacoste.

## References

1. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*. 2012; 7(5):e35671. Pubmed Central PMCID: 3365071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671> PMID: 22693548.
2. David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic therapy*. 2009 Nov-Dec; 22(6):491–502. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x> PMID: 19889134.
3. Tarr PI, Aline RF Jr., Smiley BL, Scholler J, Keithly J, Stuart K. LR1: a candidate RNA virus of Leishmania. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988 Dec; 85(24):9572–5. PMID: 3200841. Pubmed Central PMCID: 282800.
4. Wang AL, Wang CC. Discovery of a specific double-stranded RNA virus in *Giardia lamblia*. *Molecular and biochemical parasitology*. 1986 Dec; 21(3):269–76. PMID: 3807947.
5. Wang AL, Wang CC. The double-stranded RNA in *Trichomonas vaginalis* may originate from virus-like particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986 Oct; 83(20):7956–60. PMID: 3489942. Pubmed Central PMCID: 386843.
6. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. 1990 Oct 5; 215(3):403–10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2) PMID: 2231712.
7. Revets H, Dekegel D, Deleersnijder W, De Jonckheere J, Peeters J, Leysen E, et al. Identification of virus-like particles in *Eimeria stiedae*. *Molecular and biochemical parasitology*. 1989 Oct; 36(3):209–15. PMID: 2797059.
8. Widmer G, Comeau AM, Furlong DB, Wirth DF, Patterson JL. Characterization of a RNA virus from the parasite *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989 Aug; 86(15):5979–82. PMID: 2762308. Pubmed Central PMCID: 297755.
9. Wang AL, Wang CC. Viruses of parasitic protozoa. *Parasitology today*. 1991 Apr; 7(4):76–80. PMID: 15463448.
10. Stuart KD, Weeks R, Guilbride L, Myler PJ. Molecular organization of *Leishmania* RNA virus 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992 Sep 15; 89(18):8596–600. PMID: 1382295. Pubmed Central PMCID: 49967.
11. Maga JA, Widmer G, LeBowitz JH. *Leishmania* RNA virus 1-mediated cap-independent translation. *Molecular and cellular biology*. 1995 Sep; 15(9):4884–9. PMID: 7651407. Pubmed Central PMCID: 230734.
12. Scheffter S, Widmer G, Patterson JL. Complete sequence of *Leishmania* RNA virus 1–4 and identification of conserved sequences. *Virology*. 1994 Mar; 199(2):479–83. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1149> PMID: 8122377.

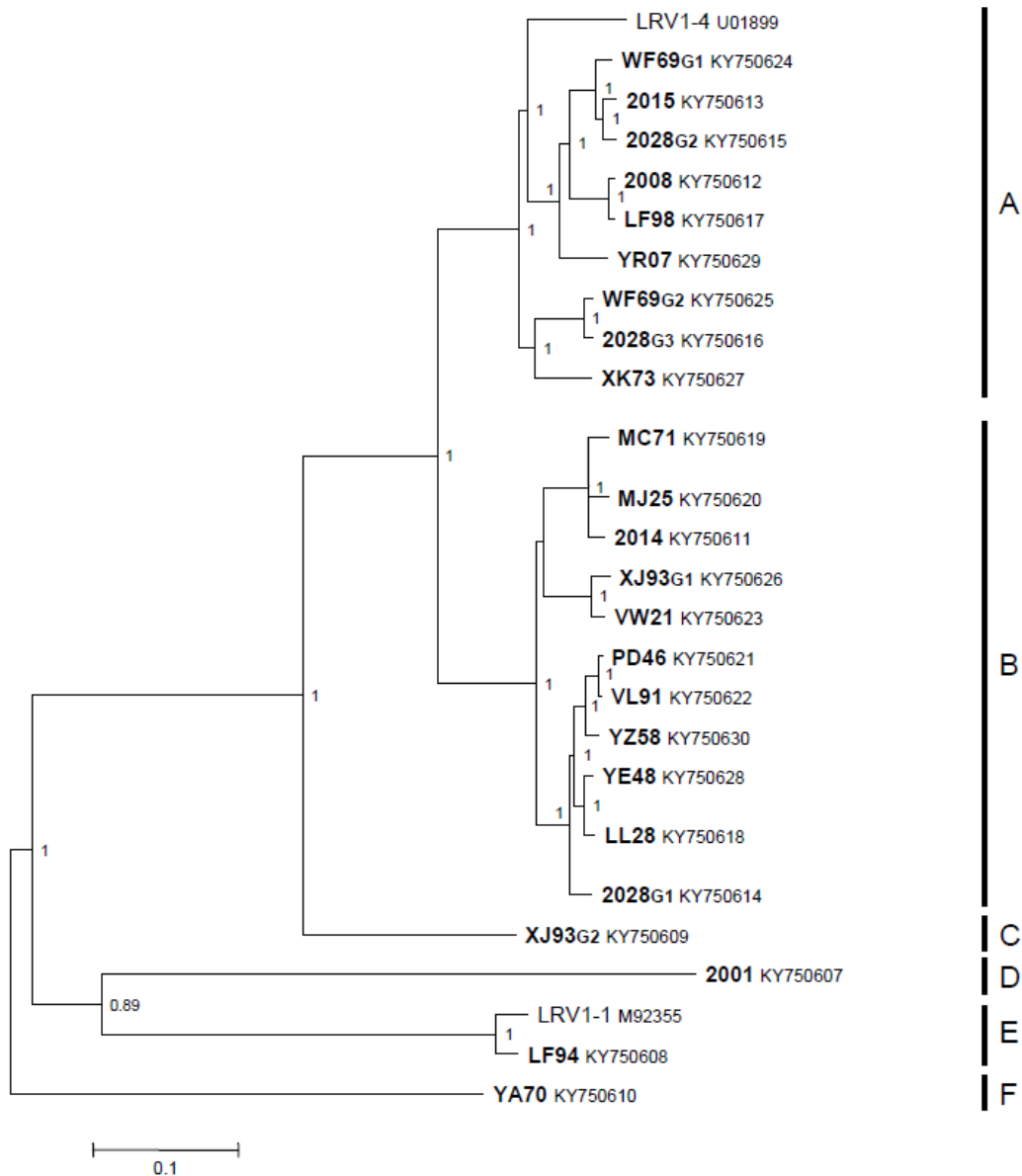
13. MacBeth KJ, Patterson JL. Single-site cleavage in the 5'-untranslated region of Leishmanivirus RNA is mediated by the viral capsid protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995 Sep 12; 92(19):8994–8. PMID: 7568059. Pubmed Central PMCID: 41094.
14. MacBeth KJ, Patterson JL. The short transcript of Leishmania RNA virus is generated by RNA cleavage. *Journal of virology*. 1995 Jun; 69(6):3458–64. PMID: 7745692. Pubmed Central PMCID: 189058.
15. Ro YT, Patterson JL. Identification of the minimal essential RNA sequences responsible for site-specific targeting of the Leishmania RNA virus 1–4 capsid endoribonuclease. *Journal of virology*. 2000 Jan; 74(1):130–8. PMID: 10590099. Pubmed Central PMCID: 111521.
16. Molyneux DH. Virus-like particles in Leishmania parasites. *Nature*. 1974 Jun 7; 249(457):588–9. PMID: 4834085.
17. Cadd TL, Keenan MC, Patterson JL. Detection of Leishmania RNA virus 1 proteins. *Journal of virology*. 1993 Sep; 67(9):5647–50. PMID: 8350417. Pubmed Central PMCID: 237969.
18. Salinas G, Zamora M, Stuart K, Saravia N. Leishmania RNA viruses in Leishmania of the Viannia subgenus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1996 Apr; 54(4):425–9. PMID: 8615459.
19. Saiz M, Llanos-Cuentas A, Echevarria J, Roncal N, Cruz M, Muniz MT, et al. Short report: detection of Leishmanivirus in human biopsy samples of leishmaniasis from Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1998 Feb; 58(2):192–4. PMID: 9502603.
20. Guilbride L, Myler PJ, Stuart K. Distribution and sequence divergence of LRV1 viruses among different Leishmania species. *Molecular and biochemical parasitology*. 1992 Aug; 54(1):101–4. PMID: 1518522.
21. Ginouves M, Simon S, Bourreau E, Lacoste V, Ronet C, Couppie P, et al. Prevalence and Distribution of Leishmania RNA Virus 1 in Leishmania Parasites from French Guiana. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2016 Jan 6; 94(1):102–6. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0419> PMID: 26598572.
22. Ogg MM, Carrion R Jr., Botelho AC, Mayrink W, Correa-Oliveira R, Patterson JL. Short report: quantification of leishmanivirus RNA in clinical samples and its possible role in pathogenesis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2003 Sep; 69(3):309–13. PMID: 14628949.
23. Zangger H, Hailu A, Desponds C, Lye LF, Akopyants NS, Dobson DE, et al. Leishmania aethiopia field isolates bearing an endosymbiotic dsRNA virus induce pro-inflammatory cytokine response. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014 Apr; 8(4):e2836. Pubmed Central PMCID: 3998932. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002836> PMID: 24762979.
24. Hajjaran H, Mahdi M, Mohebbi M, Samimi-Rad K, Ataei-Pirkooch A, Kazemi-Rad E, et al. Detection and molecular identification of leishmania RNA virus (LRV) in Iranian Leishmania species. *Archives of virology*. 2016 Sep 7. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3044-z> PMID: 27604119.
25. Widmer G, Dooley S. Phylogenetic analysis of Leishmania RNA virus and Leishmania suggests ancient virus-parasite association. *Nucleic acids research*. 1995 Jun 25; 23(12):2300–4. PMID: 7610059. Pubmed Central PMCID: 307021.
26. Cantanhede LM, da Silva Junior CF, Ito MM, Felipin KP, Nicolette R, Salcedo JM, et al. Further Evidence of an Association between the Presence of Leishmania RNA Virus 1 and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015 Sep; 9(9):e0004079. Pubmed Central PMCID: 4570810. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004079> PMID: 26372217.
27. Scheffter SM, Ro YT, Chung IK, Patterson JL. The complete sequence of Leishmania RNA virus LRV2-1, a virus of an Old World parasite strain. *Virology*. 1995 Sep 10; 212(1):84–90. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1456> PMID: 7676652.
28. Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, et al. Leishmania RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science*. 2011 Feb 11; 331(6018):775–8. Pubmed Central PMCID: 3253482. <https://doi.org/10.1126/science.1199326> PMID: 21311023.
29. Adai V, Lye LF, Akopyants NS, Zimic M, Llanos-Cuentas A, Garcia L, et al. Association of the Endobiont Double-Stranded RNA Virus LRV1 With Treatment Failure for Human Leishmaniasis Caused by Leishmania braziliensis in Peru and Bolivia. *The Journal of infectious diseases*. 2016 Jan 1; 213(1):112–21. Pubmed Central PMCID: 4676543. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv354> PMID: 26123565.
30. Bourreau E, Ginouves M, Prevot G, Hartley MA, Gangneux JP, Robert-Gangneux F, et al. Presence of Leishmania RNA Virus 1 in Leishmania guyanensis Increases the Risk of First-Line Treatment Failure and Symptomatic Relapse. *The Journal of infectious diseases*. 2016 Jan 1; 213(1):105–11. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv355> PMID: 26123564.
31. Pereira Lde O, Maretti-Mira AC, Rodrigues KM, Lima RB, Oliveira-Neto MP, Cupolillo E, et al. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with Leishmania RNA virus 1 infection in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013 Aug; 108(5):665–7. Pubmed Central PMCID: 3970596. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108052013021> PMID: 23903986.

32. Ito MM, Catanhede LM, Katsuragawa TH, da Silva Junior CF, Camargo LM, Mattos Rde G, et al. Correlation between presence of *Leishmania RNA virus 1* and clinical characteristics of nasal mucosal leishmaniasis. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. 2015 Sep-Oct; 81(5):533–40. <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2015.07.014> PMID: 26277588.
33. Simon S, Nacher M, Carme B, Basurko C, Roger A, Adenis A, et al. Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: revising epidemiology with PCR-RFLP. *Trop Med Health*. 2017; 45:5. Epub 2017 Feb 28. <https://doi.org/10.1186/s41182-017-0045-x> PMID: 28265182
34. Rotureau B, Ravel C, Nacher M, Couppie P, Curtet I, Dedet JP, et al. Molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) guyanensis* in French Guiana. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Feb; 44(2):468–73. Pubmed Central PMCID: 1392701. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.2.468-473.2006> PMID: 16455900.
35. Rotureau B, Ravel C, Couppie P, Pratloug F, Nacher M, Dedet JP, et al. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Feb; 44(2):459–67. Pubmed Central PMCID: 1392689. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.2.459-467.2006> PMID: 16455899.
36. Simon S, Veron V, Carme B. *Leishmania* spp. identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis and its applications in French Guiana. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2010 Feb; 66(2):175–80. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.08.013> PMID: 19782495.
37. Aronesty E. ea-utils: "Command-line tools for processing biological sequencing data" 2011. Available from: <http://code.google.com/p/ea-utils>.
38. Schmieder R, Edwards R. Fast identification and removal of sequence contamination from genomic and metagenomic datasets. *PloS one*. 2011; 6(3):e17288. Pubmed Central PMCID: 3052304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017288> PMID: 21408061.
39. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology*. 2012 May; 19(5):455–77. Pubmed Central PMCID: 3342519. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021> PMID: 22506599.
40. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv:1303.3997v2 [q-bio.GN] ed2013.
41. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*. 2013 Apr; 30(4):772–80. Pubmed Central PMCID: 3603318. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010> PMID: 23329690.
42. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*. 2011 Oct; 28(10):2731–9. Pubmed Central PMCID: 3203626. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121> PMID: 21546353.
43. Nylander JAA. MrModeltest v2. 2004.
44. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*. 2012 May; 61(3):539–42. Pubmed Central PMCID: 3329765. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029> PMID: 22357727.
45. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*. 2011 Apr 15; 27(8):1164–5. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr088> PMID: 21335321.
46. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AM, Carstens EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2014). *Archives of virology*. 2014 Oct; 159(10):2831–41. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2114-3> PMID: 24906522.
47. Zamora M, Guilbride L, Sacks L, Stuart K. Phylogenetic analysis of the 5' subterminal region of isolates of *Leishmania RNA virus-1*. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 2000 Mar; 94(2):123–33. PMID: 10827867.
48. Macedo DH, Menezes-Neto A, Rugani JM, Rocha AC, Silva SO, Melo MN, et al. Low frequency of LRV1 in *Leishmania braziliensis* strains isolated from typical and atypical lesions in the State of Minas Gerais, Brazil. *Molecular and biochemical parasitology*. 2016 Aug 18. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.08.005> PMID: 27546549.
49. Lye LF, Owens K, Shi H, Murta SM, Vieira AC, Turco SJ, et al. Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. *PLoS pathogens*. 2010; 6(10):e1001161. Pubmed Central PMCID: 2965760. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001161> PMID: 21060810.

50. Zanger H, Ronet C, Desponds C, Kuhlmann FM, Robinson J, Hartley MA, et al. Detection of Leishmania RNA virus in Leishmania parasites. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013; 7(1):e2006. Pubmed Central PMCID: 3542153. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002006> PMID: 23326619.

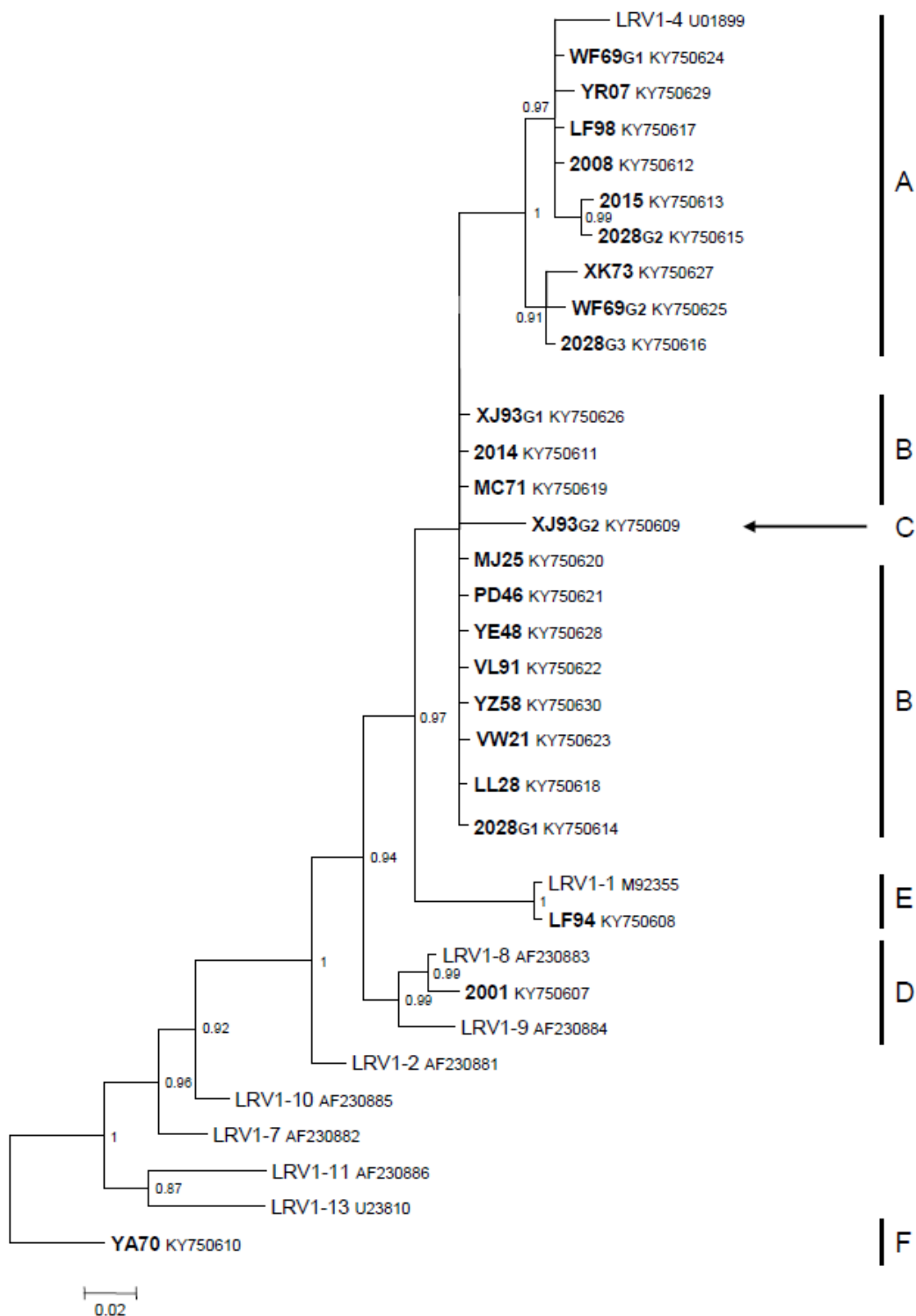


Données supplémentaires :



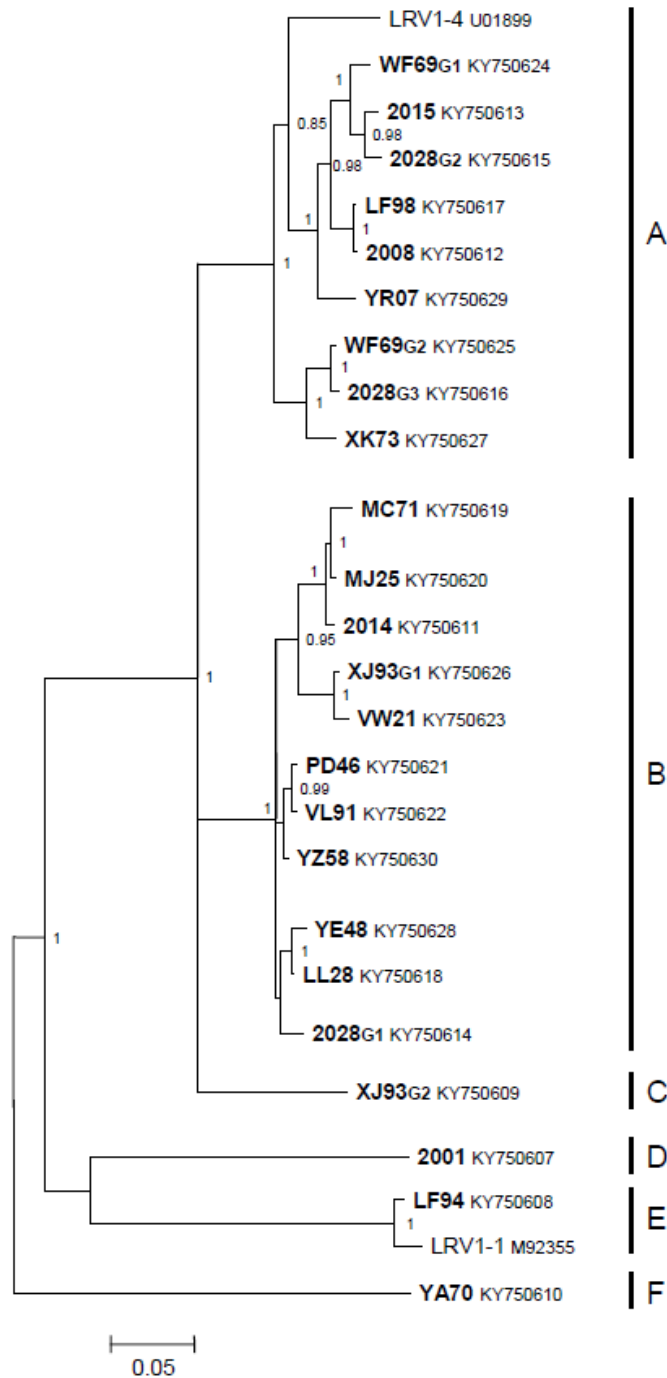
**Fig S1: Phylogenetic analysis of Leishmania RNA virus 1 isolates based on the almost complete genome sequences.**

The phylogenetic trees were inferred from the almost complete nucleotide sequences (nucleotides 60–5248 relative to the LRV1-1 sequence) using the Bayesian method with the GTR + G + I model. New LRV1 sequences generated in this study are in boldface. Sequence identifiers include the strain ID and the NCBI accession number. The major clades representing the different LRV1 genotypes identified (A–F) are labeled. Posterior probabilities of the Bayesian analysis (>80%) are shown next to each node. The scale bar indicates nucleotide sequence divergence among sequences.



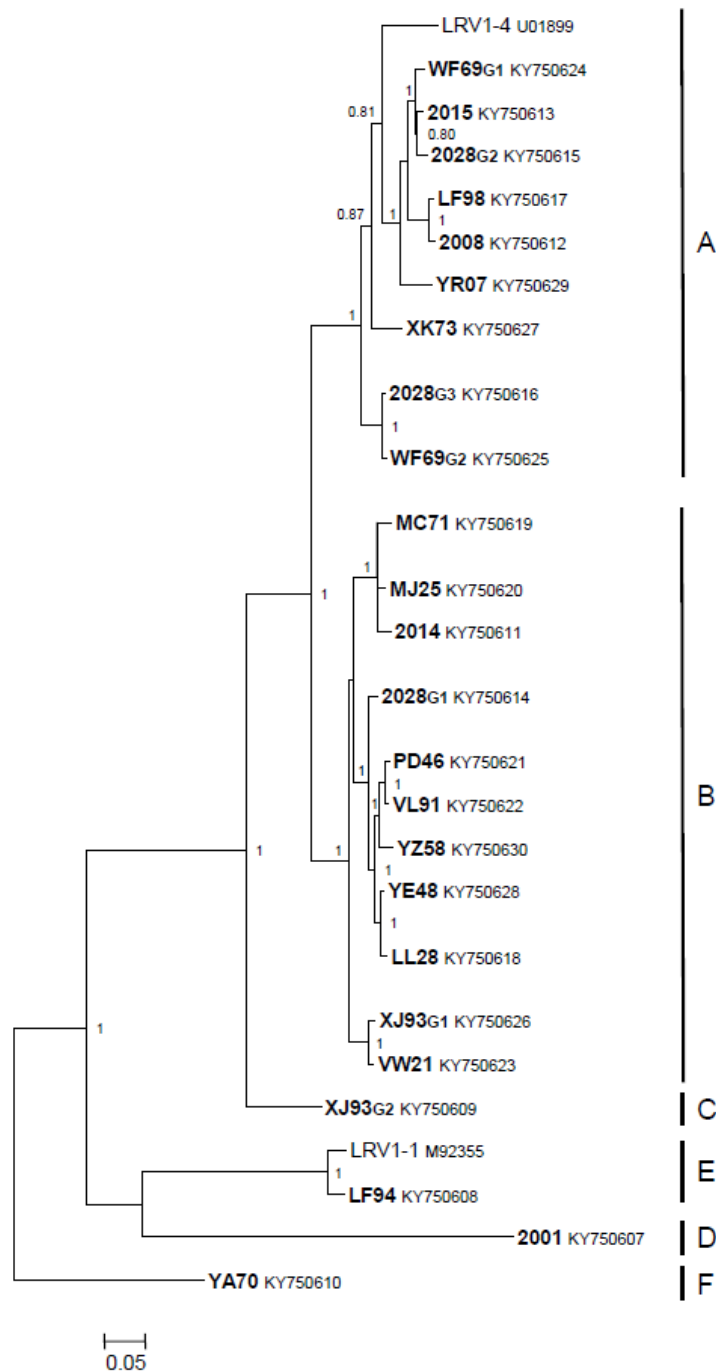
**Fig S2: Phylogenetic analysis of partial 5'UTR sequences (alignment of 219 nucleotides).**

The tree was inferred using the Bayesian method with the GTR + G model. Novel sequences generated in this study are shown in bold. Sequence identifiers include the strain ID and the NCBI accession number. The major clades representing the different LRV1 genotypes identified (A–F) are labeled. Posterior probabilities of the Bayesian analysis (>80%) are shown next to each node. The scale bar indicates nucleotide sequence divergence among sequences.



**Fig S3: Phylogenetic analysis of partial 5'UTR—capsid gene sequences (alignment of 719 nucleotides corresponding to LRV1s/LRV2as PCR products excluding primers).**

The tree was inferred using the Bayesian method with the GTR + G + I model. New LRV1 sequences generated in this study are in boldface. Sequence identifiers include the strain ID and the NCBI accession number. The major clades representing the different LRV1 genotypes identified (A–F) are labeled. Posterior probabilities of the Bayesian analysis (>80%) are shown next to each node. The scale bar indicates nucleotide sequence divergence among sequences.



**Fig S4: Phylogenetic analysis of partial RdRp gene sequences (alignment of 865 nucleotides corresponding to LRV3s/LRV4as PCR products excluding primers).**

The tree was inferred using the Bayesian method with the T92 +G + I model. New LRV1 sequences generated in this study are in boldface. Sequence identifiers include the strain ID and the NCBI accession number. The major clades representing the different LRV1 genotypes identified (A–F) are labeled. Posterior probabilities of the Bayesian analysis (>80%) are shown next to each node. The scale bar indicates nucleotide sequence divergence among sequences.

## AXE 2 :

# SENSIBILITE *IN VITRO* DES *LEISHMANIA* INFECTEES PAR LE LRV

---

Les travaux présentés dans cet axe visent à déterminer l'impact du LRV sur la sensibilité *in vitro* des parasites à différents médicaments (l'axe suivant abordera l'influence du LRV dans la réponse aux traitements *in vivo*, chez les patients).

En effet, certaines études indiquent que la présence de virus de parasites peut influencer la sensibilité *in vitro* de ces parasites aux médicaments. Cela a été rapporté pour le parasite *Trichomonas vaginalis*, pour lequel la présence de TVV entraîne une sensibilité des parasites au métronidazole *in vitro* (cf. 2.1). Néanmoins, l'impact du TVV dans la sensibilité des parasites au métronidazole chez les patients n'a pas été évalué.

Ainsi, la première étape de ce travail a consisté à déterminer le niveau général de sensibilité *in vitro* des *Leishmania* circulant en Guyane à différents médicaments pouvant être utilisés dans le traitement des leishmanioses. Pour cela, les tests de viabilité des *Leishmania* disponibles dans la littérature scientifique n'étant pas adaptés à l'espèce *Leishmania guyanensis*, une mise au point du test a été effectuée. Le détail de cette technique est présenté dans la publication n°3.

### **Publication n°3 : Mise au point d'un test de viabilité cellulaire adapté à *L. guyanensis***

**Comparison of tetrazolium salt assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp.** Ginouves M, Carme B, Couppie P, Prevot G. J Clin Microbiol. 2014 Jun;52(6):2131-8. doi : 10.1128/JCM.00201-14. Epub 2014 Apr 9.

De nombreux tests de viabilité cellulaire simples et accessibles sont disponibles dans la littérature scientifique, telles que les méthodes colorimétriques, dont le test de tétrazolium en micro-culture (microculture tetrazolium assay - MTA). Ce test est basé sur la métabolisation de sels de tétrazolium par des cellules via leurs enzymes mitochondriales, conduisant à la formation d'un produit coloré, le formazan. C'est la présence de cette coloration, pouvant être dosée, qui témoigne de la viabilité des cellules en culture.

Seulement, d'après nos résultats, le métabolisme des *Leishmania* semble varier d'une espèce à l'autre, ne permettant pas l'utilisation efficace de certains sels de tétrazolium dans les tests de viabilité, notamment en ce qui concerne l'espèce *L. guyanensis*. Ainsi, l'efficacité de plusieurs sels de tétrazolium a été évaluée pour l'espèce *L. guyanensis* et, parallèlement, pour *L. amazonensis* qui présente une meilleure métabolisation du MTT.

Les sels testés étaient le 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), le 2,3 bis (2 methoxy 4 nitro 5 sulfophenyl) 2H-tetrazolium 5 carboxanilide (XTT) et une molécule de tétrazolium n'ayant pas été testée auparavant chez les *Leishmania*, le 2-(2-methoxy- 4-nitrophenyl)- 3-(4-nitrophenyl)- 5-(2, 4-disulfophenyl)- 2H tetrazolium (WST-8). Les tests ont été effectués sur la forme promastigote des parasites. Le sel de tétrazolium présentant la meilleure efficacité a ensuite été testé avec d'autres espèces de parasites, à savoir *L. braziliensis* et *L. donovani*.

Les résultats obtenus montrent que le MTT et le XTT ne sont pas adaptés à l'espèce *L. guyanensis* et ne permettent pas d'obtenir des résultats satisfaisants. En effet, le niveau de coloration issu de la métabolisation du MTT et du XTT était très bas, parfois en dessous du seuil de détection, ne permettant pas d'évaluer la viabilité parasitaire. En revanche, le métabolisme de *L. amazonensis*, qui semble être différent de celui de *L. guyanensis*, indique une meilleure dégradation du XTT et par conséquent une coloration plus intense. Parmi les 3 sels de tétrazolium testés, le WST-8 permet d'obtenir le niveau de coloration le plus élevé avec les 2 espèces testées, *L. guyanensis* et *L. amazonensis*, et permet de distinguer plus finement l'évolution de la croissance cellulaire de *L. guyanensis*, contrairement au MTT et au XTT. L'efficacité du WST-8 est également satisfaisante lorsqu'il est utilisé en présence des autres espèces de *Leishmania*, telles que *L. braziliensis* et *L. donovani*.

La compatibilité du test au WST-8 avec la présence de médicaments ou d'extraits de plantes dans le milieu de culture a été évaluée sur les parasites *L. guyanensis*. L'absence d'interférence entre le WST-8 et ces différents composés indique que ce sel de tétrazolium peut être utilisé pour réaliser des tests de sensibilité des *Leishmania* en présence de ces composés.

# Comparison of Tetrazolium Salt Assays for Evaluation of Drug Activity against *Leishmania* spp.

Marine Ginouves,<sup>a</sup> Bernard Carme,<sup>a,b</sup> Pierre Couppie,<sup>a,c</sup> Ghislaine Prevot<sup>a</sup>

Université des Antilles et de la Guyane, Laboratoire d'Épidémiologie des Parasitoses Tropicales EA 3593, Labex CEBA UFR de Médecine, Cayenne, French Guiana<sup>a</sup>; Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie et Mycologie, Centre Hospitalier de Cayenne, Cayenne, French Guiana<sup>b</sup>; Service de Dermatologie, Centre Hospitalier de Cayenne, Cayenne, French Guiana<sup>c</sup>

**In French Guiana, leishmaniasis is an essentially cutaneous infection. It constitutes a major public health problem, with a real incidence of 0.2 to 0.3%. *Leishmania guyanensis* is the causal species most frequently encountered in French Guiana. The treatment of leishmaniasis is essentially drug based, but the therapeutic compounds available have major side effects (e.g., liver damage and diabetes) and must be administered parenterally or are costly. The efficacy of some of these agents has declined due to the emergence of resistance in certain strains of *Leishmania*. There is currently no vaccine against leishmaniasis, and it is therefore both necessary and urgent to identify new compounds effective against *Leishmania*. The search for new drugs requires effective tests for evaluations of the leishmanicidal activity of a particular molecule or extract. Microculture tetrazolium assays (MTAs) are colorimetric tests based on the use of tetrazolium salts. We compared the efficacies of three tetrazolium salts—3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT), and 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST-8)—for quantification of the promastigotes of various species of *Leishmania*. We found that the capacity of *Leishmania* to metabolize a tetrazolium salt depended on the salt used and the species of *Leishmania*. WST-8 was the tetrazolium salt best metabolized by *L. guyanensis* and gave the best sensitivity.**

Leishmaniasis is a disease caused by a protozoan of the genus *Leishmania*, belonging to the family *Trypanosomatidae*. The disease may take several forms—cutaneous, visceral, or mucocutaneous—depending on the species of *Leishmania* involved and the immune status of the host. Leishmaniasis is a zoonosis affecting many mammals, including humans, and it is transmitted by insect vectors: sandflies (Psychodidae: Phlebotominae). Leishmaniasis is a public health problem in tropical countries, with more than 2 million new cases each year (1). It is treated essentially with parasitocidal drugs. Several therapeutic compounds are available (e.g., antimony derivatives and pentamidine), but they may have major adverse effects (such as liver damage and diabetes) and may require parenteral administration or are too costly to be readily available in certain countries. The oldest of the compounds used are antimony derivatives, which were released onto the market in the 1930s but have since decreased in efficacy due to the emergence of resistance in certain strains of *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* (2, 3). The other most widely used compounds are pentamidine and amphotericin B. In the first decade of this century, a new compound, miltefosine, was released onto the market. It can be administered orally, a key advantage, but its use is not authorized in all countries.

There is currently no vaccine against leishmaniasis. It is therefore both necessary and urgent to identify new compounds active against *Leishmania*. The search for such compounds requires an *in vitro* test for the reliable evaluation of their effects on the viability and proliferation of *Leishmania*.

Cell counts can be carried out by simple and readily accessible techniques, such as direct counting under the microscope, or by much more sophisticated and costly techniques, such as flow cytometry. The reliability of a test depends on both the method used and the cell type used, or even the stages or species considered, which must be defined in advance. *Leishmania* can be cultured in

its mobile promastigote form or as amastigotes, either resident within macrophages or axenic. Infected macrophages more closely resemble the situation in humans, but the use of promastigotes is more widespread in tests of the activity of molecules or complex extracts due to the ease with which these cells can be cultured *in vitro*.

Direct counting under the microscope, which is still used in some laboratories, is a particularly straightforward technique. However, the mobility of the promastigotes and the presence of rosettes may complicate the task, and although the cells can be immobilized with glutaraldehyde, this method is not suitable for the simultaneous counting of cells in multiple samples; the cells counted include dead cells, and the bias resulting from the presence of rosettes remains. This fastidious and time-consuming technique is not very suitable for precise evaluations of leishmanicidal activity. Methods based on the incorporation into DNA of radiolabeled markers, such as tritiated uracil ([<sup>3</sup>H]uracil [4]) or tritiated thymidine ([<sup>3</sup>H]thymidine [5]) are rapid and simple and facilitate large-scale analyses of samples. The assimilation of this radioactive isotope into the DNA during its synthesis makes it possible to follow cell proliferation, since there is a linear correlation between the radiation emitted and cell multiplication. The major disadvantages of this technique are the need to manipulate

Received 24 January 2014 Returned for modification 14 February 2014

Accepted 7 April 2014

Published ahead of print 9 April 2014

Editor: P. H. Gilligan

Address correspondence to Ghislaine Prevot, fac.prevot@gmail.com.

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

doi:10.1128/JCM.00201-14

radioactive compounds, for which accreditation is required, and the production of radioactive waste, the elimination of which remains problematic. In addition, the incorporation of these radioactive isotopes into cells during division may lead to DNA damage, cell cycle arrest, and cell apoptosis, with erroneous results. The replacement of radioactive isotopes with stable isotopes is possible but requires a mass spectrophotometer (6), an item of equipment not available in all laboratories. Flow cytometry (7, 8) can provide a quantification of the number of cells that is so precise that it is possible to determine the absolute number of cells per unit volume of culture, for cell densities from 100 cells/ml to  $1 \times 10^6$  cells/ml, in a highly reproducible manner (9). However, the excessively high cost of this technique in terms of materials and reagents constitutes a major barrier to the widespread adoption of this technique. Other similar but less cumbersome devices that are practical and simple to use, such as automatic portable or bench cell counters, are accessible, but costs of consumables remain excessive.

As attested by many publications, the technique of choice remains colorimetric determination, which is cheap, effective, simple, and rapid. A wide selection of reagents is available, including resazurin-3*H*-phenoxazin-3-one 10-oxide (AlamarBlue), a blue molecule that is reduced by the dehydrogenase activity of mitochondria to give rise to a pink molecule, resorufin (7-hydroxy-3*H*-phenoxazin-3-one), which can be quantified by spectrophotometry. This technique provides results similar to those obtained by tritiated thymidine incorporation (10). However, it has been reported (11) that the reduction of resazurin by the mitochondrial enzymes of *Leishmania* is much slower than that observed in other cell types (*Trypanosoma* and mammalian cells). Indeed, *Leishmania* must be cultured at a temperature of about 27°C, whereas *Trypanosoma* and mammalian cells can be cultured at 37°C, which is the optimal temperature for resazurin reduction. The reaction rate is thus much lower in *Leishmania*, resulting in much lower absorbance values for similar incubation times (11).

Microculture tetrazolium assays (MTAs) are colorimetric tests based on the use of tetrazolium salts, including 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfonyl)-2*H*-tetrazolium (MTS), 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfonyl)-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT), (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfonyl)-2*H*-tetrazolium (WST-1), 2-(4-iodophenyl)-3-(2,4-dinitrophenyl)-5-(2,4-disulfonyl)-2*H*-tetrazolium (WST-3), and 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfonyl)-2*H*-tetrazolium (WST-8). These methods are based on the cleavage of a tetrazolium salt by a mitochondrial enzyme, succinate dehydrogenase, leading to the formation of a colored product, formazan (12), which can be quantified by spectrophotometry. In practice, most of these tetrazolium salts have been found to be of variable efficacy for the quantification of *Leishmania* (13–17).

In this study, we compared the efficacies of three tests based on tetrazolium salts, MTT, XTT, and WST-8, for quantifying promastigotes of different strains of *Leishmania*. Then, the most suitable salt was used to evaluate the reliability of the test: in the presence of an ethanolic plant extract, *Lantana camara*, and a drug used as first-line treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana, pentamidine.

## MATERIALS AND METHODS

**Parasites and cultures.** Tests were carried out on promastigotes from several strains of *Leishmania*: eight New-World strains of *Leishmania*, including two reference strains [*Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* MHOM/GF/97/LBC6 (LG-R) and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* MPRO/BR/72/M1845 (LA-R)] and six strains isolated from patients in French Guiana [*L. (V.) guyanensis* 12.01.13-2008 {LG-1}, *L. (V.) guyanensis* 04.04.13-2068 {LG-2}, *L. (V.) guyanensis* 01.03.13-2014 {LG-3}, *L. (V.) braziliensis* 09.10.12-2031 {LB-1}, *L. (V.) braziliensis* 24.05.12-2068 {LB-2}, and *L. (L.) amazonensis* 10.10.12-2048 {LA-1}], together with one Old-World strain [*Leishmania* (*L.*) *donovani* MHOM/IN/96/THAK72 {LD-R}]. The reference strains were obtained from the national reference center for leishmaniasis in Montpellier, France, and the other strains were kindly supplied by the parasitology and mycology laboratory of Cayenne University Hospital, French Guiana, with strict respect for patient anonymity.

The reference strains, which were stored in liquid nitrogen, were thawed and then cultured in 3 ml of RPMI 1640 (Gibco) containing L-glutamine, 20 mM HEPES, and phenol red and supplemented with 20% inactivated calf fetal serum (CFS) (Gibco), 50 IU/ml penicillin (Invitrogen), 0.05 mg/ml streptomycin (Invitrogen), and nonessential amino acids (Gibco) at 26°C.

The medium was changed when the cells reached stationary phase: the cultures were centrifuged for 5 min at  $514 \times g$  and the parasites were resuspended in 10 ml of RPMI 1640 medium (Gibco), containing glutamine but devoid of phenol red, to limit background noise (18), and supplemented with 10% inactivated CFS (Gibco), 50 IU/ml penicillin (Invitrogen), 0.05 mg/ml streptomycin (Invitrogen), and nonessential amino acids (Gibco). This medium is referred to as RPMIØRP medium. The cells were cultured at 26°C until they reached exponential growth phase.

**Parasite quantification.** All tests were carried out in a final volume of 100 µl in microtiter plates.

Exponentially growing *Leishmania* was counted directly in a hemocytometer. Serial dilutions of the culture were prepared, and 100 µl of each dilution was dispensed, in triplicate, in the wells of a 96-well plate to obtain the following final concentrations:  $1 \times 10^6$ ,  $0.5 \times 10^6$ ,  $0.25 \times 10^6$ ,  $0.125 \times 10^6$ ,  $0.0625 \times 10^6$ ,  $0.0312 \times 10^6$ ,  $0.0156 \times 10^6$ , and  $0.0078 \times 10^6$  parasites/well, for (i) direct counting in a hemocytometer, (ii) an MTT test, (iii) an XTT test, and (iv) a WST-8 test.

Phenol red increases background noise (18); the presence of other colored compounds (as drugs) might also modify absorbance or lead to interactions with tetrazolium salts (18). We therefore prepared replica plates for the following tests: (i) a test in which the parasites were centrifuged (series C) to allow the replacement of the culture medium and (ii) a test in which the parasites were not centrifuged (series NC).

The plates were incubated for 72 h at 26°C (14). The controls were blanks containing RPMIØRP medium with no parasites.

**Tetrazolium salt tests.** The cell viability tests were based on the manufacturer's recommendations and the method described by Dutta (14), with the following modifications: after 72 h of culture, the parasites were quantified either by the direct addition of tetrazolium salts to the parasite cultures for the NC series or after centrifuging the parasites for 5 min at  $514 \times g$  and medium replacement for the C series.

We added tetrazolium salts to the following concentrations: 10% for MTT, from a 5-mg/ml solution (Sigma); 20% for XTT, from a 1-mg/ml solution supplemented with 1% 5-methylphenazinium methyl sulfate (PMS) (Sigma); or 10% for WST-8, supplemented with 1-methoxy-PMS (Cell Counting kit 8; Sigma).

The plates were incubated for 3 h at 26°C. We then added 100 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO) to the wells containing MTT, and the plates were returned to the 26°C incubator for 1 h.

We determined absorbance at 570 nm for the MTT tests and at 450 nm for the XTT and WST-8 tests, using a Tristar LB941 spectrophotometer (Berthold Technologies). We eliminated the background noise by sub-



tracting the value of the blank (no parasites and no tetrazolium salts) from the values obtained in the tests.

**Counting in a hemocytometer.** The cells were counted directly, with or without prior centrifugation, in a hemocytometer. Counts were carried out in parallel for the three tetrazolium salt tests.

**Sensitivity tests.** The sensitivity tests were carried out with *L. guyanensis* isolate LG-2, obtained from a patient. When the parasites reached exponential growth phase, we added 90  $\mu$ l of culture, containing  $10^6$  parasites, to each well. We dispensed 10  $\mu$ l of various dilutions of pentamidine (Sigma) or of an extract in ethanol (70:30) of *Lantana camara* leaves into the test wells to obtain final concentrations of 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.015, 0.0078, and 0.0039  $\mu$ g/ml pentamidine, or 2,000, 1,000, 500, 250, 125, and 62.5  $\mu$ g/ml *Lantana camara* leaf extract. We added 10  $\mu$ l of RPMI $\alpha$ RP to the control wells. The tests were carried out in triplicate.

The blanks for the tests consisted of 90  $\mu$ l of RPMI $\alpha$ RP medium and 10  $\mu$ l of the various concentrations of pentamidine or plant extract. The blanks for the controls consisted of 100  $\mu$ l of RPMI $\alpha$ RP medium.

After incubation for 48 h at 26°C, we added 10% WST-8 supplemented with 1-methoxy-PMS to each well, including the blanks. The plate was incubated for a further 24 h. The results were read by spectrophotometry at 450 nm after 72 h (in total) of incubation in the presence of the drug or plant extract.

The absorbance values for the blanks were subtracted from the corresponding test absorbance values, and the percentage of inhibition was calculated as follows: % inhibition =  $[(A_{\text{control}} - A_{\text{test}})/A_{\text{control}}] \times 100$ .

The 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) was then calculated using the GraphPad Prism6 software program.

**Statistical analysis.** We calculated the standard deviation (SD) for each point using the software program Excel (ECARTYPEP function). The  $r$  coefficient of correlation value was determined using Excel to assess correlation between the parasite number and optical density (OD).

## RESULTS

The various colorimetric tests based on MTT, XTT, and WST-8 were compared using the reference strain *L. guyanensis* LG-R.

**Impact of centrifugation on quantification tests.** Direct counts of parasites were obtained in parallel, with a hemocytometer, to validate the colorimetric results. Parasite quantification tests were carried out at different cell densities, with and without centrifugation, to evaluate the potential impact of centrifugation on the results obtained (Fig. 1).

**Comparison of the 3 tetrazolium salt tests.** Direct counting of the parasites in a hemocytometer after 72 h of culture generated a linear growth curve (Fig. 1A), with a proportional relationship between the number of parasites used to inoculate the medium on day 0 (D0) and the number of parasites counted on D3. However, this linear relationship was observed at parasite densities exceeding  $1.25 \times 10^5$  parasites/well. We consider this density to be the threshold of detection for direct counting. Centrifugation did not seem to affect the results obtained. Indeed, the number of parasites was smaller in series C but remained proportional to that in series NC. Centrifugation led to a reproducible loss of cells, with a coefficient of about 2.5, in all wells.

An increase in the population by a factor of 10 after 72 h of culture was noted. We can therefore consider the number of parasites to be 10 times higher on D3 than on D0, and these values can be used to interpret the results of colorimetric tests.

Parasite quantification by colorimetric tests based on XTT (Fig. 1B) gave very low or even negative absorbance values, ranging from  $-0.121$  to  $-0.015$  for series C and from 0.105 to 0.230 for series NC. The values obtained in this test were too low to demonstrate any real differences in the numbers of cells present.

In contrast, parasite quantification with the MTT test (Fig. 1C)

gave higher absorbance values, ranging from 0.118 to 0.423 for series NC and from 0.129 to 0.311 for series C. The curves for the C and NC series were almost parallel, and the numbers of parasites before and after centrifugation may therefore be considered proportional.

The threshold of detection for parasites was  $2.5 \times 10^6$  parasites/well, the curve increasing after this point. The standard deviations for MTT tests were relatively high (data not shown).

Quantification in the WST-8 test (Fig. 1D) gave absorbance values well above those obtained in the other two colorimetric tests (MTT and XTT), with values ranging from 0.177 to 0.839 for series NC and from 0.143 to 0.679 for series C. The threshold for parasite detection was about  $0.625 \times 10^7$  parasites/well.

For series NC, each of the coefficients of correlation ( $r$ ) was calculated. Thus, direct counting yielded an  $r$  value of 0.99, the MTT test had an  $r$  value of 0.98, the WST-8 test had an  $r$  value of 0.98, and the XTT test had an  $r$  value of 0.82.

**Metabolization of tetrazolium salts by *L. guyanensis* and *L. amazonensis*.** We compared the metabolism of the various tetrazolium salts and the efficacies of these tests by omitting the 72 h of incubation after cell inoculation and the centrifugation step. The tetrazolium salts were added to the cultures directly after inoculation.

We evaluated the metabolism of the three tetrazolium salts after 4 h of incubation, using the reference strains *L. guyanensis* LG-R and *L. amazonensis* LA-R, at three concentrations:  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$ , and  $2.5 \times 10^5$  parasites/well. The results are presented as a histogram in Fig. 2. The absorbance values obtained in the MTT tests were very similar for the three densities of *L. amazonensis* LA-R ( $r = 0.80$ ) tested, whereas those for *L. guyanensis* LG-R ( $r = 0.82$ ) decreased with decreasing cell density.

For the XTT tests, the absorbance results obtained were consistent with the number of parasites for *L. amazonensis* LA-R ( $r = 0.98$ ), whereas for *L. guyanensis* LG-R ( $r = 0.89$ ), the absorbance values obtained were very low or zero.

The absorbance values obtained in WST-8 tests were higher than those for the other tests, particularly for *L. amazonensis* LA-R, which had an absorbance value of 0.630, versus 0.351 for the *L. guyanensis* LG-R strain, for a density of  $1 \times 10^6$  parasites/well. The absorbance values decreased proportionally with the number of cells for the *L. amazonensis* LA-R strain ( $r = 1$ ) and *L. guyanensis* LG-R ( $r = 0.98$ ).

The WST-8 test was the colorimetric test with the best coefficient of correlation ( $r$ ), the best sensitivity (Fig. 1D), and the best tetrazolium salt metabolism (Fig. 2).

**Metabolization of WST-8 by *Leishmania* spp.** We assessed the efficacy of the WST-8 test for quantifying the various strains of *Leishmania*, using strains *L. guyanensis* LG-R, *L. guyanensis* LG-1, *L. amazonensis* LA-R, *L. amazonensis* LA-1, *L. braziliensis* LB-1, *L. braziliensis* LB-2, and *L. donovani* LD-R at densities of  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$ , and  $2.5 \times 10^5$  parasites/well (Fig. 3). Absorbance depended on the strain tested, with  $A_{450}$  values ranging from 0.606 for *L. braziliensis* LB-2 to 1.05 for *L. amazonensis* LA-R for  $1 \times 10^6$  parasites/well. Some strains from different species gave similar absorbance values: for example, *L. amazonensis* LA-R ( $A_{450} = 0.738$ ) and *L. braziliensis* LB-1 ( $A_{450} = 0.723$ ) for  $5 \times 10^5$  parasites/well and *L. guyanensis* LG-R ( $A_{450} = 0.993$ ) and *L. donovani* LD-R ( $A_{450} = 0.992$ ) for  $1 \times 10^6$  parasites/well.

**Optimal incubation time for the WST-8 quantification test.** We determined the optimal incubation time for the WST-8 quan-

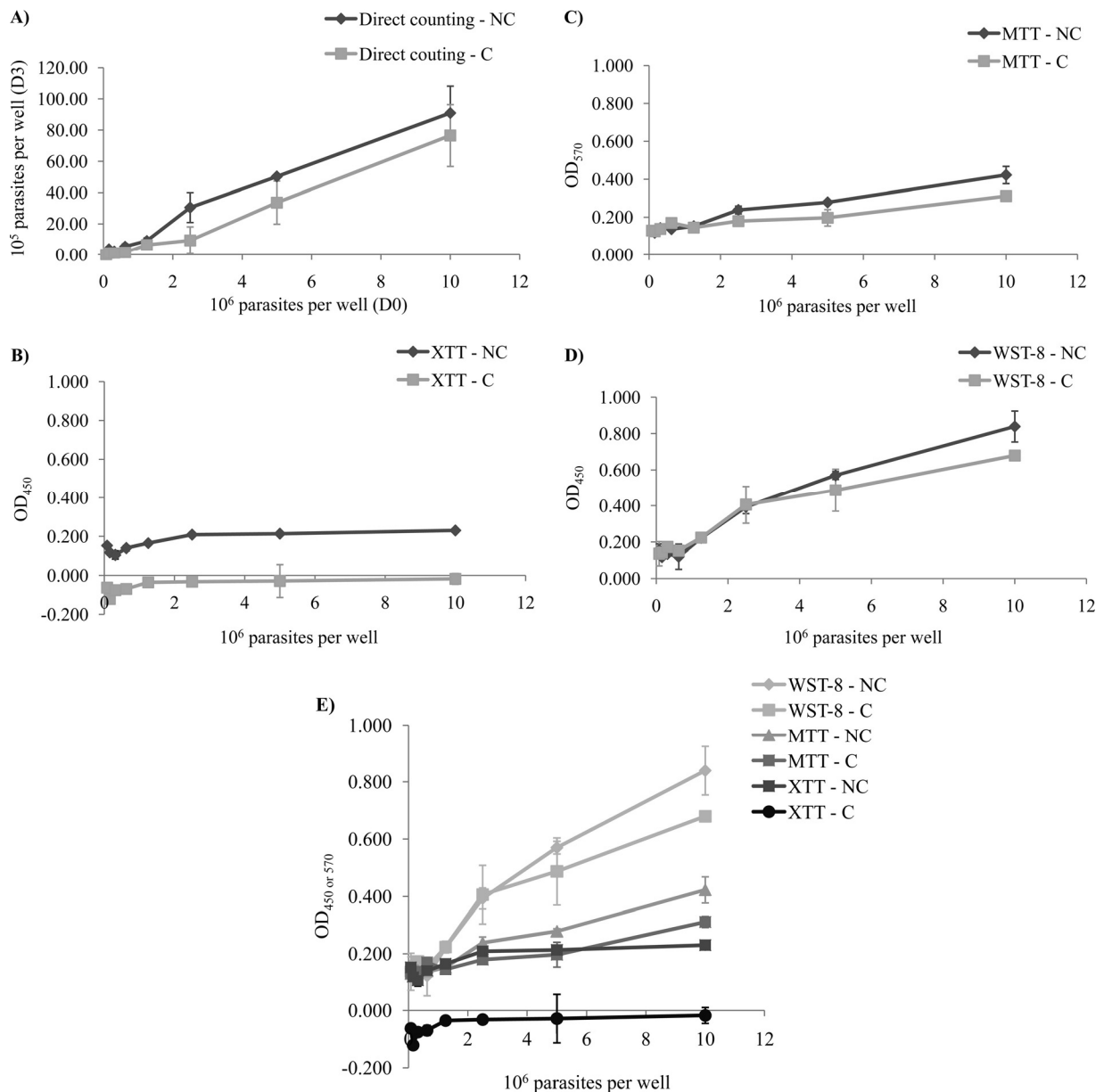


FIG 1 Quantification of *L. guyanensis* LEM 3319 parasites seeded at various concentrations ( $0$ ,  $0.0078 \times 10^6$ ,  $0.015 \times 10^6$ ,  $0.0312 \times 10^6$ ,  $0.0625 \times 10^6$ ,  $0.125 \times 10^6$ ,  $0.25 \times 10^6$ ,  $0.5 \times 10^6$ , and  $1 \times 10^6$  parasites/well) after 72 h of incubation, by direct counting in a hemocytometer (A) or colorimetric tests with XTT (B), MTT (C), or WST-8 (D). For each test, two series were carried out, one in which the parasites were centrifuged (series C) and another in which the parasites were not centrifuged (series NC). The results of the various colorimetric tests with tetrazolium salts were then compared (E). Absorbance was measured at 570 nm for MTT tests and at 450 nm for XTT and WST-8 tests.

tification test, with the patient isolate *L. guyanensis* LG-3, in the presence of various concentrations of amphotericin B (Fig. 4). Incubation for 4 h with WST-8 was not sufficient to obtain consistent results (Fig. 4) and yielded very low absorbance values due to cell death. Incubation with WST-8 for longer periods was therefore required, with 24 h identified as the most functional incubation time. However, incubation for 24 h in the presence of WST-8, after 72 h of cell culture in the presence of amphotericin B, gave a curve similar to that for incubation for 4 h in the presence of WST-8 and resulted in a total incubation time of 96 h rather than 72 h. For the performance of the test over a period of 72 h, we

recommend adding the WST-8 after 48 h of incubation with the drug or plant extract and then reading the absorbance 24 h later.

**Interaction between amphotericin B and WST-8.** We checked that the compounds tested did not interact with WST-8. Figure 5 shows the results obtained in the presence of amphotericin B. Similar curves were obtained for the absorbance measured in the presence or absence of WST-8.

**Sensitivity test of plant extracts and pentamidine.** The sensitivities of the patient isolate *L. guyanensis* LG-2 to various antimicrobial compounds was assessed as a function of the incubation time determined above. The results obtained in the presence of

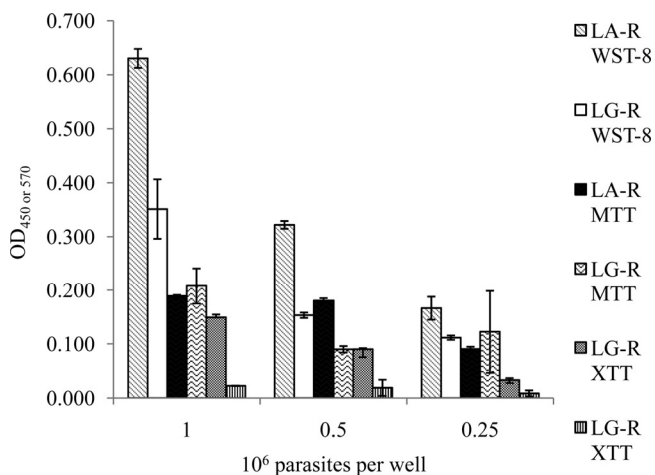


FIG 2 Comparison of the metabolism of different tetrazolium salts (XTT, MTT, and WST-8) by the LG-R and LA-R strains at densities of  $1 \times 10^6$ ,  $0.5 \times 10^6$ , and  $0.25 \times 10^6$  parasites/well.

pentamidine or an extract of *Lantana camara* leaves in ethanol are shown in Fig. 6A and B, respectively. The  $IC_{50}$ s obtained were  $0.018 \mu\text{g/ml}$  for pentamidine and  $86.81 \mu\text{g/ml}$  for *Lantana camara* leaf extract. Ethanol did not affect parasite growth (data not shown).

## DISCUSSION

Parasite quantification is a crucial step in proliferation and cytotoxicity tests. Simple, rapid, and effective tests are required, allowing the analysis of multiple samples.

Many cell quantification techniques are available, including colorimetric tests in particular. In this study, we compared three tetrazolium salt tests: those based on MTT, XTT, and WST-8. We chose to include the MTT test on the basis of its reputation, this test being the most widely used in cell quantification studies (12, 19, 20). XTT is also widely used, since it palliates some of the deficiencies reported for the MTT test (21–23), and WST-8 is one of the most recently synthesized tetrazolium salts (24).

We found that the sensitivity of the MTT test was quite low for *Leishmania guyanensis*, indicating that this species probably me-

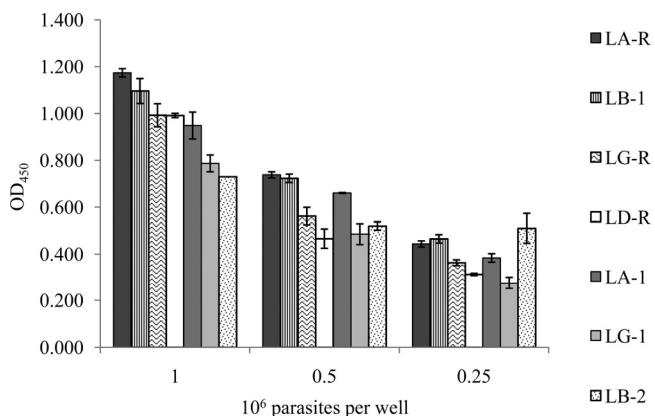


FIG 3 Comparison of the metabolism of WST-8 by strains LG-R, LG-1, LA-R, LA-1, LB-1, LB-2, and LD-R at densities of  $1 \times 10^6$ ,  $0.5 \times 10^6$ , and  $0.25 \times 10^6$  parasites/well.

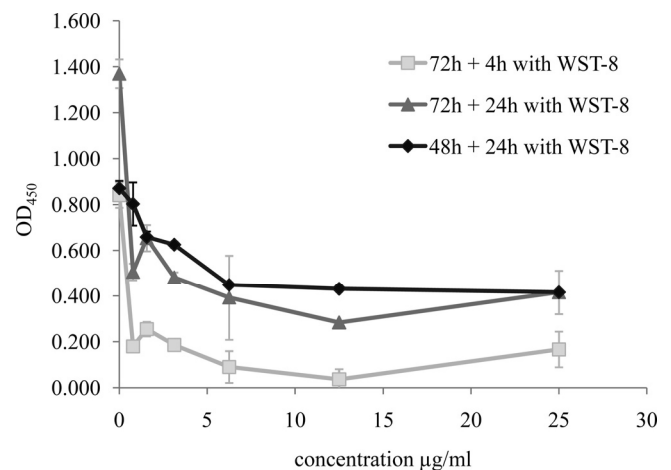


FIG 4 Optimization of the incubation time of parasites in the presence of WST-8. LG-3 parasites ( $1 \times 10^6$  parasites/well) were placed in contact with various concentrations of amphotericin B for 48 h or 72 h and were then incubated for 4 or 24 h in the presence of WST-8.

tabolizes this compound poorly, if at all. This test also displayed a lack of reproducibility, as already reported by Wan et al. (25), due to the insolubility of formazan, the product formed. The MTT test therefore requires a solubilization step to dissolve the product in an organic solvent, such as DMSO (26). Unfortunately, this dissolution is not always complete and may generate biases; also, the presence of bubbles generated by this additional step interfere with absorbance readings. In this study, we obtained standard deviations of more than 0.2 in some tests (data not shown). In addition, the quality of the correlation with the results obtained by tritiated thymidine counting remains variable (13, 27).

XTT (21) and MTS (28) tests were developed to overcome these problems of solubility. Indeed, these salts are reduced to soluble derivatives of formazan, and their reduction is accelerated by the addition of an electron-coupling agent, phenazine methosulfate (PMS) (29), thereby increasing test sensitivity. However, although the efficacy of these tests has been demonstrated in sev-

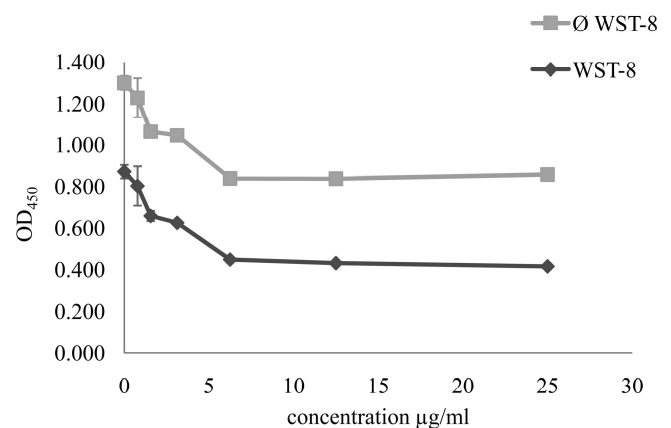


FIG 5 Demonstration of the absence of interaction between WST-8 and amphotericin B. We placed  $1 \times 10^6$  parasites/well of LG-3 in contact with various concentrations of amphotericin B. The test blanks consisted of 90  $\mu\text{l}$  of RPMI $\emptyset$ RP and 10  $\mu\text{l}$  of amphotericin B at various concentrations, with (WST-8) or without ( $\emptyset$  WST-8) the addition of WST-8. The absorbance values of the test blanks were subtracted from the test absorbance values.

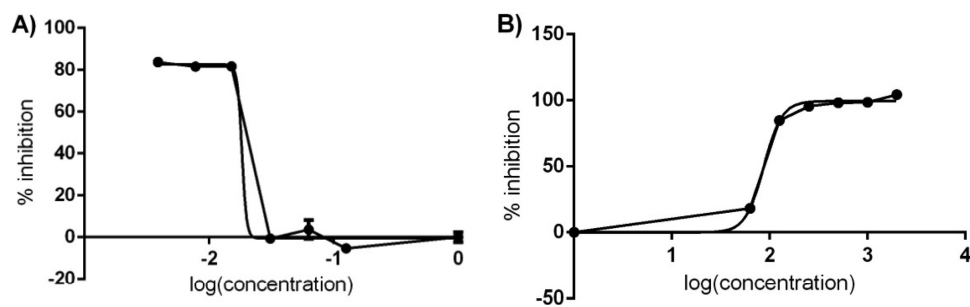


FIG 6 Percent inhibition of patient isolate LG-2 in the WST-8 test in the presence of pentamidine at concentrations of 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.015, 0.0078, 0.0039, and 0  $\mu\text{g/ml}$  (A) or of *Lantana camara* leaf extract in ethanol at concentrations of 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5, and 0  $\mu\text{g/ml}$  (B) for a parasite density of  $1 \times 10^6$  cells/well.

eral studies (17, 27) for evaluations of the sensitivity of *Leishmania* to drugs or plant extracts (30), we found that XTT tests displayed a lack of sensitivity with *L. guyanensis* strains. Furthermore, the presence of PMS may lead to the formation of crystals in the culture medium, modifying the absorbance of the product formed and resulting in erroneous findings (21). Menadione, another electron-coupling agent, also promotes the rapid reduction of XTT (31) in many cell lines, and its use also decreases background noise. However, crystals are also observed in the presence of this electron-coupling agent, albeit in smaller numbers than for PMS (21).

The WST-8 test gave highly satisfactory results in our study, with an acceptable sensitivity and a proportional relationship between the number of parasites and absorbance. WST-8 is, in fact, an improved version of WST-3, which is itself an improved version of WST-1: it combines the high stability of WST-1 with the high sensitivity of WST-3 (24). WST-3 is less stable than WST-1 due to the presence of two nitro ( $-\text{NO}_2$ ) groups on the same benzene ring. However, it is a much more sensitive agent than WST-1 for tests of viability. WST-8 was synthesized to improve the stability of this molecule while conserving its sensitivity. It was produced by transferring one of the nitro groups of WST-3 onto another benzene ring (24). The electron-coupling agent used with WST-8, 1-methoxy-PMS, is also an improved form of PMS that is more effective and insensitive to the photochemical deterioration observed with PMS (32).

The results presented in this study are consistent with those obtained by Ishiyama et al. and Tominaga et al., whose work on human and rabbit cells showed the absorbance values obtained to be proportional to the number of cells, highlighting the greater sensitivity of the WST-8 test than of those based on the other tetrazolium salts tested, WST-1, XTT, and MTS (24, 33).

Many studies have highlighted the efficacy of MTA tests, but this efficacy varies as a function of the following: (i) the type of tetrazolium salt used (33) (in our study, XTT was less well metabolized than WST-8), (ii) the species of *Leishmania* tested (15) (*L. amazonensis* was, in this study, the species that best metabolized most of the tetrazolium salts tested, whereas *L. guyanensis* metabolized these salts poorly), and (iii) the strains studied, the mitochondria of which may have different enzymatic activities (15, 21). Indeed, our observations show that for a density of  $1 \times 10^6$  parasites/well, the absorbance value obtained with *L. braziliensis* LB-2 was 0.730, whereas that obtained with *L. braziliensis* LB-1 was 1.096.

The sensitivity tests with patient isolate *L. guyanensis* LG-2 in-

cubated with pentamidine or extract of *Lantana camara* leaves, carried out with WST-8, provided satisfactory results, with  $\text{IC}_{50}$ s of 0.018  $\mu\text{g/ml}$  for pentamidine and 86.81  $\mu\text{g/ml}$  for *Lantana camara* extract. The results obtained were consistent with microscopy observations carried out after 72 h of culture in the presence of pentamidine.

Certain substances present in drugs or plant extracts may interfere with tetrazolium salts through chemical effects on cellular respiration processes (34). In such cases, centrifugation can be used to decrease this phenomenon (cell washing step). We therefore evaluated the impact of a centrifugation step on cell quantification. We found that the centrifugation step did not cause a bias (constant cell loss). However, in the presence of a drug or plant extract, the results obtained after centrifugation (data not shown) were not consistent for XTT and MTT. These results may reflect interactions between these tetrazolium salts and the leishmanicidal compounds tested. In contrast, with WST-8, the results obtained were good enough to eliminate the parasite centrifugation step. Indeed, WST-8 did not seem to interact with the drugs or plant extracts, because the results obtained were proportional in both the presence and absence of WST-8, with and without centrifugation. A control would nevertheless be required to check for the absence of interference with all new products tested.

In conclusion, this study confirms that the efficacy of tetrazolium salt reduction depends on the strain of *Leishmania* tested and the tetrazolium salt used. *L. guyanensis* accounts for 90% of the strains isolated from patients with cutaneous leishmaniasis in French Guiana. A test suitable for evaluating the level of susceptibility to drugs of the strains of *Leishmania* responsible for these cases of leishmaniasis is therefore required. We have shown here that the most widely used tests, the XTT and MTT tests, are not suitable for studies of the susceptibility of *L. guyanensis*. WST-8 is the tetrazolium salt best metabolized by *L. guyanensis*, resulting in better sensitivity. It also displays satisfactory levels of efficacy in tests of susceptibility to drugs or plant extracts. Thus, this process is ideal for quantification of cells, either to assess cell sensitivity to drugs or to screen new antimicrobial compounds. For this, we suggest performing the tests with WST-8 according to the following protocol: drug or compound is added to cells from exponential phase. The addition of WST-8 is advised after 48 h of incubation, and the absorbance is read in a spectrophotometer at 450 nm after 24 h. However, if the cells metabolize the tetrazolium salt well, addition of WST-8 may be performed after 72 h of incubation and reading after 4 h of incubation (Fig. 7).

This WST-8 assay is now applied in our lab for preliminary

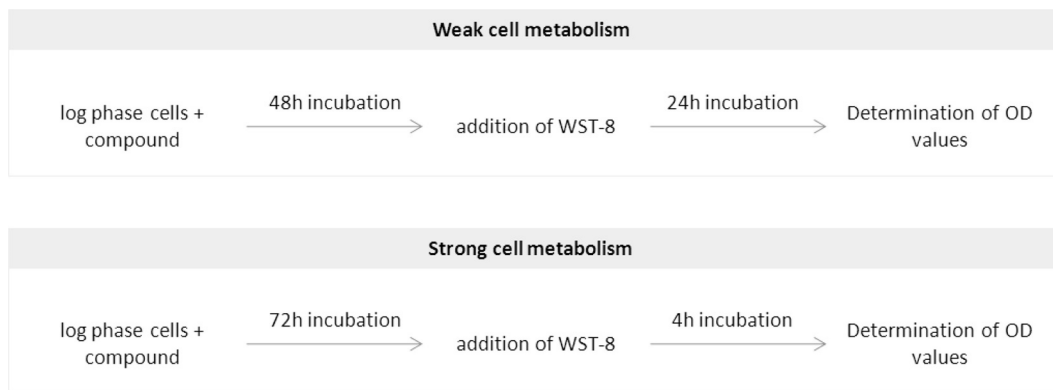


FIG 7 Protocol recommended for quantification of cells by WST-8 test according to their metabolism.

screening of field isolates for resistance to drugs usually used to treat leishmaniasis and for screening of new antileishmanial agents. Thus, the WST-8 assay is a valuable tool to assess viability and proliferation of *Leishmania* promastigotes or for a variety of other cell types.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the University of the French West Indies and French Guiana and the Ministère Français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique. It has benefited from an Investissement d'Avenir grant managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA, reference no. ANR-10-LABX-25-01) and was also supported by the Conseil Régional de la Guyane and the European Union (FEDER-Presage no. 31454).

#### REFERENCES

- WHO. 2010. Control of the leishmaniasis. WHO Technical Report Series 949. WHO, Geneva, Switzerland.
- Faraut-Gambarelli F, Piarroux R, Deniau M, Giusiano B, Marty P, Michel G, Faugère B, Dumon H. 1997. In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:827–830.
- Lira R, Sundar S, Makharria A, Kenney R, Gam A, Saraiva E, Sacks D. 1999. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J. Infect. Dis.* 180:564–567. <http://dx.doi.org/10.1086/314896>.
- Berman JD, Gallalee JV. 1985. Semiautomated assessment of in vitro activity of potential antileishmanial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28:723–726. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.28.6.723>.
- Sharief AH, Gasim Khalil FA, Theander TG, Kharazmi A, Omer SA, Ibrahim MF. 2006. *Leishmania donovani*: an in vitro study of antimony-resistant amphotericin B-sensitive isolates. *Exp. Parasitol.* 114:247–252. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2006.03.016>.
- Hu VW, Black GE, Torres-Duarte A, Abramson FP. 2002. 3H-thymidine is a defective tool with which to measure rates of DNA synthesis. *FASEB J.* 16:1456–1457. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.02-0142fje>.
- Di Giorgio C, Ridoux O, Delmas F, Azas N, Gasquet M, Timon-David P. 2000. Flow cytometric detection of *Leishmania* parasites in human monocyte-derived macrophages: application to antileishmanial-drug testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:3074–3078. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.44.11.3074-3078.2000>.
- Kamau SW, Nunez R, Grimm F. 2001. Flow cytometry analysis of the effect of allopurinol and the dinitroaniline compound (Chloralín) on the viability and proliferation of *Leishmania infantum* promastigotes. *BMC Pharmacol.* 1:1. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2210-1-1>.
- Ross DD, Joneckis CC, Ordóñez JV, Sisk AM, Wu RK, Hamburger AW, Nora RE. 1989. Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell number. *Cancer Res.* 49:3776–3782.
- Gogal RM, Jr, Ahmed SA, Larsen CT. 1997. Analysis of avian lymphocyte proliferation by a new, simple, nonradioactive assay (lympho-pro). *Avian Dis.* 41:714–725. <http://dx.doi.org/10.2307/1592166>.
- Mikus J, Steverding D. 2000. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue. *Parasitol. Int.* 48:265–269. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5769\(99\)00020-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5769(99)00020-3).
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65:55–63. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Berg K, Zhai L, Chen M, Kharazmi A, Owen TC. 1994. The use of a water-soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of *Leishmania* major promastigotes. *Parasitol. Res.* 80:235–239. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00932680>.
- Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. 2005. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitol. Int.* 54:119–122. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2005.01.001>.
- Ganguly S, Bandyopadhyay S, Sarkar A, Chatterjee M. 2006. Development of a semi-automated colorimetric assay for screening antileishmanial agents. *J. Microbiol. Methods* 66:79–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.011>.
- Sereno D, Lemesre JL. 1997. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* in vitro. *Parasitol. Res.* 83:401–403. <http://dx.doi.org/10.1007/s004360050272>.
- Williams C, Espinosa OA, Montenegro H, Cubilla L, Capson TL, Ortega-Barria E, Romero LI. 2003. Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for *Leishmania*. *J. Microbiol. Methods* 55:813–816. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.013>.
- Denizot F, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89:271–277. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6).
- Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J. Neurochem.* 69:581–593. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x>.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res.* 47:943–946.
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48:4827–4833.
- Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. 1991. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods* 142:257–265. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90114-U](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(91)90114-U).
- Meshulam T, Levitz SM, Christin I, Diamond RD. 1995. A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-

- carboxanilide (XTT). *J. Infect. Dis.* 172:1153–1156. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/172.4.1153>.
24. Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. 1997. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta* 44:1299–1305. [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140\(97\)00017-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140(97)00017-9).
  25. Wan H, Williams R, Doherty P, Williams DF. 1994. A study of the reproducibility of the MTT test. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 5:154–159. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00053336>.
  26. Marshall N, Goodwin C, Holt S. 1995. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul.* 5:69–84.
  27. Wang L, Sun J, Horvat M, Koutalistras N, Johnston B, Ross Sheil AG. 1996. Evaluation of MTS, XTT, MTT and <sup>3</sup>HTdR incorporation for assessing hepatocyte density, viability and proliferation. *Methods Cell Sci.* 18:249–255. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00132890>.
  28. Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 3:207–212.
  29. Buttke TM, McCubrey JA, Owen TC. 1993. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *J. Immunol. Methods* 157:233–240. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90092-L](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(93)90092-L).
  30. Cole SPC. 1986. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 17:259–263. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00256695>.
  31. Singh U, Akhtar S, Mishra A, Sarkar D. 2011. A novel screening method based on menadione mediated rapid reduction of tetrazolium salt for testing of anti-mycobacterial agents. *J. Microbiol. Methods* 84:202–207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2010.11.013>.
  32. Hisada R, Yagi T. 1977. 1-Methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate. A photochemically stable electron mediator between NADH and various electron acceptors. *J. Biochem.* 82:1469–1473.
  33. Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, Sasamoto K, Hamamoto T, Suzuki K, Watanabe M. 1999. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.* 36:47–50. <http://dx.doi.org/10.1039/A809656B>.
  34. Pearse AGE. 1972. Principles of oxidoreductase histochemistry, p 880–920. *In* Histochemistry, theoretical and applied, 3rd ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, United Kingdom.

La sensibilité *in vitro* des *Leishmania* à différents médicaments a donc été évaluée afin de déterminer la sensibilité générale des *Leishmania* circulant en Guyane. Ainsi, un certain nombre de médicaments utilisés ou potentiellement utilisables dans le traitement des *Leishmania* ont été testés (publication n°4).

#### **Publication n°4 : Evaluation de la sensibilité des *Leishmania* aux médicaments en Guyane**

***In Vitro* Sensitivity of Cutaneous *Leishmania* Promastigote Isolates Circulating in French Guiana to a Set of Drugs.** Ginouvès M, Simon S, Nacher M, Demar M, Carme B, Couppié P, Prévot G. Am J Trop Med Hyg. 2017 May;96(5):1143-1150. doi: 10.4269/ajtmh.16-0373. Epub 2017 Feb 6.

L'évaluation de la sensibilité des *Leishmania* aux médicaments a été effectuée à partir de 36 isolats promastigotes de *Leishmania* (33 *L. guyanensis*, 2 *L. braziliensis* et 1 *L. amazonensis*) et une souche de référence de *L. guyanensis*. Les isolats étaient issus de patients ayant consulté le CHC ou l'un des CDS de Guyane entre 2013 et 2014. Ces patients ont ensuite reçu une ou plusieurs cures de pentamidine, traitement de première intention en Guyane.

Au cours de cette étude, 7 médicaments différents ont été utilisés *in vitro* : l'azithromycine, l'amphotéricine B, le fluconazole, l'antimoniote de meglumine (Glucantime®), la miltéfosine, la paromomycine et la pentamidine. Les tests ont été effectués selon la méthode de viabilité cellulaire présentée dans la publication n°3. Les résultats obtenus *in vitro*, en présence de pentamidine, ont été comparés à la clinique des patients traités par cette même molécule.

De cette analyse ressortent de nombreux éléments, à savoir un niveau de sensibilité fortement variable d'un isolat à un autre au sein d'une même espèce, quel que soit le médicament testé. La souche de référence, qui a été isolée en 1997, semble cependant présenter une plus forte sensibilité aux médicaments testés comparativement aux autres isolats qui sont, quant à eux, plus récents. Cette augmentation de la résistance des isolats par rapport à la souche de référence pourrait être le signe d'une pression médicamenteuse qui s'est profilée au cours du temps. Les tests *in vitro* effectués en présence de pentamidine semblent être corrélés à 94% avec la clinique des patients. De plus, la détermination d'un seuil de résistance *in vitro* à la pentamidine a pu être établie. Ainsi, les parasites présentant une Concentration Inhibitrice médiane (CI50) >0.01µg/ml sont considérés comme étant résistants. Un tel test pourrait constituer une indication quant au pronostic de la maladie et une aide à la prise en charge des patients. De plus, les résultats obtenus *in vitro* montrent que la pentamidine est le médicament le plus efficace à faible dose. La miltéfosine et l'amphotéricine B présentent également une activité leishmanicide *in vitro* à faible dose. De cette étude, est également ressortie la présence de 3 isolats résistants à la pentamidine, qui ont également la particularité d'être difficiles à traiter chez les patients correspondants, dont 1 isolat présentant une CI50 particulièrement élevée pour 4 médicaments (amphotéricine B, Glucantime®, miltéfosine et pentamidine) sur les 5 testés (paromomycine).

## In Vitro Sensitivity of Cutaneous *Leishmania* Promastigote Isolates Circulating in French Guiana to a Set of Drugs

Marine Ginouvès,<sup>1,2\*</sup> Stéphane Simon,<sup>1,2</sup> Mathieu Nacher,<sup>1,3</sup> Magalie Demar,<sup>1,2,4</sup> Bernard Carne,<sup>1</sup> Pierre Couppié,<sup>1,5</sup> and Ghislaine Prévot<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des Ecosystèmes Amazoniens et Pathologie Tropicale (EPaT), Université de Guyane, Labex CEBA, DFR Santé, Cayenne, French Guiana; <sup>2</sup>Laboratoire Associé, Centre National de Référence *Leishmania*, Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie et Mycologie, General Hospital, Cayenne, French Guiana; <sup>3</sup>Centre d'Investigation Clinique Epidémiologie Clinique Antilles Guyane CIC EC 1424, General Hospital, Cayenne, French Guiana; <sup>4</sup>Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie et Mycologie, General Hospital, Cayenne, French Guiana; <sup>5</sup>Service de Dermatologie, Institut Guyanais de Dermatologie Tropicale, General Hospital, Cayenne, French Guiana

**Abstract.** Anti-leishmaniasis drug resistance is a common problem worldwide. The aim of this study was to inventory the general in vitro level of sensitivity of *Leishmania* isolates circulating in French Guiana and to highlight potential in vitro pentamidine-resistant isolates. This sensitivity study was conducted on 36 patient-promastigote isolates for seven drugs (amphotericin B, azithromycin, fluconazole, meglumine antimoniate, miltefosine, paromomycin, and pentamidine) using the Cell Counting Kit-8 viability test. The IC<sub>50</sub> values obtained were heterogeneous. One isolate exhibited high IC<sub>50</sub> values for almost all drugs tested. Pentamidine, which is the first-line treatment in French Guiana, showed efficacy at very low doses (mean of 0.0038 µg/mL). The concordance of the in vitro pentamidine results with the patients' clinical outcomes was 94% ( $K = 0.82$ ).

### INTRODUCTION

Cutaneous leishmaniasis (CL) is the most common form of leishmaniasis worldwide with 0.7–1.3 million new cases each year.<sup>1</sup> In the New World, it is mainly caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, and *Leishmania (Viannia) guyanensis*. CL and disseminated cutaneous leishmaniasis (DCL) potentially cause disfiguring scars, and muco-cutaneous leishmaniasis (MCL) can potentially cause obstruction or destruction of the nose, pharynx, and larynx. Treatments are available to cure this infection, but therapeutic options are threatened by the emergence of resistant strains.

Many drugs used as first- or second-line treatment are approved by the World Health Organization (WHO) and are used in different world regions, depending on the species and the clinical presentation. The conventional treatments based on meglumine antimoniate, sodium stibogluconate, and pentamidine cause severe side effects and require parenteral administration. Visceral leishmaniasis (VL) has become increasingly drug resistant with a non-response rate to antimonials of over 60% in Bihar, India.<sup>2</sup> In CL, the efficacy of antimonials varies: 94.2% in Bolivia,<sup>3</sup> 84% in Brazil,<sup>4</sup> 75.6–78% in Peru,<sup>5,6</sup> and 61–67% in Colombia.<sup>7</sup> The efficacy of pentamidine is 35% in Peru.<sup>6</sup> Other treatments have been used, such as amphotericin B as a first- or second-line treatment to cure VL, MCL, and CL. Trials have shown the effectiveness of a less toxic form, liposomal amphotericin B (Ambisome®), in the treatment of CL.<sup>8–11</sup>

The efficacy of azithromycin against CL ranges from an 85% cure rate in *L. braziliensis* infections in Araçuaí and Varzelândia, Brazil<sup>12</sup> to 45.5% for the same species in Salta, Argentina.<sup>13</sup> Fluconazole has good efficacy, which increases with the given dose, for the treatment of *L. major*

infections.<sup>14,15</sup> High doses of fluconazole are required for *L. braziliensis* infections.<sup>16</sup> The miltefosine cure rate varies from 82% in Guatemala to 33% in Colombia.<sup>17</sup> The cure rate is dose dependent and can reach 94%<sup>18</sup> for New World strains. The use of injectable paromomycin is not effective against CL.<sup>19,20</sup> However, its topical use as an ointment cured CL caused by species of the New and Old World, especially when supplemented with gentamicin.<sup>21–25</sup> However, the efficacy may vary.<sup>26</sup>

Until 1980, meglumine antimoniate (Glucantime®) was the first intention treatment of leishmaniasis in French Guiana. It was replaced in 1980 by pentamidine (Lomidine®) and since 1992, by pentamidine isethionate (Pentacarinat®), for *L. guyanensis* infections. Recurrences were reported in French Guiana in two studies. One reported a relapse rate of 6.8% for *L. guyanensis* in 219 patients followed from 1981 to 1987.<sup>27</sup> The other reported a 33% recurrence rate in 21 military patients monitored between 2004 and 2005.<sup>28</sup> The mechanism of late recurring leishmaniasis is poorly understood. Several mechanisms may be involved, such as late onset reactivation of persistent living parasites or the presence of *Leishmania* clones with lower drug sensitivity within isolates.

The annual incidence of CL in French Guiana is 0.5 ‰, with 86.2% of cases due to *L. guyanensis*, 9.7% due to *L. braziliensis*, 2.8% due to *L. amazonensis*, and 1.3% due to *L. (Viannia) lainsoni* (Simon and others, submitted). The first-line treatment against the predominant species is pentamidine<sup>29</sup> and the second-line treatment is meglumine antimoniate for *L. braziliensis* infections. Some cases of clinical resistance to these treatments have been reported in French Guiana.<sup>27,28</sup>

This study aimed to determine the levels of in vitro sensitivity of *Leishmania* spp. isolates circulating in French Guiana to available treatments, and the pentamidine threshold resistance value. We performed in vitro *Leishmania* spp. sensitivity tests, using promastigote forms, for seven drugs: amphotericin B, azithromycin, fluconazole, meglumine antimoniate, miltefosine, paromomycin, and pentamidine.

\*Address correspondence to Marine Ginouvès, DFR Santé, Ecosystèmes Amazoniens et Pathologie Tropicale, EA 3593, Labex CEBA, University of French Guiana, Cayenne, French Guiana. E-mail: marine.ginouvès@univ-guyane.fr



TABLE 1  
 IC<sub>50</sub> of *Leishmania* isolates and *Leishmania guyanensis* reference strain according to the medium used and the drug tested

Species	Isolate number	Medium	Promastigote IC <sub>50</sub>								
			Amphotericin B		Azithromycin		Fluconazole		Meglumine antimoniate		
			µg/mL	95% CI	µg/mL	95% CI	µg/mL	95% CI	µg/mL	95% CI	
<i>L. guyanensis</i>	1	R	4.16	3.50-4.94	> 3,000	—	3,759	3,252-4,345	9,510	8,768-10,316	
	2	R	11.51	11.17-11.87	> 3,000	—	5,000-10,000	—	7,500-15,000	—	
	3	R	4.19	3.52-4.98	192.4	175.9-210.4	3,607	495.2-26,267	5,222	3,666-7,438	
	4	R	1.87	1.63-2.15	—	—	—	—	3,057	2,711-3,447	
	5	R	1.56-3.12	—	—	—	—	2,781	2,103-3,676	—	
	6	R	1.58	1.43-1.74	—	—	—	—	3,353	3,065-3,669	
	7	R	5.38	4.70-6.16	—	—	—	—	3,034	2,860-3,218	
	8	R	1.89	1.61-2.21	—	—	—	—	2,562	1,009-6,504	
	9	R	2.57	2.39-2.77	—	—	—	—	2,802	2,458-3,193	
	10	R	0.78-1.56	—	—	—	—	—	< 937.5	—	
	11	R	9.81	8.86-10.85	—	—	—	—	15,000-30,000	—	
	12	R	6.25-12.5	—	—	—	—	—	15,000-30,000	—	
	13	R	1.56-3.12	—	—	—	—	—	1,597	1,494-1,708	
	14	R	1.03	0.85-1.23	—	—	—	—	< 937.5	—	
	15	R	3.76	3.12-4.53	—	—	—	—	< 937.5	—	
Ref*			<b>1.4</b>	<b>1.31-1.492</b>	< 93.75	—	<b>3,117</b>	<b>3,016-3,222</b>	<b>10,705</b>	<b>9,830-11,657</b>	
Isolates interval values in R medium†			1.03-12.5	—	192.4-> 3,000	—	3,607-10,000	—	< 937.5-30,000	—	
<i>L. guyanensis</i>	16	S	6.25-12.5	—	—	—	—	—	15,000-30,000	—	
	17	S	23.89	0.3079-1,854	—	—	—	—	> 30,000	—	
	18	S	6.25-12.5	—	—	—	—	—	13339	10,841-16,412	
	19	S	> 25	—	—	—	—	—	> 30,000	—	
	20	S	—	—	—	—	—	—	—	—	
	21	S	3.12-6.25	—	—	—	—	—	—	—	
	22	S	3.1	—	—	—	—	—	—	—	
	23	S	3.12-6.25	—	—	—	—	—	< 937.5	—	
	24	S	3.12-6.25	—	—	—	—	—	> 30,000	—	
	25	S	6.25-12.5	—	—	—	—	—	18,699	4,757-73,501	
	26	S	3.92	—	—	—	—	—	—	—	
27	S	4.93	4.82-5.04	102.3	88.52-118.2	3,145	2,995-3,303	< 937.5	8,707-39,913		
Ref			<b>2.08</b>	<b>0.002-2,044</b>	< 93.75	—	< 312.5	—	< 937.5		
Isolates interval values in S medium†			3.1-> 25	—	102.3	—	3,145	—	< 937.5-> 30,000		
<i>L. guyanensis</i>	28	R-BH	6.25-12.5	—	187.5-375	—	2,500-5,000	—	13,130	12,902-13,362	
	29	R-BH	4.41	4.11-4.73	35.15	17.68-69.89	2,993	2,951-3,035	7,349	4,966-10,875	
	30	R-BH	13.31	12.71-13.94	83.72	74.91-93.58	3,327	3,244-3,411	—	—	
	31	R-BH	> 25	—	177.7	139.3-226.5	4,638	3,505-6,138	—	—	
	32	R-BH	3.29	3.21-3.37	< 93.75	—	2,011	1,893-2,137	> 30,000	3,343-6,730	
	33	R-BH	7.83	7.38-8.31	< 93.75	—	2,500-5,000	—	4,744	—	
	Ref			<b>2.39</b>	<b>2.27-2.54</b>	< 93.75	—	<b>2,992</b>	<b>2,773-3,228</b>	<b>10,635</b>	
	Isolates interval values in R-BH medium†			3.29-> 25	—	< 93.75-375	—	2,011-5,000	4,744-> 30,000	<b>9,424-12,001</b>	
	<i>Leishmania braziliensis</i>		R-BH	1.27	1.08-1.48	83.31	59.73-116.2	830.7	687.6-1,004	—	—
	<i>L. braziliensis</i>		R	< 0.78	—	< 93.75	—	—	—	—	
	<i>Leishmania amazonensis</i>		R-BH	8.35	7.77-8.98	< 93.75	—	3,105	2,983-3,232	9,822	9,384-10,282
Total isolates interval values‡			< 0.78-> 25	—	< 93.75-> 3,000	—	830.7-10,000	—	4,744-> 30,000		

(continued)

TABLE 1  
Continued

Species	Medium	Isolate number	Miltefosine		Paromomycin		Pentamidine		Clinical outcome§	
			µg/mL	95% CI	µg/mL	95% CI	µg/mL	95% CI		
<i>L. guyanensis</i>	R	1	3.91	3.25–4.34	< 156.25	–	0.0013	0.012–0.014	Sensitive presumed	
		2	3.9–7.8	–	< 156.25	–	0.00078–0.0015	–	Sensitive	
		3	< 3.9	–	< 156.25	–	0.0011	0.0009–0.001	–	
		4	< 3.9	–	1,211	982.7–1,492	–	–	–	Sensitive
		5	< 3.9	–	> 5,000	–	–	–	–	Sensitive presumed
		6	< 3.9	–	701.8	542.7–907.4	–	–	–	–
		7	< 3.9	–	1,154	928.8–1,434	–	–	–	Sensitive
		8	< 3.9	–	2,314	826.1–6,484	–	–	–	Resistant
		9	< 3.9	–	953.4	365.1–2,489	–	–	–	Sensitive
		10	5.27	4.69–5.92	< 156.25	–	0.0065	0.004–0.005	–	Resistant
		11	10.53	7.97–13.90	96.27	53.84–172.2	0.0025	0.002–0.003	–	Sensitive
		12	10.63	9.10–12.42	359.7	338.5–382.2	0.0056	0.005–0.006	–	Sensitive presumed
		13	–	–	269.7	237.1–306.7	0.006	0.003–0.01	–	–
		14	< 3.9	–	56.47	39.93–79.86	0.0094	0.003–0.02	–	Resistant
		15	6.64	5.33–8.26	98.12	89.52–107.5	0.0059	0.005–0.006	–	Sensitive
Ref*		3.9–7.8	110	75.5–160.3	0.0057	0.005–0.006	0.002119	0.0017–0.0025		
Isolates interval values in R medium†			< 3.9–> 10.63	–	< 156.25–> 5,000	–	0.001–> 0.01	–	–	
<i>L. guyanensis</i>	S	16	> 125	–	48.12	14.82–156.3	0.0041	0.003–0.004	–	
		17	10.6	9.17–12.26	< 156.25	–	0.00312–0.00625	–	Sensitive presumed	
		18	7.6	6.89–8.39	< 156.25	–	0.003	0.002–0.003	–	Sensitive
		19	> 125	–	267.3	241.9–295.2	> 0.01	–	–	Resistant
		20	< 3.9	–	< 156.25	–	0.00312–0.00625	–	Sensitive presumed	
		21	9.95	8.17–12.13	< 156.25	–	0.0025	0.0022–0.0027	–	Resistant
		22	6.66	5.92–7.50	< 156.25	–	0.0033	0.002–0.005	–	–
		23	7.8–15.6	–	< 156.25	–	0.0026	0.001–0.004	–	Sensitive
		24	11.7	10.81–12.66	< 156.25	–	0.0036	0.0033–0.0039	–	Intermediate
		25	3.09	2.57–3.72	98.52	34.45–281.7	0.0015	0.0013–0.0019	–	Intermediate
		26	1.55	0.17–13.96	< 156.25	–	0.0033	0.002–0.004	–	–
		27	< 3.9	–	738.9	425.7–1,283	0.00312–0.00625	–	–	–
Ref		8.85	4.9–15.9	186.8	134.6–259.2	0.002329	0.00084–0.0064	–		
Isolates interval values in S medium†			< 3.9–> 125	–	48.12–738.9	–	0.0015–> 0.01	–		
<i>L. guyanensis</i>	R-BH	28	3.52	3.24–3.82	159.8	134.5–189.9	0.00312–0.00625	–	Sensitive presumed	
		29	< 3.9	–	358.1	275.5–465.4	0.0015–0.00312	–	–	
		30	1.61	0.52–5.01	714.3	611.7–834.2	0.0035	0.003–0.004	–	
		31	< 3.9	–	4,461	303.6–65,551	0.0028	0.002–0.003	–	
		32	< 3.9	–	–	–	0.0015–0.00312	–	–	
		33	–	–	–	–	–	–	–	
		Ref		6.2	5.9–6.52	77.89	46.15–131.5	0.002537	Intermediate	
Isolates interval values in R–BH medium†			1.61–3.52	–	159.8–4,461	–	0.0023–0.0027	–		
<i>Leishmania braziliensis</i>	R–BH	34	3	1.31–6.85	–	0.0016	0.001–0.002	–		
		35	< 3.9	–	< 156.25	–	–	–	–	
<i>Leishmania amazonensis</i>	R–BH	36	1.95	0.45–8.29	129.6	122.1–137.5	0.00312–0.00625	–		
		Total isolates interval values‡	< 3.9–> 125	–	< 156.25–> 5,000	–	0.001–> 0.01	–		

IC<sub>50</sub> = 50% inhibitory concentration; R = RPMI 1640 medium + L-Biopterin and Hemin Chloride; S = Schneider medium (+L-Biopterin and Hemin Chloride).\*Ref = *Leishmania guyanensis* reference strain.

† Isolates interval values for each medium according to the drug tested.

‡ Isolates interval values for all medium included, according to the drug tested.

§ Sensitive, cured after one course of pentacarnat; sensitive presumed, presumed cured after one course of pentacarnat; resistant, cured after two courses of pentacarnat; resistant, cured after three or more courses of pentacarnat.

## MATERIALS AND METHODS

**Parasites and cultures.** There were 221 patients consulting the dermatology department of Cayenne hospital or one of the health centers across French Guiana between April 2013 and May 2014, who were diagnosed as *Leishmania* positive using the polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism identification technique.<sup>30</sup> Biopsies collected from patients for diagnosis were cultured at 26°C in Roswell Park Memorial Institute medium 1640 medium (Gibco®, Paisley, Scotland) containing L-glutamine, 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, and phenol red, supplemented with 20% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco, Paisley, Scotland), 50 IU/mL penicillin (Invitrogen®, Carlsbad, CA), 0.05 mg/mL streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA), and nonessential amino acids (Gibco, Paisley, Scotland). Thirty-six culture isolates, representing approximately 28.7% of all annual cases, were suitable for drug-sensitivity tests.

The MHOM/GF/97/LBC6 reference *L. guyanensis* strain was originally from French Guiana.

**Drugs.** The stock concentrations of drugs were 250 µg/mL for amphotericin B (liquid solution, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 30 mg/mL for azithromycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluted in ethanol, 100 mg/mL for fluconazole (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluted in DMSO, 300 mg/mL for meglumine antimoniate (liquid solution supplied by the CHC, Glucantime, Aventis, France), 1.25 mg/mL for miltefosine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluted in ethanol, 50 mg/mL for paromomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluted in sterile water, and 100 mg/mL for pentamidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluted in sterile water. Solutions were stored at -20°C.

The optimal concentration ranges were first determined for each drug. Based on these results, serial 2-fold dilutions were performed to obtain the final testing concentrations, which were 0.78–25 µg/mL for amphotericin B, 93.75–3,000 µg/mL for azithromycin, 312.5–10,000 µg/mL for fluconazole, 937.5–30,000 µg/mL for meglumine antimoniate, 3.9–125 µg/mL for miltefosine, 156.25–5,000 µg/mL for paromomycin, and 0.00039–0.0125 µg/mL for pentamidine.

**In vitro promastigote sensitivity tests.** *Leishmania* promastigotes were cultured in different media: either in RPMI 1640 medium (Gibco, Paisley, Scotland) containing L-glutamine, 20 mM HEPES, without phenol red, supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco, Paisley, Scotland), 50 IU/mL penicillin (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.05 mg/mL streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA), nonessential amino acids (Gibco, Paisley, Scotland), which was further supplemented with 0.6 mg/mL L-Biopterin (Santa Cruz Biotechnology®, Heidelberg, Germany) and 5 mg/mL Hemin Chloride (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) (called R-BH medium) or not (called R medium); or in Schneider's drosophila medium (Sigma®, St. Louis, MO) containing L-glutamine and supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco, Paisley, Scotland), 0.6 mg/mL L-Biopterin (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), and 5 mg/mL Hemin Chloride (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) (called S medium). Viability tests were performed in triplicate using the Cell Counting Kit-8 assay (Sigma, St. Louis, MO), according to the procedure of Ginouvès and others.<sup>31</sup> Briefly, 10<sup>6</sup> parasites/well, in the exponential growth phase, were placed in contact with different drug concentra-

tions in a 96-well plate for 48 hours at 26°C. Then, 10% of WST-8 was added and the parasites were incubated for a further 24 hours at 26°C. Absorbance was measured at 450 nm using a Tristar LB941 spectrophotometer (Berthold Technologies®, Wildbad, Germany) or Multiskan (Thermo Scientific® Waltham, MA). The percentage of inhibition was obtained as follows: % inhibition =  $[(A_{\text{control}} - A_{\text{test}})/A_{\text{control}}] \times 100$ . The 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was calculated using GraphPad Prism6® software (La Jolla, CA).

**Ethical aspects.** The study of patient outcomes was retrospective and monocentric. All patients were informed using written documents and posters during consultation that case records and biological data might be further used in research and that they had the right to refuse. The monocentric audit of retrospective anonymized case record data is permitted by the CNIL (National Commission for Informatics and Liberties) (number 1805118v0), and the project did not raise any specific concerns by the Ethical Committee at Cayenne General Hospital.

**Statistical analysis.** The 95% confidence interval (95% CI) was determined using GraphPad Prism6 software for each test. Kappa test values were determined using STATA® (College Station, TX), to assess the concordance between the in vitro phenotype "susceptible or resistant" to pentamidine and patient outcomes.

## RESULTS

**Leishmania sensitivity levels.** The in vitro sensitivity tests performed on the 36 promastigote isolates included 33 isolates of *L. guyanensis*, two of *L. braziliensis*, and one of *L. amazonensis* (Table 1). IC<sub>50</sub> values varied widely: they ranged from 1.03 (or even < 0.78) to 23.89 (> 25) µg/mL for amphotericin B, 35.15 to 192 (or even > 3,000) µg/mL for azithromycin, 830.7 to 4,638 (> 5,000) µg/mL for fluconazole, 1,597 (< 937.5) to 18,699 (> 30,000) µg/mL for meglumine antimoniate, 1.55 to 11.7 (> 125) µg/mL for miltefosine, 48.12 to 4,461 (> 5000) µg/mL for paromomycin, and 0.001 to 0.0094 (> 0.01) µg/mL for pentamidine (Table 1).

The reference strain, a strain isolated in 1997 in French Guiana, allowed assessment of the evolution of the sensitivity of patient isolates. Moreover, this strain had the lowest IC<sub>50</sub> and was, therefore, considered to be the sensitive reference strain for interpretation of the IC<sub>50</sub> results.

IC<sub>50</sub> values for patient isolates were variable relative to the reference strain values, except for fluconazole, for which the values were close to those of the reference strain. One isolate, number 19, was of interest because it presented high IC<sub>50</sub> values for four of the five drugs tested (amphotericin B, meglumine antimoniate, miltefosine, and pentamidine) and the corresponding patient was also very difficult to treat.

Various media were used in this study. RPMI medium was first used, because of its use in parasite cultures from diagnostic biopsies. The parasites are generally difficult to maintain in vitro. The culture medium was thus improved by adding essential factors, such as biopterin<sup>32,33</sup> and hemin chloride,<sup>34</sup> to the RPMI medium and another *Leishmania* medium, Schneider's Drosophila medium. The addition of these essential factors improved parasite growth, but may have influenced the drug sensitivity of the isolates.<sup>35</sup> Indeed, we tested two patient isolates with the three

different media and observed large differences depending on the drug tested for one of the two isolates, from 10 to more than 100 times (data not shown). These differences may result from the influence of the medium composition on drug activity.<sup>35</sup> However, the IC<sub>50</sub> values obtained in this study were globally in the same range, suggesting that the media were generally equivalent.

The lowest concentrations required for the in vitro tests were for pentamidine (average of 0.0038 µg/mL), miltefosine, and amphotericin B (average of 3.00 and 5.81 µg/mL, respectively).

**Phenotypic variation and culture conditions.** We performed sensitivity tests at two random time intervals with four *L. guyanensis* isolates in R-BH medium (Table 2) to estimate the temporal phenotypic variability of *Leishmania* isolates. The random variability of the IC<sub>50s</sub> did not appear to result from the time in culture (each with low passages of 1–4), but was associated with the drug tested. This variability was particularly pronounced for azithromycin (up to a 1.107-fold difference).

**Comparison of in vitro sensitivity to pentamidine and clinical outcome.** The in vitro sensitivity of *Leishmania* to pentamidine was related to clinical features (Table 1). Isolates from patients cured after a single course of pentamidine were considered to be sensitive. Patients who received a single course of pentamidine isethionate and did not consult again were considered to be cured (in previous studies conducted at the reference center for leishmaniasis treatment in French Guiana, patients indicated that they were better and did not see the point in returning when asked why they failed to come to their control consultation<sup>36</sup>) and the isolate to be sensitive. Isolates from patients who were cured after two courses of pentamidine were considered to be intermediate. Isolates from patients who were cured after three or more courses of pentamidine were considered to be resistant.

There was a strong correlation ( $r = 0.94$  [17/18 without considering the intermediate status;  $K = 0.82$ ]) between the in vitro results and patient outcomes.

## DISCUSSION

This first study on the anti-leishmanial drug sensitivity of cutaneous *Leishmania* isolates from French Guiana showed great heterogeneity between isolates, and revealed one in vitro-resistant isolate to four of the five drugs tested.

We performed the tests using the promastigote form, because it was the easiest form to handle on a large scale and allowed us to make a first assessment of the drug sensitivity of the circulating isolates. The promastigote form model is not recommended in the literature for in vitro sensitivity tests because several parameters can influence the sensitivity results (such as cell density, growth rates, the drug tested, medium composition)<sup>35</sup>; it is not the mammalian form, and is generally less sensitive to some drugs or plant compounds, unlike the intracellular amastigote or axenic amastigote forms. Indeed, it appears that intracellular amastigote forms better reflect the observed sensitivity in patients, especially to pentavalent antimonials,<sup>37</sup> which require conversion by the host cell to a trivalent form.<sup>38</sup> Moreover, promastigote sensitivity has been shown to be variable for the drugs tested, with low sensitivity to paromomycin and higher sensitivity to pentamidine than

TABLE 2  
Temporal phenotypic variability of *Leishmania* isolates

Isolate	Interval time between 2 tests	Test number	Amphotericin B		Azithromycin		Fluconazole		Meglumine antimoniate		Miltefosine		Paromomycin		Pentamidine	
			CI <sub>50</sub> (µg/mL)	Ratio (test2/test1)	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	Ratio (test2/test1)	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	Ratio (test2/test1)	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	Ratio (test2/test1)	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	Ratio (test2/test1)	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	Ratio (test2/test1)	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	Ratio (test2/test1)
A	1 month	Test 1	4.935	1.9	102.3	1.3	3,145	1.3	18,642	2.2	0.963	3.2	738.9	1.2	0.00319	2.2
		Test 2	9.147		81.5		4,076		8,357		3.12		611.7		0.001458	
B	1 month	Test 1	4.412	0.9	35.15	0.18.10 <sup>7</sup>	2,993	1.2	7,349	1.7	3,103	17	358.1	2.8	0.00278	0.5
		Test 2	3.79		0.000019		3,494		4,269		0.18		1,006		0.001379	
C	1 month	Test 1	3.294	3.6	9.684	1.6.10 <sup>7</sup>	2,011	2.0	4,744	2.5	0.1324	1.2	< 156.25	–	0.002657	0.5
		Test 2	11.968		6.1E–07		4,039		11,951		0.16		105.6		0.00133	
D	3 month	Test 1	2.059	–	217.6	–	–	–	6,559	2.5	5.457	0.8	568	5.3	0.00704	0.7
		Test 2	–		–		3,334		16,574		4.357		–		0.00504	

In bold: highest values among each pair of test (ratio > 1.5).

amastigote<sup>39,40</sup> or axenic amastigote forms.<sup>41</sup> However, the promastigote and amastigote forms display similar sensitivity to miltefosine and amphotericin.<sup>42</sup> Though, there is no correlation between in vitro results using promastigotes and patient clinical outcomes for visceral leishmaniasis antimonial assays, unlike for the amastigote form<sup>43,44</sup> for which in vitro tests correlate well with clinical outcome. In contrast, Grogl and others showed an 86–89% correlation coefficient for the patient response to sodium stibogluconate and meglumine antimoniate treatment and in vitro susceptibility of promastigotes from CL and MCL *Leishmania* isolates.<sup>45</sup> Here, we observed a 94% correlation between the in vitro pentamidine results and patient outcomes. Moreover, there is concordance between in vitro promastigotes and intracellular amastigotes<sup>46</sup> for antimonials, when they are in the identical environment.<sup>47</sup>

The axenic amastigote form has been suggested to be a possible alternative, because of its morphological and metabolic similarity to the intracellular macrophage amastigote form,<sup>48</sup> but it shares the same drawback with the promastigote form because of its inability to accumulate drugs as macrophages do.<sup>41</sup> The mammalian intracellular amastigote model has been recommended as the gold standard. However, several factors may bias the response to drugs in this form also, including the type of macrophage used,<sup>49</sup> the variable macrophage infection rate,<sup>49</sup> macrophage infectivity depending on the *Leishmania* species,<sup>50</sup> incomplete intracellular transformation into the amastigote<sup>37</sup> and, as with axenic amastigote forms, the long process of adaptation to the environment and transformation, which leads to the selection of subpopulations.<sup>51,52</sup> In vitro amastigote intracellular results also do not always correlate with the clinical outcome of the patients,<sup>53</sup> particularly due to host factors. Finally, this model is inappropriate for large-scale in vitro monitoring of drug efficacy. Overall, each model has its benefits and drawbacks.

As mentioned above, there are some potential limitations in this study. Comparison tests using the intracellular amastigote form may be informative. A larger number of isolates would refine and confirm the promastigote sensitivity threshold for pentamidine (determined to be  $\geq 0.009 \mu\text{g/mL}$  in this study), as well as the in vitro and in vivo consistency. Another important limitation was the large variation in the results of the same isolate when tested in different media, depending on the drugs used, making it challenging to compare the results from one study to another.

Despite these limitations, this study may provide the first baseline to monitor the evolution of the drug sensitivity of *Leishmania* isolates in French Guiana.

Received May 10, 2016. Accepted for publication November 19, 2016.

Published online February 6, 2017.

Financial support: This work was supported by the University of French Guiana and the Ministère Français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, the Conseil Régional de la Guyane and the European Union (FEDER-Presage N° 31454), and the "Investissement d'Avenir" grant managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA, ref. ANR-10-LABX-25-01).

Conflicts of interest: Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

Authors' addresses: Marine Ginouvès and Stéphane Simon, DFR Santé, Ecosystemes Amazoniens et Pathologie Tropicale, Labex CEBA, University of French Guiana, Cayenne, French Guiana, and

Laboratoire Associé, Centre National de Référence Leishmania, Laboratory of Parasitology and Mycology, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana, E-mails: marine.ginouvès@univ-guyane.fr and stephane.simon@guyane.univ-ag.fr. Mathieu Nacher, DFR Santé, Ecosystemes Amazoniens et Pathologie Tropicale, Labex CEBA, University of French Guiana, Cayenne, French Guiana, and Centre d'Investigation Clinique Epidémiologie Clinique Antilles Guyane CIC EC 1424, Cayenne General Hospital, Cayenne, French Guiana, E-mail: mathieu.nacher@ch-cayenne.fr. Magalie Demar, DFR Santé, Ecosystemes Amazoniens et Pathologie Tropicale, Labex CEBA, University of French Guiana, Cayenne, French Guiana, Laboratoire Associé, Centre National de Référence Leishmania, Laboratory of Parasitology and Mycology, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana, E-mail: magalie.demar@ch-cayenne.fr. Bernard Carne, DFR Santé, Ecosystemes Amazoniens et Pathologie Tropicale, Labex CEBA, University of French Guiana, Cayenne, French Guiana, and Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana, E-mail: carne.bernard@wanadoo.fr. Pierre Couppié, DFR Santé, Ecosystemes Amazoniens et Pathologie Tropicale, Labex CEBA, University of French Guiana, Cayenne, French Guiana, and Guianan Institute of Tropical Dermatology, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana, E-mail: pierre.couppié@ch-cayenne.fr. Ghislaine Prévot, DFR Santé, Ecosystemes Amazoniens et Pathologie Tropicale, Labex CEBA, University of French Guiana, Cayenne, French Guiana, E-mail: fac.prevot@gmail.com.

## REFERENCES

1. WHO, 2015. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Accessed February 1, 2015.
2. Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, Kumar PCK, Murray HW, 2000. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis* 31: 1104–1107.
3. Bermudez H, Rojas E, Garcia L, Desjeux P, Dujardin JC, Boelaert M, Chappuis F, 2006. Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine antimoniate, for the treatment of tegumentary leishmaniasis in Isiboro secure park, Bolivia. *Ann Trop Med Parasitol* 100: 591–600.
4. Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Goncalves-Costa SC, Pirmez C, 1997. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). *Am J Trop Med Hyg* 57: 651–655.
5. Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C, Santamaria-Castrellon G, Ramirez L, Lazo M, De Doncker S, Boelaert M, Robays J, Dujardin J, Arevalo J, Chappuis F, 2008. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis* 46: 223–231.
6. Andersen EM, Cruz-Saldarriaga M, Llanos-Cuentas A, Luz-Cjuno M, Echevarria J, Miranda-Verastegui C, Colina O, Berman JD, 2005. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for Peruvian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 72: 133–137.
7. Palacios R, Osorio LE, Grajalew LF, Ochoa MT, 2001. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania Viannia* species. *Am J Trop Med Hyg* 64: 187–193.
8. Brown M, Noursadeghi M, Boyle J, Davidson RN, 2005. Successful liposomal amphotericin B treatment of *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *Br J Dermatol* 153: 203–205.
9. Yardley V, Croft SL, 1997. Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 752–756.
10. Wortmann G, Zapor M, Ressler R, Fraser S, Hartzell J, Pierson J, Weintrob A, Magill A, 2010. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 83: 1028–1033.
11. Neves LO, Talhari AC, Gadelha EP, Silva RM Junior, Guerra JA, Ferreira LC, Talhari S, 2011. A randomized clinical

- trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol* 86: 1092–1101.
12. Prata A, Silva-Vergara ML, Costa L, Rocha A, Krolewiecki A, Silva JC, de Paula EV, Pimenta FG Junior, Giraldo LE, 2003. Efficacy of azithromycin in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 65–69.
  13. Krolewiecki AJ, Romero HD, Cajal SP, Abraham D, Mimori T, Matsumoto T, Juarez M, Taranto NJ, 2007. A randomized clinical trial comparing oral azithromycin and meglumine antimoniate for the treatment of American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 77: 640–646.
  14. Alrajhi AA, Ibrahim EA, De Vol EB, Khairat M, Faris RM, Maguire JH, 2002. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *N Engl J Med* 346: 891–895.
  15. Emad M, Hayati F, Fallahzadeh MK, Namazi MR, 2011. Superior efficacy of oral fluconazole 400 mg daily versus oral fluconazole 200 mg daily in the treatment of cutaneous *Leishmania major* infection: a randomized clinical trial. *J Am Acad Dermatol* 64: 606–608.
  16. Sousa AQ, Frutuoso MS, Moraes EA, Pearson RD, Pompeu MM, 2011. High-dose oral fluconazole therapy effective for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Vianna) braziliensis*. *Clin Infect Dis* 53: 693–695.
  17. Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, Luz M, Gutierrez P, Arboleda M, Berman JD, Junge K, Engel J, Sindermann H, 2004. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 38: 1266–1272.
  18. Soto J, Toledo J, Gutierrez P, Nicholls RS, Padilla J, Engel J, Fischer C, Voss A, Berman J, 2001. Treatment of american cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. *Clin Infect Dis* 33: E57–E61.
  19. Hepburn NC, Tidman MJ, Hunter JA, 1994. Aminosidine (paromomycin) versus sodium stibogluconate for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 700–703.
  20. Soto J, Grogl M, Berman J, Oliaro P, 1994. Limited efficacy of injectable aminosidine as single-agent therapy for Colombian cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 695–698.
  21. Ben Salah A, Ben Messaoud N, Guedri E, Zaatour A, Ben Alaya N, Bettaieb J, Gharbi A, Belhadj Hamida N, Boukthir A, Clif S, Abdelhamid K, El Ahmadi Z, Louzir H, Mokni M, Morizot G, Buffet P, Smith PL, Kopydowski KM, Kreishman-Deitrick M, Smith KS, Nielsen CJ, Ullman DR, Norwood JA, Thorne GD, McCarthy WF, Adams RC, Rice RM, Tang D, Berman J, Ransom J, Magill AJ, Grogl M, 2013. Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. *N Engl J Med* 368: 524–532.
  22. Ben Salah A, Buffet PA, Morizot G, Ben Massoud N, Zaatour A, Ben Alaya N, Haj Hamida NB, El Ahmadi Z, Downs MT, Smith PL, Dellagi K, Grogl M, 2009. WR279,396, a third generation aminoglycoside ointment for the treatment of *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis: a phase 2, randomized, double blind, placebo controlled study. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e432.
  23. El-On J, Jacobs GP, Witzum E, Greenblatt CL, 1984. Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in experimental animals. *Antimicrob Agents Chemother* 26: 745–751.
  24. Grogl M, Schuster BG, Ellis WY, Berman JD, 1999. Successful topical treatment of murine cutaneous leishmaniasis with a combination of paromomycin (aminosidine) and gentamicin. *J Parasitol* 85: 354–359.
  25. Armijos RX, Weigel MM, Calvopina M, Mancheno M, Rodriguez R, 2004. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for new world cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 91: 153–160.
  26. Soto J, Fuya P, Herrera R, Berman J, 1998. Topical paromomycin/methylbenzethonium chloride plus parenteral meglumine antimoniate as treatment for American cutaneous leishmaniasis: controlled study. *Clin Infect Dis* 26: 56–58.
  27. Dedet JP, Pradinaud R, Gay F, 1989. Epidemiological aspects of human cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83: 616–620.
  28. Gangneux JP, Sauzet S, Donnard S, Meyer N, Cornillet A, Pratloug F, Guiguen C, 2007. Recurrent American cutaneous leishmaniasis. *Emerg Infect Dis* 13: 1436–1438.
  29. Nacher M, Carne B, Sainte Marie D, Couppie P, Clyti E, Guibert P, Pradinaud R, 2001. Influence of clinical presentation on the efficacy of a short course of pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Ann Trop Med Parasitol* 95: 331–336.
  30. Simon S, Veron V, Carne B, 2010. *Leishmania* spp. identification by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis and its applications in French Guiana. *Diagn Microbiol Infect Dis* 66: 175–180.
  31. Ginouves M, Carne B, Couppie P, Prevot G, 2014. Comparison of tetrazolium salt assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *J Clin Microbiol* 52: 2131–2138.
  32. Trager W, 1969. Pteridine requirement of the hemoflagellate *Leishmania tarentolae*. *J Protozool* 16: 372–375.
  33. Jain M, Dole VS, Myler PJ, Stuart KD, Madhubala R, 2007. Role of biopterin transporter (BT1) gene on growth and infectivity of *Leishmania*. *AJBB* 3: 199–206.
  34. Pal JK, Joshi-Purandare M, 2001. Dose-dependent differential effect of hemin on protein synthesis and cell proliferation in *Leishmania donovani* promastigotes cultured in vitro. *J Biosci* 26: 225–231.
  35. Moreira ES, Soares RM, Petrillo-Peixoto Mde L, 1995. Glucantime susceptibility of *Leishmania* promastigotes under variable growth conditions. *Parasitol Res* 81: 291–295.
  36. Nacher M, Carne B, Sainte Marie D, Couppie P, Clyti E, Guibert P, Pradinaud R, 2001. Seasonal fluctuations of incubation, healing delays, and clinical presentation of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *J Parasitol* 87: 1495–1498.
  37. Vermeersch M, da Luz RI, Tote K, Timmermans JP, Cos P, Maes L, 2009. In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to anti-leishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3855–3859.
  38. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH, 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19: 111–126.
  39. Neal RA, 1989. Experimental chemotherapy. Killick-Kendrick R, Peters N, eds. *The Leishmaniasis*. London, UK: Academic Press, 793–845.
  40. Berman JD, Wyler DJ, 1980. An in vitro model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. *J Infect Dis* 142: 83–86.
  41. Sereno D, Lemesre JL, 1997. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 972–976.
  42. Kumar D, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P, 2009. In vitro susceptibility of field isolates of *Leishmania donovani* to miltefosine and amphotericin B: correlation with sodium antimony gluconate susceptibility and implications for treatment in areas of endemicity. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 835–838.
  43. Lira R, Sundar S, Makharia A, Kenney R, Gam A, Saraiva E, Sacks D, 1999. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis* 180: 564–567.
  44. Ibrahim ME, Hag-Ali M, el-Hassan AM, Theander TG, Kharazmi A, 1994. *Leishmania* resistant to sodium stibogluconate: drug-associated macrophage-dependent killing. *Parasitol Res* 80: 569–574.
  45. Grogl M, Thomason TN, Franke ED, 1992. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg* 47: 117–126.
  46. Azeredo-Coutinho RB, Mendonca SC, Callahan H, Portal AC, Max G, 2007. Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other *Leishmania* species and correlates with response to

- therapy in American tegumentary leishmaniasis. *J Parasitol* 93: 688–693.
47. Berman JD, Edwards N, King M, Grogl M, 1989. Biochemistry of pentostam resistant *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg* 40: 159–164.
48. Gupta N, Goyal N, Rastogi AK, 2001. In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. *Trends Parasitol* 17: 150–153.
49. Seifert K, Escobar P, Croft SL, 2010. In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *J Antimicrob Chemother* 65: 508–511.
50. Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Pereira LI, Pelli de Oliveira MA, Ribeiro-Dias F, Dorta ML, Uliana SR, 2010. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop Med Int Health* 15: 68–76.
51. Grogl M, Oduola AM, Cordero LD, Kyle DE, 1989. *Leishmania* spp.: development of pentostam-resistant clones in vitro by discontinuous drug exposure. *Exp Parasitol* 69: 78–90.
52. Croft SL, 2001. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 6: 899–905.
53. Yardley V, Ortuno N, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Doncker SD, Ramirez L, Croft S, Arevalo J, Adai V, Bermudez H, Decuypere S, Dujardin JC, 2006. American tegumentary leishmaniasis: is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? *J Infect Dis* 194: 1168–1175.

## Influence du LRV dans la sensibilité *in vitro* des *Leishmania*

L'objectif de ce travail est de déterminer l'impact du LRV sur la sensibilité *in vitro* des *Leishmania* à la pentamidine.

Pour cela, la mise en évidence des LRV a pu être effectuée pour 35/36 isolats de *Leishmania* de l'étude précédente (publication n°4) (32 *L. guyanensis*, 2 *L. braziliensis* et 1 *L. amazonensis*) par RT-PCR à l'aide des amorces LRV1-F1 : 5'-CTGACTGGACGGGGGTAAT-3' et LRV1-R1 : 5'-CAAAACACTCCCTTAC GC-3', selon Ginouvès et al. (Ginouvès et al. 2016), à partir des ARN extraits des promastigotes en culture.

Parmi les 32 isolats de *L. guyanensis*, 30 étaient LRV (+). Vingt-sept (27) de ces isolats LRV (+) (90%) étaient sensibles à la pentamidine *in vitro* et 3 (10%) étaient résistants à la pentamidine. Les 2 isolats LRV (-) étaient tous sensibles à la pentamidine *in vitro*. Les 2 isolats de *L. braziliensis* étaient LRV (+) et sensibles à la pentamidine. L'isolat de *L. amazonensis*, sensible à la pentamidine, ne renfermait pas de LRV (Tableau 5).

Tableau 5 : Sensibilité *in vitro* des *Leishmania* à la pentamidine en présence ou en absence du LRV

	Sensible		Résistant		Total
	LRV POS	LRV NEG	LRV POS	LRV NEG	
<i>L. guyanensis</i>	27	2	3	0	32
<i>L. braziliensis</i>	2	0	0	0	2
<i>L. amazonensis</i>	0	1	0	0	1
Total	29	3	3	0	35

Un test de chi 2 a été effectué afin de vérifier l'implication du LRV dans la sensibilité des parasites au traitement. Aucun lien entre la présence du LRV et la sensibilité *in vitro* des *Leishmania* à la pentamidine n'est ressorti de ces observations ( $\chi^2$  :  $p=0.56$ ), si ce n'est que les rares isolats résistants à la pentamidine correspondaient toujours à des *Leishmania* LRV (+). L'isolat qui présentait des CI50 élevées à la plupart des médicaments testés et qui provenait d'un patient présentant une forte résistance face au traitement administré était également LRV (+).

Cette absence de lien entre le LRV et la sensibilité *in vitro* des parasites a également été rapportée dans le modèle amastigote intra-macrophagique, en présence de pentamidine ou d'antimoniés (Adaui et al., 2016; Bourreau et al., 2016, communication personnelle).

Par conséquent, le LRV ne semble pas entraver l'action des médicaments à l'intérieur du parasite. Reste à déterminer s'il impacte la réponse au traitement chez l'hôte humain.



## AXE 3 :

# INFLUENCE DU LRV DANS LA LEISHMANIOSE

---

L'objectif central de cette thèse était de déterminer le rôle du LRV dans la leishmaniose humaine. Pour cela, les travaux menés dans cet axe ont été réalisés en parallèle et en collaboration avec des partenaires : l'Hôpital de Cayenne, l'Institut Pasteur de la Guyane, l'université de Lausanne et la direction interarmées du service de santé de Guyane.

Des études menées dans le modèle murin indiquent que la présence du LRV modifie la réponse immunitaire de l'hôte et entraîne une exacerbation des manifestations cliniques (Ives et al. 2011). Cette amplification de la réponse inflammatoire a également été rapportée chez *T. vaginalis*, en présence de TVV, dans le modèle humain *in vitro* (Fichorova et al. 2012). Ainsi, la présence du LRV pourrait jouer un rôle d'immunogène chez l'homme et influencer l'évolution de la maladie en modulant la réponse immunitaire de l'hôte. Comme évoqué dans l'axe précédent, le LRV pourrait également influencer la réponse aux traitements chez les patients, cependant son action ne semble pas passer directement par les parasites, puisque la présence du LRV n'influence pas la sensibilité *in vitro* des parasites. Ainsi, le but de cette étude est de déterminer l'impact du LRV dans l'évolution clinique de la maladie chez les patients. Ces travaux sont présentés dans les publications n°5, 6 et 7. La publication n°5 a été menée en collaboration avec l'Institut Pasteur de la Guyane et l'Université de Lausanne.

### Publication n°5 : Influence du LRV dans la leishmaniose humaine

**Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 in *Leishmania guyanensis* Increases the Risk of First-Line Treatment Failure and Symptomatic Relapse.** Bourreau E, Ginouves M, Prévot G, Hartley MA, Gangneux JP, Robert-Gangneux F, Dufour J, Sainte-Marie D, Bertolotti A, Pratloug F, Martin R, Schütz F, Couppié P, Fasel N, Ronet C. *J Infect Dis.* 2016 Jan 1;213(1):105-11. doi: 10.1093/infdis/jiv355. Epub 2015 Jun 29.

Cette étude visait à déterminer l'impact de la présence du LRV1 dans les réponses immunitaires et thérapeutiques des patients. Pour cela, 75 sujets ayant présenté une primo-infection de LCL due à *L. guyanensis* ont été suivis sur une période d'un an. La recherche de marqueurs inflammatoires, tels que les chimiokines (CCL5 et CXCL-10) et les cytokines (IL-6 et TNF- $\alpha$ ) a été entreprise à partir des biopsies des patients. La détection des LRV a été effectuée par qRT-PCR à partir des parasites contenus dans les biopsies. La mise en évidence des LRV à partir des parasites en culture a été effectuée en parallèle.

Les patients ont été traités par une administration intramusculaire de pentamidine en première intention. En absence de guérison au bout d'un mois, un second traitement à base de pentamidine a été administré. L'absence de guérison au bout d'un mois après la

seconde cure était considérée comme un échec du traitement dans le service de dermatologie du CHC. Dans ce cas, le patient était hospitalisé et traité au Glucantime®.

Parmi les 75 patients inclus dans l'étude, 44 étaient LRV (+). Neuf pourcent (9%, 4/44) de ces patients présentaient une infection persistante dans le mois suivant la 1<sup>ère</sup> cure de pentamidine. Ces patients ont reçu une 2<sup>ème</sup> cure de pentamidine. Tous ont guéri dans les 3 mois, sauf un patient qui a nécessité un traitement au Glucantime®, sans succès.

Au bout de 3 à 6 mois, après la guérison de tous les patients (hormis le patient résistant au Glucantime®), 12 patients LRV+ (12/44, 27%) présentaient une réactivation de la maladie. Ces résultats indiquent que la présence du LRV augmente de manière significative le risque d'échec au traitement et de rechute symptomatique ( $p=0,0009$ ). Ces patients ont nécessité l'administration d'une ou de deux doses de pentamidine ou un recours au Glucantime®.

En ce qui concerne la réponse inflammatoire, la présence du LRV était associée à une augmentation du niveau de marqueurs pro-inflammatoires intra-lésionnels tels que la CXCL-10 et l'IL-6, comme souligné dans le modèle murin.

Cette étude constitue la première à impliquer le LRV dans les échecs de traitements et les rechutes chez l'homme.

# Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 in *Leishmania guyanensis* Increases the Risk of First-Line Treatment Failure and Symptomatic Relapse

Eliane Bourreau,<sup>1</sup> Marine Ginouves,<sup>2</sup> Ghislaine Prévot,<sup>2</sup> Mary-Anne Hartley,<sup>4</sup> Jean-Pierre Gangneux,<sup>6,7</sup> Florence Robert-Gangneux,<sup>6,7</sup> Julie Dufour,<sup>3</sup> Dominique Sainte-Marie,<sup>3</sup> Antoine Bertolotti,<sup>3</sup> Francine Pralong,<sup>8,9,10</sup> Ricardo Martin,<sup>4</sup> Frédéric Schütz,<sup>5</sup> Pierre Couppié,<sup>2,3</sup> Nicolas Fasel,<sup>4</sup> and Catherine Ronet<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Immunologie des leishmanioses, Institut Pasteur de Guyane, <sup>2</sup>Ecosystèmes Amazoniens et Pathologie Tropicale – EA 3593 – Labex CEBA – Médecine Département, University of French Guiana, and <sup>3</sup>Service de Dermatologie, Centre Hospitalier de Cayenne, French Guiana; <sup>4</sup>Department of Biochemistry, University of Lausanne, Epalinges, and <sup>5</sup>Swiss Institute of Bioinformatics, University of Lausanne, Switzerland; <sup>6</sup>Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Rennes, <sup>7</sup>INSERM U1085–Institut de Recherches en Santé Environnement Travail, Université Rennes 1, <sup>8</sup>French National Reference Center of Leishmaniasis, Laboratory of Parasitology-Myology, University Montpellier 1, <sup>9</sup>University Hospital of Montpellier, and <sup>10</sup>CNRS 5290–IRD 224–University Montpellier 1 and 2, MiVEGEC, France

**Treatment failure and symptomatic relapse are major concerns in American tegumentary leishmaniasis (TL). Such complications are seen frequently in *Leishmania guyanensis* infections, in which patients respond variously to first-line antileishmanials and are more prone to develop chronic cutaneous leishmaniasis. The factors underlying this pathology, however, are unknown. Recently, we reported that a double-stranded RNA virus, *Leishmania* RNA virus 1 (LRV1), nested within *L. guyanensis* parasites is able to exacerbate experimental murine leishmaniasis by inducing a hyperinflammatory response. This report investigates the prevalence of LRV1 in human *L. guyanensis* infection and its effect on treatment efficacy, as well as its correlation to symptomatic relapses after the completion of first-line treatment. In our cohort of 75 patients with a diagnosis of primary localized American TL, the prevalence of LRV1-positive *L. guyanensis* infection was elevated to 58%. All patients infected with LRV1-negative *L. guyanensis* were cured after 1 dose (22 of 31 [71%]) or 2 doses (31 of 31 [100%]) of pentamidine. In contrast, 12 of 44 LRV1-positive patients (27%) presented with persistent infection and symptomatic relapse that required extended therapy and the use of second-line drugs. Finally, LRV1 presence was associated with a significant increase in levels of intra-lesional inflammatory markers. In conclusion, LRV1 status in *L. guyanensis* infection is significantly predictive ( $P = .0009$ ) of first-line treatment failure and symptomatic relapse and has the potential to guide therapeutic choices in American TL.**

**Keywords.** leishmaniasis; *L. guyanensis*; *Leishmania* RNA virus; drug treatment; pentamidine; mutualism exclusive.

Neotropical cutaneous leishmaniasis (American tegumentary leishmaniasis [TLs]) are well known to cause

particularly disfiguring inflammatory skin lesions that are variously responsive to recommended first-line therapies and prone to symptomatic relapse [1, 2]. American TL is most common in the Amazonian basin, with the predominant causative species being *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, and *Leishmania panamensis*. Between 5% and 10% of these infections progress to chronic disease, in which skin lesions form at sites distant to the site of inoculation by the sand fly, sometimes infesting and destroying the soft tissues of nasopharyngeal mucosa. These aggressive symptomatic outcomes have a distribution that strongly correlates to that of the parasite species,

Received 26 February 2015; accepted 9 June 2015.

Presented in part: Scientific Symposium of the Institute Pasteur International Network, Paris, France, September 2014; Amazonian Conference on Emerging and Infectious Diseases, Cayenne, French Guiana, September 2014.

Correspondence: Catherine Ronet, PhD, Department of Biochemistry, University of Lausanne, Chemin des Boveresses 155, CH-1066 Epalinges, Switzerland (catherine.ronet@unil.ch).

The Journal of Infectious Diseases®

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/infdis/jiv355

which, thus, implies the presence of parasite-intrinsic virulence factors. We recently demonstrated that the presence of a cytoplasmic double-stranded RNA (dsRNA) virus, *Leishmania* RNA virus 1 (LRV1), residing endosymbiotically within *L. guyanensis* acts as an aggravating factor in an experimental murine model. Here, the dsRNA genome of LRV1 triggered a potently inflammatory antiviral response, which worsened lesional swelling and prolonged parasite survival [3–5].

LRV is composed of a 5.3-kb dsRNA genome that encodes a nonenveloped capsid and an RNA-dependent RNA polymerase. It belongs to the *Totiviridae* family [6], a group of dsRNA viruses known to infect several species of the animal kingdom, including arthropods [7], fish [8], bats [9], and yeast [10]; molds (*Helminthosporium* species [11] and *Aspergillus* species [12]); and several human pathogens (*Trichomonas vaginalis* [13] and *Giardia lamblia* [14]). Recently, an inflammatory antiviral immune response to *Trichomonasvirus* within *T. vaginalis* has been linked to increased clinical complications during trichomoniasis, including susceptibility to preterm birth and human immunodeficiency virus (HIV) infection [15]. The magnitude of the prevalence of microbial viruses nested within pathogenic species and their arthropod vectors creates great evolutionary potential for similar hyperpathogenic partnerships [16].

So far, LRV has been isolated from various *Leishmania* species, which are commonly associated with the occurrence of chronic, disseminated, diffuse, or mucocutaneous lesions [17], such as *L. guyanensis* [5, 18], *L. braziliensis* [19] and *Leishmania aethiopica* [20]. For instance, *L. guyanensis* parasites have a tendency to metastasize, forming satellite papules and adenopathy in draining lymph nodes [2, 21], sometimes evolving into chronically inflamed lesions, which are prone to treatment failure and symptomatic relapse [1, 22, 23]. While the role of LRV1 as an aggravating factor during *L. guyanensis* infection has been convincingly tested in a murine model [5], no studies have yet investigated its role in human disease or treatment efficacy. More importantly, the prevalence of LRV1 endosymbiosis in *L. guyanensis* is completely unknown.

In this study, a cohort of 75 human patients with a diagnosis of uncomplicated acute cutaneous leishmaniasis caused by *L. guyanensis* was investigated for the prevalence of LRV1 coinfection and its association with treatment failure or symptomatic relapse. We observed a 58% prevalence of LRV1 in our cohort of *L. guyanensis*-infected patients, which was significantly correlated with increased intra-lesional inflammation, first-line treatment failure, and increased risk of symptomatic relapse.

## METHODS

### Patients

Ethical approval for the study was granted on the basis of the human experimentation guidelines of the Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche

(2012–42) and the Commission nationale de l'informatique et des libertés (DR.2014-091), as well as the regulations of Cayenne Hospital (available at: <http://www.ch-cayenne.net/Droits-et-Devoirs.html>).

Adult patients with a diagnosis of cutaneous leishmaniasis contracted in French Guiana were enrolled into the study after providing informed consent at Cayenne Hospital in French Guiana (88 patients) or at Rennes Hospital in France (16 patients, all of whom were soldiers who had been stationed in French Guiana, as previously described [1]).

Inclusion criteria for the study were a new diagnosis of cutaneous leishmaniasis, no history of antileishmanial drugs, and a self-reported lesion history of <4 months. HIV testing was conducted on an opt-in basis and was a requirement for preselection; only HIV-negative patients were included, to maintain immunocompetence within the cohort (Supplementary Figure 1). Only patients who attended all monthly follow-up visits (until they were considered to have been cured) were included in the final analysis (21 patients were excluded). Relapses were recorded sporadically, based on the patient's decision to return to the clinic during the 1-year period after their initial diagnosis. To avoid underestimation of relapse, all patients who did not return to the hospital were contacted by telephone to confirm the absence of disease recurrence after the initial treatment. Further, only patients infected with *L. guyanensis* were selected, because cohorts of patients infected with other *Leishmania* species were too small to be considered (8 patients were excluded, of whom 7 had *L. braziliensis* infection and 1 had *L. amazonensis* infection). A lesional biopsy specimen obtained from all 104 patients enrolled under these criteria (92 adult males and 12 adult females; age range, 18–63 years) underwent testing for LRV1. LRV1 status was then used to split the cohort into LRV1-positive and LRV1-negative groups for statistical analysis of treatment responsiveness and symptomatic relapse.

Overall, 75 patients met the eligibility criteria for inclusion in the second part of the study. These patients underwent extensive clinical examination, including localization, measurement and enumeration of lesions. Further leishmanial diagnostic analysis, typing, and quantification of inflammatory mediators was performed on a 3-mm punch biopsy specimen obtained from the lesional border before the beginning of treatment.

### Leishmanial Diagnostic Analyses

Initial diagnostic analyses adhered to the local standard guidelines. When possible, serous dermal fluid was extracted from the lesion border to produce a smear for microscopic analysis by May-Grünwald Giemsa staining. This was accompanied by a 3-mm intra-lesional punch biopsy specimen, which was split into 2 segments: one for starting an *in vitro* parasite culture (on Novy–MacNeal–Nicolle medium, Roswell Park Memorial Institute medium containing 10% fetal calf serum, or Schneider

medium) and the other for quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis of LRV1 and inflammatory markers. Phylogenetic restriction fragment-length polymorphism (RFLP)–PCR analysis was performed on parasite cultures based on a conserved isoenzyme polymorphism, as previously described [24].

#### LRV and Inflammatory Marker Detection in Biopsy Specimens

Total RNA was isolated as previously described, using the RNeasy mini kit (Qiagen) [25]. First-strand complementary DNA (cDNA) was synthesized from total RNA, using a first-strand cDNA synthesis kit (Superscript III first strand synthesis system, Invitrogen). qRT-PCR was performed on a 7300 Real Time System (Applied Biosystems). FAM-MGB-labeled primer/probe sets for LRV1, *Kmp11* (as endogenous control) were designed with Primer Express software from Applied Biosystems. The *L. guyanensis* strain MHOM/BR/75/M4147 and the *L. panamensis* strain MHOM/PA/1971/LS94 were used as positive and negative controls, respectively. Primer sequences were as follows: *Kmp11*-F, 5′-GAGCACACGGAGAAGATCAAC A-3′; *Kmp11*-R, 5′-CAAGCAGCTCAGCGAACTTG-3′; *Kmp11*-MGB probe, 5′-FAM-CTCGGAGCACTTCAA-3′; LRV1-F, 5′-GAGTGGGAGTCCCCACAT-3′; LRV1-R, 5′-TGGATA-CAACCAGACGATTGCT-3′; and LRV1 MGB probe, 5′-FAM CATTATGTAGTTCCT-3′.

Inflammatory markers were analyzed using FAM-MGB-labeled primer/probe sets for CCL5 (Hs00174575-m1), CXCL10 (Hs00171042-m1), interleukin 6 (IL-6; Hs00985639-m1), tumor necrosis factor  $\alpha$  (Hs00174128-m1), and  $\beta$ -actin (Hs 99999903-m1 as an endogenous control); all were purchased from Applied Biosystems. The default ABI 7300 thermal cycling conditions were used: 1 cycle for 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles at 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C.

#### LRV Detection in Parasite Isolates

*L. guyanensis* isolated from biopsy specimens from patients infected in French Guiana were collected in the *Leishmania* reference Centers of Cayenne (16 isolates), Montpellier (21 isolates; BioBank number BB-0033-00052), and the Institut Pasteur de Guyane (17 isolates; collection number 2010–1223-3). Parasite cultures were expanded in vitro in complete Schneider medium and were tested for LRV by dot blot, using an antibody recognizing dsRNA irrespective of its underlying sequence (J2; English and Scientific Consulting), as previously described [19]. Similar results were obtained with dot blots and RT-PCR analysis, using primers described above.

#### Antileishmanial Treatment Strategy

Treatment was administered according to standard local guidelines. In Cayenne Hospital, this comprised first-line therapy with pentamidine isethionate (Pentacarinat, Sanofi-Aventis)

administered in a single injection of 7 mg/kg. In the event that lesions showed no sign of healing after 1 month, the same dose of pentamidine was administered a second time. If lesions persisted for a further month after the second administration, patients were classified as unresponsive to first-line treatment and then hospitalized to receive a 20-day course of meglumine antimoniate (Glucantime) at a dosage of 20 mg/kg/day.

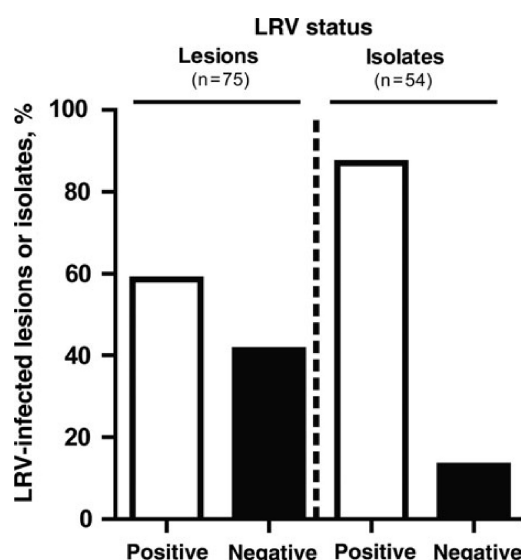
#### Statistical Analysis

Given the small sample sizes, the Fisher exact test was used to determine significant differences in clinical outcome between LRV1-positive and LRV1-negative groups. The Student *t* test was used to detect significant correlations between cytokine production and LRV1 status.

## RESULTS

Members of the *L. guyanensis* species are endemic to the northern Amazonian basin [24], which includes the patient catchment area of Cayenne Hospital in French Guiana, where our cohort was recruited. Cutaneous leishmaniasis was diagnosed using routine local diagnostic techniques on a lesional exudate. Before treatment, a 3-mm intra-lesional punch biopsy was performed on 104 patients who satisfied the selection criteria (HIV negative, a visible lesion for  $\leq 4$  months, and no previous history of leishmaniasis; [Supplementary Figure 1](#)). Parasite phylogeny was determined by RFLP-PCR, to restrict our study to *L. guyanensis* species. As expected, the vast majority of infections (involving 96 of 104 patients [ $>90\%$ ]) conformed to the *L. guyanensis* genotype. The remaining 8% were either *L. braziliensis* (7 patients) or *L. amazonensis* (1 patient) and formed a cohort too small to be considered for further analysis. A further 21 patients were excluded because they did not complete the required follow-up visits or adhere to treatment guidelines. Thus, 75 of 104 patients qualified for inclusion in the clinical cohort ([Supplementary Figure 1](#)).

Lesional tissue specimens were investigated for the presence of LRV1 by qRT-PCR, which amplified a previously described conserved region of viral dsRNA, controlled to the parasitic housekeeping gene *kmp11* [19]. Of the 75 patients, 44 tested positive for LRV1 (prevalence, 58%; [Figure 1](#)). To ensure that our results were not skewed by restricted intra-lesional parasite numbers, cultures of parasites isolated from 54 patients infected in French Guiana and preserved in the *Leishmania* reference centers collection were also investigated for the presence of LRV1 by immunoblotting, using an antibody that recognizes dsRNA irrespective of its sequence [19]. Interestingly, 47 of 54 cultures (87%) tested positive for LRV1 by immunoblotting ([Figure 1](#)). Taken together, findings for all samples and from all techniques revealed a high prevalence of LRV1 in French Guiana, ranging from 58% for lesions to 87% for isolates.



**Figure 1.** Prevalence of *Leishmania* RNA virus 1 (LRV1) in parasites isolated from patients with cutaneous leishmaniasis in French Guiana. The presence of LRV1 was determined by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction in 75 biopsy specimens from patients with a diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis* and 54 *L. guyanensis* isolates preserved in *Leishmania* reference centers.

In the early stages of infection under which patients were enrolled (ie, the presence of a cutaneous lesion for <4 months), no differences in age, sex, anatomical lesion location, or appearance

**Table 1. Clinical Data for Patients With American Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania* RNA Virus 1 (LRV1)-Positive or LRV1-Negative *Leishmania guyanensis* Parasites**

Characteristic	LRV1-Positive Parasites (n = 44)	LRV1-Negative Parasites (n = 31)
Age, y, median	35	41
Sex		
Male	41	25
Female	3	6
Lesion no.		
1	57 (25)	42 (13)
1 with satellite papule(s)	18 (8)	10 (3)
2	11 (5)	39 (12)
≥3	14 (6)	10 (3)
Lesion location		
Face	5	2
Neck	2	2
Trunk	2	2
Arm, wrist	16	14
Hand	2	1
Leg, foot	18	13
Unlocalized	5	5

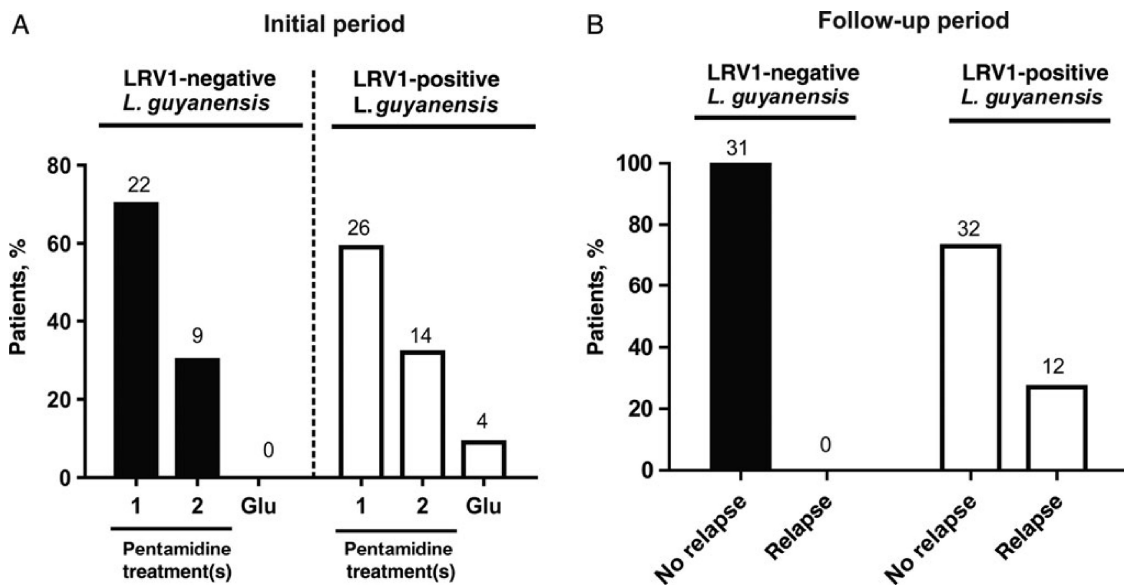
Data are no. or % (no.) of patients.

could be related to either LRV1-positive or LRV1-negative patient groups (Table 1). As mentioned in “Methods” section, all enrolled patients were HIV negative and did not have comorbidities. After this initial investigation, and without regard to their LRV1 status, all patients were admitted for receipt of standard first-line antileishmanial therapy with pentamidine isethionate (intramuscular injections of 7 mg/kg). If active lesions persisted at the follow-up appointment 1 month later, a second round of therapy was administered. Patients who were not cured by this second dose of pentamidine and whose lesions persisted for a third month were offered meglumine antimoniate (20 mg/kg/day for 21 days).

Significant differences in treatment patterns were observed between patients from LRV1-positive and LRV1-negative groups (Figure 2). During the initial period of treatment, while the majority of infections (involving 71 of 75 patients [95%]) were clinically resolved after 1 or 2 doses of pentamidine, the remaining infections (in 4 patients [5%]) who developed persistent lesions were all from the LRV1-positive group (Figure 2A). Three of these 4 patients were cured by administration of the second-line drug, meglumine antimoniate. Thus, the overall cure rate was 99% over the 3-month treatment period. The last nonresponding patient was eventually cured several months later by a repeated administration of pentamidine.

All 74 patients cured within the 3-month treatment window were followed over the subsequent year to monitor for disease reactivation or other complications. During this follow-up, 12 of the 74 patients reported a reactivation of the disease after a 3–6-month period without symptoms (Figure 2B). Thus, including the patient who was unresponsive to meglumine antimoniate, 13 of the 75 patients in our cohort presented with relapsed disease. Notably, each of these 13 patients was infected by LRV1-positive *L. guyanensis* parasites (13 of 44 LRV1-positive patients [30%]). No symptomatic relapse was observed in any of the LRV1-negative *L. guyanensis* infections. The correlation between LRV1 presence and symptomatic relapse was highly significant ( $P = .0009$ , by the Fisher exact test). These 13 patients necessitated additional administrations of pentamidine isethionate (1 dose for 9 of 12 patients [75%] and 2 doses for 1 of 12 patients [8%]) or meglumine antimoniate (for 2 of 12 patients [17%]) to achieve symptomatic resolution. All 75 patients remained symptom free over the following 12 months.

At a macroscopic level, patients infected with LRV1-positive *L. guyanensis* and those infected with LRV1-negative *L. guyanensis* was associated with similar frequencies of lymphangitis and adenopathy (Supplementary Figure 2). Interestingly, patients with LRV1-positive *L. guyanensis* infection had a tendency (albeit not statistically significant) to develop more clinically palpable signs of lymphangitis and/or adenopathy (Supplementary Figure 2). In addition, significant differences were revealed in levels of intra-lesional inflammatory markers, which are in



**Figure 2.** *Leishmania* RNA virus 1 (LRV1) is associated with clinical relapse. *A*, During the initial period of the study, immunocompetent adult patients with newly diagnosed *Leishmania guyanensis* infection who presented with  $\geq 1$  cutaneous lesion(s) were monitored for treatment responsiveness according to the following treatment guidelines: 1 dose of 7 mg/kg pentamidine (followed by a second dose if lesions remained unresponsive after 1 month). Administration of the second-line treatment, 20 mg/kg/day meglumine antimoniate (Glu) for 21 days, was indicated for lesions unresponsive to 2 doses of pentamidine. Numbers of patients are indicated above bars. *B*, During the follow-up period, disease relapse was monitored in previously cured patients presented in panel *A* and compared between LRV1– negative and LRV1+ positive infected patients. Numbers of patients are indicated above bars.  $P = .0009$ , via the Fisher exact test.

accorded with findings from our previously described murine model of *L. guyanensis* infection. LRV-positive *L. guyanensis* lesions, irrespective of their ability to relapse, had higher levels of CXCL-10 and IL-6 transcripts, compared with their LRV1-negative counterparts (Figure 3). Because the patients with relapse and increased levels of inflammatory markers were all infected by LRV1-positive *L. guyanensis*, this observation supports our experimental hypothesis that LRV1 is associated with clinical signs of inflammation and is able to act as a virulence factor in leishmaniasis.

## DISCUSSION

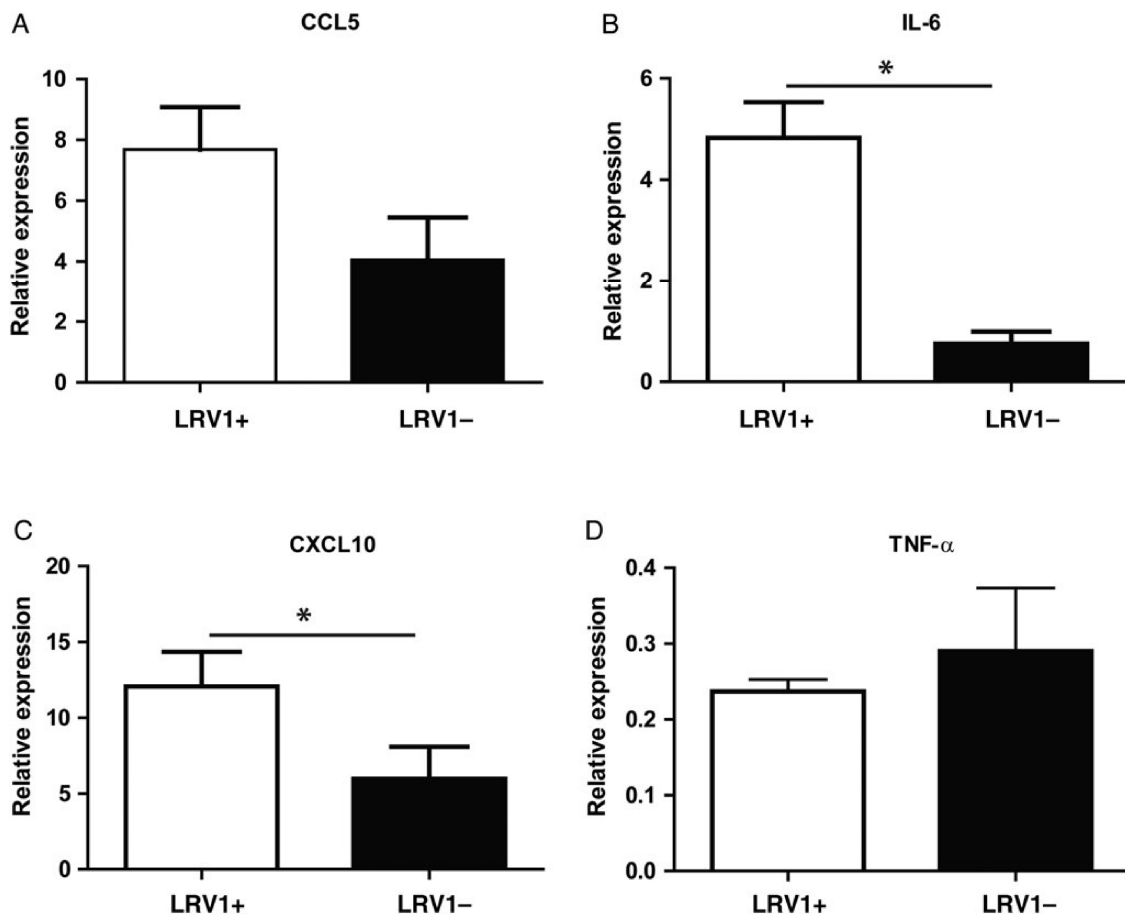
The viral endosymbiont LRV1 was discovered in the cytoplasm of *L. guyanensis* several decades ago [18, 26], but its potential as a clinical determinant and aggravating factor in cutaneous leishmaniasis was only recently hypothesized [5]. No epidemiological studies have yet described its geographical prevalence or correlation to human disease. Albeit on a small scale, this is the first study to investigate the prevalence of LRV1 in *L. guyanensis* infection in an endemic region and substantiate its proposed pathogenic role in human infection.

LRV1 was detected and verified by a variety of techniques on freshly isolated lesional biopsy specimens and parasite cultures. Our study found a high LRV1 prevalence in randomly selected samples from the patient catchment area of Cayenne Hospital

in French Guiana, as well as in patients returning from this area (who were recruited at Rennes Hospital in France). It is interesting to note that the LRV1 prevalence was higher in parasites isolates than in biopsy specimens.

The LRV1 typing results obtained in our French Guiana cohort were then used to investigate the association between LRV1 and the occurrence of inflammatory leishmanial pathology, first-line treatment failure, and symptomatic relapse. For this, we selected only immunocompetent patients infected with *L. guyanensis*. Our results showed that the presence of LRV1 in human *L. guyanensis* infections was significantly associated with increased of intra-lesional inflammation as well as disseminate inflammation. Strikingly, no patients with LRV1-negative *L. guyanensis* infection in our cohort experienced first-line treatment failure or symptomatic relapse. The 30% of patients experiencing such complications all had LRV1-positive *L. guyanensis* infections. These patients had a higher tendency to develop clinical and molecular signs of inflammation and required additional antileishmanial treatments to resolve their lesions. As during the follow-up period, the patient enrollment was passive and based on the patient's decision to return to the hospital; all other patients were contacted directly by telephone to definitively confirm the absence of relapse.

Cutaneous leishmaniasis caused by *L. guyanensis* has long been associated with macroscopic signs of inflammation and the occurrence of infectious metastasis in French Guiana,



**Figure 3.** *Leishmania* RNA virus 1 (LRV1) is associated with increased intra-lesional inflammation. Transcripts of the inflammatory cytokines CCL5 (A), CXCL10 (C), interleukin 6 (IL-6; B), and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; D) were measured by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction in total RNA extracted from 8 LRV1-positive and 8 LRV1-negative intra-lesional biopsy specimens. Values of the different markers were normalized to endogenous levels of actin messenger RNA and are represented as arbitrary units. Data are means  $\pm$  standard error of the mean. \* $P < .05$ , by a 2-sample, 2-sided Student *t* test.

which elsewhere were attributed to the resistance of *L. guyanensis* to conventional antileishmanial treatment [27]. Our studies, however, found no significant difference in drug susceptibility between LRV1-positive and LRV1-negative *L. guyanensis* after in vitro exposure to various concentrations of pentamidine isethionate (data not shown). Similarly, no links between the presence of LRV1 and *L. braziliensis* drug resistance were established in the companion article by Adauí et al. In addition, these authors also demonstrated that resistance among LRV1-bearing strains was not linked to a preferential cosegregation of parasite nuclear or kinetoplast genes.

Quantification of parasites in biopsy specimens and of LRV1 in parasites by qRT-PCR revealed a wide degree of variability among the LRV1-positive *L. guyanensis* isolates, preventing an analysis of a correlation between the parasite number, the ratio of the LRV1 load per parasite, and a specific disease outcome (data not shown). Further, the LRV1 load per parasite

within LRV1-positive isolates did not correlate to variations in the total parasite number. The intra-lesional parasite burden is known to fluctuate widely during the course of human leishmaniasis, according to numerous and unpredictable immunological parameters, and thus variability in total parasite number is anticipated, owing to variations in the disease time frame associated with collection of biopsy specimens (ie, 15 days to 4 months after infection onset). Thus, LRV1-positive *L. guyanensis* strains were significantly correlated to treatment failure and relapse irrespective of the LRV1 charge per parasite. This observation indicates that LRV1 has a low threshold for pathology in human infection, in which even parasites hosting smaller LRV1 burdens are able to negatively influence disease outcome. Interestingly, the LRV1 presence in *Leishmania* parasites also influences *L. braziliensis* infection, as revealed in the companion report by Adauí et al, which describes an association between the presence of LRV1 in *L. braziliensis* and treatment failure.



Whether and how the LRV1 burden is influenced in an in vivo infection is worth further investigation.

Taken together, the data from this study show that the LRV1 status among *L. guyanensis* could be predictive of clinical complications such as first-line treatment failure, increased inflammation, and symptomatic relapse. Thus, LRV diagnostic assays could guide treatment strategies, to better predict, avoid, and manage the complications of metastatic leishmaniasis.

## Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online (<http://jid.oxfordjournals.org>). Supplementary materials consist of data provided by the author that are published to benefit the reader. The posted materials are not copyedited. The contents of all supplementary data are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding errors should be addressed to the author.

## Notes

**Acknowledgments.** We thank Stephen Beverley (Washington University, St Louis, Missouri) and Jean-Claude Dujardin (Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium), for discussions and communications of unpublished data; the Pôle Intégré de Recherche Clinique of the Pasteur Institute, notably Nathalie Jolly, who facilitated the ethical approval, and Prof Pascal Launois, for helpful discussion; and Stéphane Simon, Loïc Tagliagnani, and Patrick Lami, for their contribution regarding the *Leishmania* parasite cultures.

**Financial support.** This work was supported by the Bill and Melinda Gates Foundation (Grand Challenges Explorations grant OPP1056785 to C. R. and M.-A. H.), the Pierre Mercier Foundation (to C. R.), the Guiana Pasteur Institute-Cayenne (to E. B.), the French Ministry for Higher Education and Research (to E. B.), and the National Fund for Scientific Research (grants 3100A0-116665/1 and 310030-135616 to N. F.).

**Potential conflicts of interest.** All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

## References

- Gangneux JP, Sauzet S, Donnard S, et al. Recurrent American cutaneous leishmaniasis. *Emerg Infect Dis* **2007**; 13:1436–8.
- Dedet JP, Pradinaud R, Gay F. Epidemiological aspects of human cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1989**; 83:616–20.
- Ronet C, Beverley SM, Fasel N. Muco-cutaneous leishmaniasis in the New World: the ultimate subversion. *Virulence* **2011**; 2:547–52.
- Hartley MA, Ronet C, Zangger H, Beverley SM, Fasel N. Leishmania RNA virus: when the host pays the toll. *Front Cell Infect Microbiol* **2012**; 2:99.
- Ives A, Ronet C, Prevel F, et al. Leishmania RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science* **2011**; 331:775–8.
- Widmer G, Patterson JL. Genomic structure and RNA polymerase activity in Leishmania virus. *J Virol* **1991**; 65:4211–5.
- Zhai Y, Attoui H, Mohd Jaafar F, et al. Isolation and full-length sequence analysis of Armigeres subalbatius totivirus, the first totivirus isolate from mosquitoes representing a proposed novel genus (Artivirus) of the family Totiviridae. *J Gen Virol* **2010**; 91:2836–45.
- Haugland O, Mikalsen AB, Nilsen P, et al. Cardiomyopathy syndrome of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is caused by a double-stranded RNA virus of the Totiviridae family. *J Virol* **2011**; 85:5275–86.
- Yang X, Zhang Y, Ge X, Yuan J, Shi Z. A novel totivirus-like virus isolated from bat guano. *Arch Virol* **2012**; 157:1093–9.
- Wesolowski M, Wickner RB. Two new double-stranded RNA molecules showing non-mendelian inheritance and heat inducibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **1984**; 4:181–7.
- Huang S, Ghabrial SA. Organization and expression of the double-stranded RNA genome of Helminthosporium victoriae 190S virus, a totivirus infecting a plant pathogenic filamentous fungus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**; 93:12541–6.
- Kozlakidis Z, Herrero N, Coutts RH. The complete nucleotide sequence of a totivirus from Aspergillus foetidus. *Arch Virol* **2013**; 158:263–6.
- Liu HW, Chu YD, Tai JH. Characterization of Trichomonas vaginalis virus proteins in the pathogenic protozoan T. vaginalis. *Arch Virol* **1998**; 143:963–70.
- Miller RL, Wang AL, Wang CC. Purification and characterization of the Giardia lamblia double-stranded RNA virus. *Mol Biochem Parasitol* **1988**; 28:189–95.
- Fichorova RN, Lee Y, Yamamoto HS, et al. Endobiont viruses sensed by the human host - beyond conventional antiparasitic therapy. *PLoS One* **2012**; 7:e48418.
- Hartley MA, Ronet C, Fasel N. Backseat drivers: the hidden influence of microbial viruses on disease. *Curr Opin Microbiol* **2012**; 15:538–45.
- Salinas G, Zamora M, Stuart K, Saravia N. Leishmania RNA viruses in Leishmania of the Viannia subgenus. *Am J Trop Med Hyg* **1996**; 54:425–9.
- Tarr PI, Aline RF Jr, Smiley BL, Scholler J, Keithly J, Stuart K. LR1: a candidate RNA virus of Leishmania. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**; 85:9572–5.
- Zangger H, Ronet C, Desponds C, et al. Detection of leishmania RNA virus in leishmania parasites. *PLoS Negl Trop Dis* **2013**; 7:e2006.
- Zangger H, Hailu A, Desponds C, et al. Leishmania aethiopia field isolates bearing an endosymbiotic dsRNA virus induce pro-inflammatory cytokine response. *PLoS Negl Trop Dis* **2014**; 8:e2836.
- Couppie P, Clyti E, Sainte-Marie D, Dedet JP, Carme B, Pradinaud R. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to Leishmania guyanensis: case of a patient with 425 lesions. *Am J Trop Med Hyg* **2004**; 71:558–60.
- Guerra JA, Prestes SR, Silveira H, et al. Mucosal Leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Viannia) guyanensis in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis* **2011**; 5:e980.
- Rotureau B, Ravel C, Nacher M, et al. Molecular epidemiology of Leishmania (Viannia) guyanensis in French Guiana. *J Clin Microbiol* **2006**; 44:468–73.
- Simon S, Veron V, Carme B. Leishmania spp. identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis and its applications in French Guiana. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2010**; 66:175–80.
- Bourreau E, Prevot G, Gardon J, Pradinaud R, Launois P. High intralesional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment. *J Infect Dis* **2001**; 184:1628–30.
- Widmer G, Comeau AM, Furlong DB, Wirth DF, Patterson JL. Characterization of a RNA virus from the parasite Leishmania. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989**; 86:5979–82.
- Nacher M, Carme B, Sainte Marie D, et al. Influence of clinical presentation on the efficacy of a short course of pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Ann Trop Med Parasitol* **2001**; 95:331–6.

Données supplémentaires :

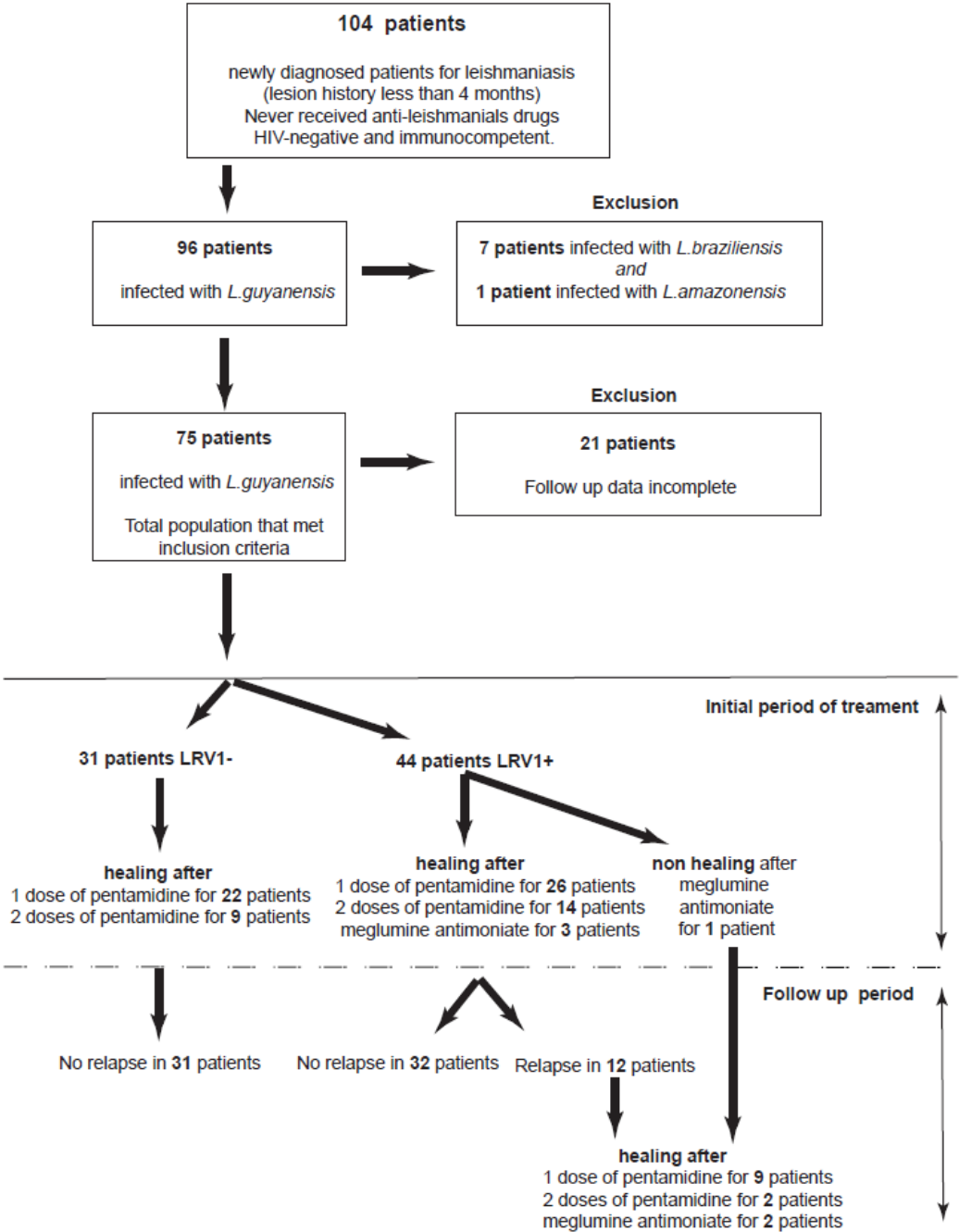
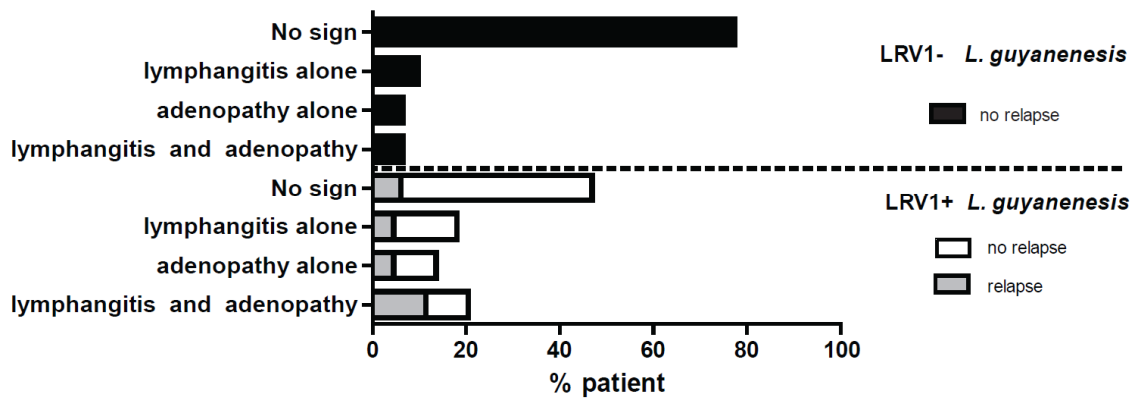


Fig S1: Flow chart for study inclusion and exclusion, as well as patient evolution after treatment.



**Fig S2: Occurrence of lymphangitis and adenopathy in ACL patients.**

Data are presented as percentage of patients developing no symptoms, lymphangitis alone, adenopathy alone or both lymphangitis and adenopathy after infection with both LRV1- or LRV1+ *L.g.*

L'étude présentée dans la publication n°6, effectuée parallèlement à la précédente, a été menée en collaboration avec la direction interarmées du service de santé de Guyane. Elle avait pour but d'identifier les facteurs associés aux échecs de traitement à la pentamidine, tels que l'âge des patients, le nombre de lésions, le diamètre des lésions, la dissémination des lésions, le séjour en site minier, la présence de LRV, le temps écoulé entre le diagnostic et le traitement et la voie d'administration de la pentamidine.

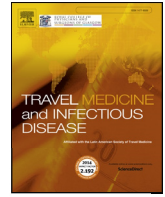
### **Publication n°6 : Influence de la voie d'administration de la pentamidine dans l'échec thérapeutique**

**Use of the intramuscular route to administer pentamidine isethionate in *Leishmania guyanensis* cutaneous leishmaniasis increases the risk of treatment failure.** Christen JR, Bourreau E, Demar M, Lightburn E, Couppié P, Ginouvès M, Prévot G, Gangneux JP, Savini H, de Laval F, Pommier de Santi V, Briolant S. *Travel Med Infect Dis.* 2018 Jul - Aug;24:31-36. doi :10.1016/j.tmaid.2018.02.010. Epub 2018 Mar 1.

Cette étude a été menée à partir d'une population militaire ayant séjourné en Guyane. Elle regroupait 73 militaires ayant contracté une leishmaniose due à *L. guyanensis* en Guyane entre décembre 2013 et juin 2016. Les patients présentant une leishmaniose ont été traités à la pentamidine par voie intraveineuse ou intramusculaire. Une absence de guérison de la lésion au bout de 6 semaines était considérée comme étant un échec de traitement. Dans ce cas, un second traitement à la pentamidine était administré.

La détection des LRV a été effectuée par qRT-PCR à partir de parasites issus des biopsies ou des cultures cellulaires. Les autres données, telles que l'âge des patients, le lieu géographique de contamination, le nombre de lésions, la dissémination des lésions, le diamètre des lésions, les effets secondaires et le temps écoulé entre le diagnostic et le traitement ont également été collectées au cours de ces travaux.

Parmi les différentes variables analysées, seule la voie d'administration de la pentamidine ressortait de manière significative ( $p=0,002$ ) comme facteur d'échec thérapeutique. En effet, les injections intraveineuses (IV) permettaient d'obtenir des taux de guérison plus satisfaisants, de l'ordre de 85,3%, comparativement aux injections intramusculaires (IM), dont l'efficacité chutait à 51,3%. En ce qui concerne l'analyse des autres variables, aucune ne ressortait comme étant associée aux échecs thérapeutiques. De plus, contrairement à ce qui a été décrit dans les précédents travaux, la présence du LRV n'était pas associée aux échecs thérapeutiques. L'étude montre que le virus n'était pas non plus associé au nombre, à la taille et à la dissémination des lésions. Le seul facteur identifié, dans cette étude, comme étant associé aux échecs thérapeutiques dans les LC dues à *L. guyanensis* en Guyane, était l'administration de la pentamidine par voie intramusculaire, ce qui pourrait être dû à une biodisponibilité plus faible comparativement à une administration par voie intraveineuse et/ou une dose reçue par kg moindre (12mg/kg si IV versus 7mg/kg si IM).



## Use of the intramuscular route to administer pentamidine isethionate in *Leishmania guyanensis* cutaneous leishmaniasis increases the risk of treatment failure



Jacques-Robert Christen<sup>a,\*</sup>, Eliane Bourreau<sup>b</sup>, Magalie Demar<sup>c,d</sup>, Edward Lightburn<sup>a</sup>, Pierre Couppié<sup>c,e</sup>, Marine Ginouvès<sup>c</sup>, Ghislaine Prévot<sup>c</sup>, Jean-Pierre Gangneux<sup>f</sup>, Hélène Savini<sup>a</sup>, Frank de Laval<sup>g,h</sup>, Vincent Pommier de Santi<sup>g,h,1</sup>, Sébastien Briolant<sup>g,i,j,1</sup>

<sup>a</sup> Laveran Military Teaching Hospital, Department of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Marseille, France

<sup>b</sup> Immunology Laboratory for Leishmaniasis, Institut Pasteur in French Guiana, Cayenne, French Guiana

<sup>c</sup> Amazonian Ecosystems and Tropical Pathologies-EA 3593-Labex CEBA-Department of Medicine, University of French Guiana, Cayenne, French Guiana

<sup>d</sup> Laboratory of Parasitology-Mycology, Andrée Rosemon Hospital, Cayenne, French Guiana

<sup>e</sup> Department of Dermatology, Andrée Rosemon Hospital, Cayenne, French Guiana

<sup>f</sup> Rennes University Hospital, Parasitology-Mycology Laboratory, Inserm U1085-Research Institute for Environmental and Occupational Health (IRSET), 35000 Rennes, France

<sup>g</sup> French Armed Forces Medical Health Service, French Guiana, France

<sup>h</sup> French Armed Forces Center for Epidemiology and Public Health, Marseille, France

<sup>i</sup> Armed Forces Biomedical Research Institute, Brétigny-sur-Orge, France

<sup>j</sup> URMITE, Aix-Marseille University, UM63, CNRS 7278, IRD 198, INSERM 1095, IHU - Méditerranée Infection, Marseille, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

French Guiana  
Military personnel  
*Leishmania guyanensis*  
Pentacarinat  
Intravenous

### ABSTRACT

**Background:** New world cutaneous leishmaniasis (NWCL) can be found in French Guiana as well as in several other parts of Central and South America. *Leishmania guyanensis* accounts for nearly 90% of cases in French Guiana and is treated with pentamidine isethionate, given by either intramuscular or intravenous injection. The military population is particularly exposed due to repeated missions in the rainforest. The purpose of the present study was to identify the factors associated with pentamidine isethionate treatment failure in a series of service members with *L. guyanensis* NWCL acquired in French Guiana.

**Method:** All the French service members reported as having acquired leishmaniasis in French Guiana from December 2013 to June 2016 were included.

**Results:** Seventy-three patients infected with *L. guyanensis* were included in the final analysis. Patients treated with IV pentamidine isethionate had better response rates than those treated with IM pentamidine isethionate ( $p = 0.002$ , adjusted odds ratio (AOR) = 0.15, 95% CI [0.04–0.50]). The rate of treatment success was 85.3% (95% CI [68.9–95.0]) for IV pentamidine isethionate and 51.3% (95% CI [34.8–67.6]) for IM pentamidine isethionate.

**Conclusions:** The use of intramuscular pentamidine isethionate in the treatment of *Leishmania guyanensis* cutaneous leishmaniasis is associated with more treatment failures than intravenous pentamidine isethionate.

### 1. Introduction

Cutaneous leishmaniasis seems to be a growing concern in endemic countries [1] and among travelers [2]. New world cutaneous leishmaniasis (NWCL), also called American tegumentary leishmaniasis, is endemic in several parts of Central and South America. In French Guiana, a French overseas entity in South America located between Suriname and Brazil,

five species of parasite are known to infect humans: *Leishmania guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. lainsoni*, and *L. naiffi* [3]. *L. guyanensis*, a species of the *Viannia* subgenus, is restricted to the rainforests of Brazil, Colombia, Guyana, Suriname, and French Guiana. It is the predominant species in French Guiana, accounting for nearly 90% of cases [3,4]. It is transmitted by a sand fly vector, *Lutzomyia umbratilis*. The main reservoir is the two-toed sloth (*Choleopus didactylus*) [5].

\* Corresponding author. Laveran Military Teaching Hospital, Department of Infectious Diseases and Tropical Medicine, 34, bd Laveran - CS 50004, Marseille, 13384, France.  
E-mail address: [jako.christen@gmail.com](mailto:jako.christen@gmail.com) (J.-R. Christen).

<sup>1</sup> Dr. Pommier de Santi and Dr. Briolant contributed equally to this work.

In French Guiana, the military population is particularly exposed to the parasite's life cycle during repeated missions in the rainforest to control illegal gold mining [6], and even more during training periods at the Tropical Forest Training Center (Global Positioning System decimal degrees: 4.281285, -52.157639), a historical focus of NWCL [7–9]. Service members are trained there for several weeks and are exposed to the sand flies through various physical activities (including tree felling), occasionally at night.

Each year, fluctuations in incidence depend on the occurrence of military activities during seasonal peaks in the parasite's life cycle, which usually occur during the first semester, and on occasional outbreaks when preventive measures are misapplied [7–10]. Since each service member diagnosed with NWCL becomes unavailable until cured, the disease can strongly impact military operational capabilities. Therefore, the French Military Health Service is looking for the most effective and simple treatment to limit the period of unavailability.

Only a few studies have addressed improvement following treatment for NWCL in French Guiana [9–11]. The reported rates of treatment success vary widely. It was 89% in a study by Nacher et al., in 2001 [12] and 58% in a study by Neves et al., in 2011 after one round of treatment [13]. The current French treatment recommendations for *L. guyanensis* are to use intravenous (IV) or intramuscular (IM) pentamidine isethionate [5]. The choice of route of administration is left to the judgment of the physician. In fact, IM treatment is chosen in a large majority of cases [14]. In French Guiana, the habitual procedure is to use IM treatment because the most exposed populations in the forest are migrants, illegal gold miners who are usually poorly compliant and can be reluctant to be hospitalized. The IV route of administration for pentamidine isethionate is the preferred one in the United States and Canada according to the recent Infectious Diseases Society of America and American Society of Tropical Medicine and Hygiene guidelines, but without any study to support this choice [15]. Thus, evidence about the effect of the route of pentamidine isethionate administration on the treatment of NWCL due to *L. guyanensis* is needed.

Several factors are associated with treatment failure: geographic distribution [15], *Leishmania* species [15,16], meteorological parameters [17], dissemination [12], higher number of lesions [14,18], younger age [18], early or delayed treatment [18,19], shorter duration of exposure in an endemic region [18], intralesional interleukin-10 and Foxp3 mRNA expression [20], and HIV co-infection [21]. Some of these factors may appear paradoxical and could account for a poor immune response [22].

In addition, *Leishmania guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, and *L. lainsoni* can be infected by a virus belonging to the *Totiviridae* family: *Leishmania* RNA virus type 1 (LRV). It was discovered in 1988 in a sample originally isolated from a visitor to Suriname [23]. The presence of this virus in the parasites seems to influence the cure rate [14,18,24,25]. The infected parasites tend to spread, and Bourreau et al. have shown that the presence of the virus increases the risk of treatment failure and relapse [14].

The purpose of the present study was to identify the factors associated with pentamidine isethionate treatment failure in a series of service members with *L. guyanensis* NWCL acquired in French Guiana.

## 2. Methods

### 2.1. Study design

This study is a case series. Diagnostic samples and treatment were performed in the context of routine care. Data were then collected with patient consent. The end-point was defined as patient recovery, confirmed by the epithelialization of the lesion, measured six weeks after the beginning of treatment.

### 2.2. Diagnosis and case definition

A complete diagnostic strategy was used for all patients in French Guiana: direct smear examination and two intra-lesional punch biopsies for species diagnosis (culture, PCR) and LRV diagnosis by quantitative reverse transcription-PCR [14]. A restriction fragment length polymorphism-PCR analysis was performed on parasite cultures for the patients treated in French Guiana [4,11]. For the patients diagnosed in continental France after returning from French Guiana, various methods were used [26].

A leishmaniasis case was defined as any cutaneous lesion associated with confirmed parasitological evidence (*Leishmania* spp. in direct smear examination, culture, or polymerase chain reaction (PCR)) contracted in French Guiana.

### 2.3. Treatment strategy

The treatment was left to the appreciation of the physician taking care of the patient, either a general practitioner or a hospital specialist. The *L. guyanensis*-infected patients were included in the final analysis; they were treated by pentamidine isethionate (Pentacarinat, Sanofi-Aventis), either IV or IM. A bottle of Pentacarinat contains 300 mg of pentamidine diisethionate (171 mg of pentamidine). Treatment with intravenous pentamidine isethionate consisted of one injection of 4 mg/kg repeated every 48 h for a total of three times. The IM pentamidine isethionate was administered in two injections given on a single day in two different sites at the same time for a total of 7 mg/kg.

All patients attended a follow-up visit six weeks after the onset of the treatment.

Treatment failure was defined as the persistence of the lesion without improvement six weeks after treatment, which led to a second treatment.

### 2.4. Data collection

Cases were reported to the French armed forces epidemiological surveillance system in French Guiana (autochthonous cases) and in continental France (imported cases).

All the French service members reported to have had leishmaniasis in French Guiana or on returning from French Guiana from December 2013 to June 2016 were included.

Physicians were called to collect data about species, presence of LRV, treatment strategy, and follow-up. Suspected area of contamination, number of lesions, dissemination—defined as secondary lesions surrounding the initial lesion or a certain distance from it—, diameter, time between diagnosis and treatment, and side effects were recorded.

Only *L. guyanensis*-infected patients with a complete follow-up were included in the final analysis. Those infected with another species were included for epidemiological purposes.

### 2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were done using SAS University<sup>®</sup> software (SAS Institute Inc., NC, USA). Given the small sample sizes, the Fisher exact test was used for univariate analysis. Logistic regression was used for multivariate analysis. All statistical analyses used a 5% significance level. The following variables were included in the analyses: age, number of lesions, diameter of lesions, dissemination, stays at gold-mining site, presence of LRV, time between diagnosis and treatment and route of administration of treatment.

## 3. Results

Ninety-seven patients were included (Fig. 1), 50 in French Guiana and 47 in continental France. Five were included in 2013, 53 in 2014, 22 in 2015, and 17 in 2016.

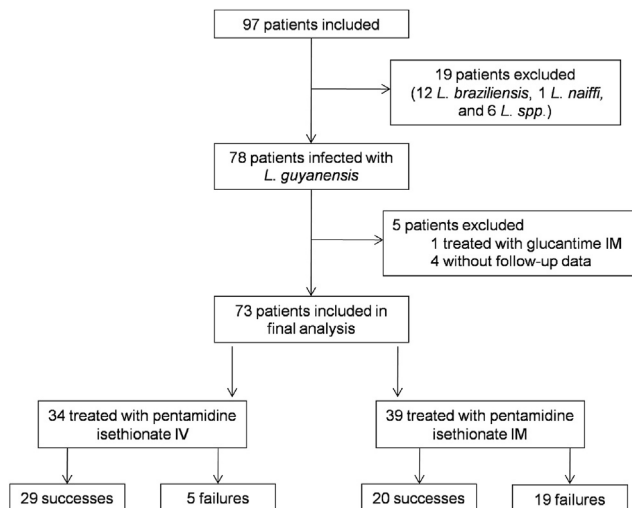


Fig. 1. Flowchart.

Among the 91 patients for whom species identification was available, 78 (86%) were infected with *L. guyanensis*, 12 (13%) with *L. braziliensis*, and 1 (1%) with *L. naiffi*.

The suspected areas of contamination are shown in Fig. 2. The main area of contamination, with 46 cases, was Régina, where the Tropical Forest Training Center is located. The cases due to *L. braziliensis* were mainly distributed at the gold mining sites around Dorlin, Eau-Claire, and Saül.

Seventy-three patients infected with *L. guyanensis* were included in the final analysis (Fig. 1). The characteristics of the patients are presented in Table 1. Their median age was 28 years (Inter-quartile interval (IQI) [23–33], minimum (min) 21, maximum (max) 44). All the patients except one were men. The median number of lesions was one (IQI [1.0–1.0], min 1.0, max 4.0). The prevalence of LRV was 84.8%

Table 1

Characteristics of patients with American tegumentary leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis* parasites treated with pentamidine isethionate (N = 73).

Characteristics	n (%)
Sex	
Male	72 (98.6)
Female	1 (1.4)
Age (years)	
≤ 25	24 (32.9)
> 25	49 (67.1)
Number of lesions	
1	59 (80.8)
2	9 (12.3)
3	4 (5.5)
4	1 (1.4)
Diameter of lesions (mm)	
≤ 10	24 (37.5)
> 10	40 (62.5)
Dissemination	33 (45.8)
Area of contamination	
Training Center	41 (56.2)
Other forested areas	32 (43.8)
Presence of <i>Leishmania</i> RNA virus 1	50 (84.8)
Time between diagnosis and treatment (days)	
≤ 40	37 (50.7)
> 40	36 (49.3)
Route of administration	
IM	39 (53.4)
IV	34 (46.6)
Side effects	
IM	9 (23.1)
IV	12 (35.3)

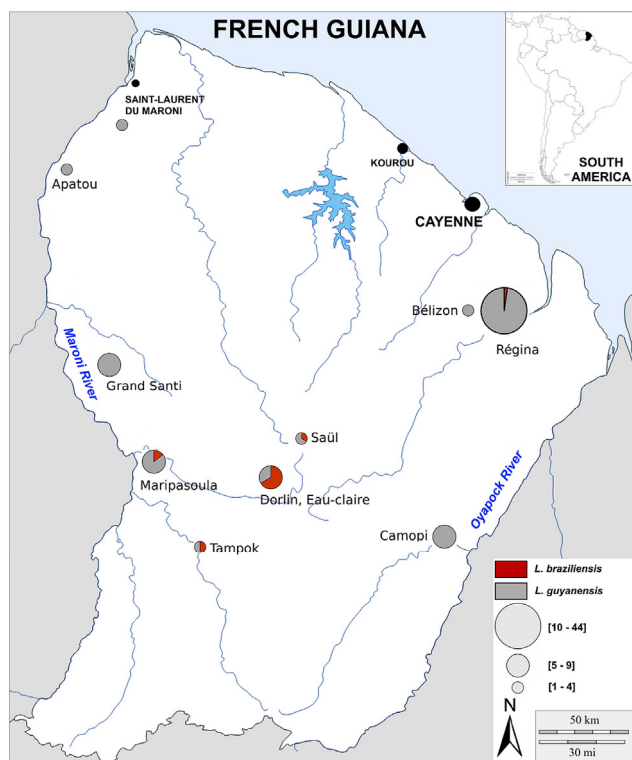


Fig. 2. Map of French Guiana with suspected areas of contamination (N = 79 with location reported).

(n = 50). The median time between diagnosis and treatment was 40 days (IQI [27–57], min 5, max 1148).

Time less than 40 days between diagnosis and treatment was significantly associated with treatment failure in univariate analyses but not in multivariate analyses. The route of administration was the only factor significantly associated with treatment failure in univariate and multivariate analyses (Table 2). The dissemination variable was forced into the multivariate analysis because it had been previously described as a risk factor of therapeutic failure [12]. Patients treated with IV pentamidine isethionate had better response rates than those treated with IM pentamidine isethionate (p = 0.002, adjusted odds ratio (AOR) = 0.15, 95% CI [0.04–0.50]). The treatment success rate was 85.3% (95% CI [68.9–95.0]) for IV pentamidine isethionate and 51.3% (95% CI [34.8–67.6]) for IM pentamidine isethionate. The overall success rate was 67.1% (95% CI [55.1–77.7]).

No association was found between treatment failure and age, suspected area of contamination, number of lesions, diameter of lesions, and dissemination. The presence of LRV was not associated with treatment failure, an increased number of lesions, a greater diameter, the suspected area of contamination, or dissemination (Table 3).

For the IM treatment, several known side effects were recorded: asthenia (2/39), pain (1/39), myalgia (1/39), rhabdomyolysis (3/39), dysesthesia (1/39), and low blood pressure (1/39). Known side effects were also recorded for the IV treatment: asthenia (2/34), pain (1/34), hypoglycemia (2/34), abdominal pain (1/34), myalgia (1/34), arthralgia (1/34), veinitis (1/34), facial edema (1/34), flushing (1/34), eosinophilia (1/34), electrocardiogram modification (1/34), and dyspepsia (1/34). After a failure, second-line treatments reported were: meglumine antimoniate (Glucantime) local (n = 1) and IM (n = 4); IV

**Table 2**  
Determinants of pentamidine isethionate treatment failure in patients with *L. guyanensis* cutaneous leishmaniasis in French Guiana.

	N	n	%	Univariate analysis			Multivariate analysis		
				COR	95% CI	p-value	AOR	95% CI	p-value
Age (years)									
≤ 25	24	6	25.0	1.00					
> 25	49	18	36.7	1.74	0.58–5.19	0.3189			
Number of lesions									
1	58	19	32.8	1.00					
> 1	15	5	33.3	0.80	0.28–2.31	0.9663			
Diameter of lesions (mm)									
≤ 10	24	9	37.5	1.00					
> 10	40	13	32.5	0.80	0.28–2.31	0.6840			
Dissemination									
No	40	12	30.0	1.00			1.00		
Yes	33	12	36.4	1.33	0.50–3.55	0.5650	2.10	0.69–6.44	0.1929
Travel to gold mining site									
No	44	13	29.5	1.00					
Yes	25	11	44.0	1.87	0.67–5.20	0.2282			
Presence of Leishmania RNA virus 1									
No	9	2	22.2	1.00					
Yes	50	17	34.0	1.80	0.34–9.65	0.4910			
Time between diagnosis and treatment (days)									
≤ 40	37	17	45.9	1.00					
> 40	36	7	19.4	0.28	0.10–0.81	0.0186			
Route of administration									
IM	39	19	48.7	1.00			1.00		
IV	34	5	14.7	0.18	0.06–0.57	0.0033	0.15	0.04–0.50	0.0020

n: number of patients with therapeutic failure.

95% CI: 95% confidence interval.

COR: crude odds ratio; AOR: adjusted odds ratio.

**Table 3**  
Influence of the presence of Leishmania RNA virus 1 (LRV) on clinical presentation (univariate analysis) (n = 58 tested for LRV).

Characteristic	Presence of LRV n (%)	Absence of LRV n (%)	p-value
Number of lesions			
1	42 (84)	8 (88.9)	0.2991
2	6 (12)	1 (11.1)	
3	1 (2)	0 (0)	
4	1 (2)	0 (0)	
Diameter of lesions (mm)			
≤ 10	17 (39.5)	4 (50)	0.2576
> 10	26 (60.5)	4 (50)	
Dissemination	19 (38.8)	6 (66.7)	0.0907

(n = 2), liposomal amphotericin B IV (n = 2); and pentamidine isethionate local (n = 1), IM (n = 6) and IV (n = 15).

#### 4. Discussion

The present study shows that use of the IM route of administration for pentamidine isethionate in the treatment of *Leishmania guyanensis* cutaneous leishmaniasis was associated with more treatment failures at six weeks. The advantage of the IV strategy for the patient is obvious, as it led to a faster cure, of particular importance for a disease that can be an esthetic challenge. It is also beneficial for military forces, since it enables them to be maintained in a better operational condition: Service members with cutaneous leishmaniasis are forbidden from going into the rainforest until cured and cannot carry out their missions during this time. Moreover, the IM route of administration is more painful, due to the occurrence of rhabdomyolysis, a side effect absent with IV administration [27,28]. However, IV infusion can cause anaphylactic shock on rare occasions, making medical surveillance following infusion mandatory [29,30]. This side effect has never been reported with IM pentamidine.

The overall treatment success rate in our study was lower than rates reported in the literature [12,31,32]. The success rate for IM pentamidine isethionate was similar to that observed in the study by Neves et al. [13]. The decreased efficacy of the IM pentamidine isethionate observed in other studies could be reversed by the use of the IV [33]; a possible explanation is that the serum peak of pentamidine is higher with this route of administration.

None of the previously described risk factors for poor response to treatment were found in our study. In particular, we found no association between treatment failure and the presence of LRV, unlike Bourreau et al. [14]. Even if it may seem puzzling at first, this difference can easily be explained, we defined treatment failure as unresponsiveness to one course of treatment, whereas Bourreau et al. defined it as unresponsiveness to two courses. In 2005, in a study about French service members contaminated in French Guiana who experienced treatment failure, the patients (n = 7) were cured with a regimen of four intravenous injections of pentamidine [34]. Moreover, the host's immune system was not studied, and as the populations included in our study and in Bourreau et al. were different, an influence of this factor cannot be excluded. Another explanation is that our study may have lacked the statistical power to show an influence of LRV.

A greater time between diagnosis and treatment is associated with less treatment failure in univariate analysis but not in multivariate analysis. This is explained by its collinearity with the route of administration. We can assume that more patients with a greater time between diagnosis and treatment were treated in continental France, where the use of IV pentamidine isethionate is more common.

Our study also constitutes an update on the epidemiology of leishmaniasis in French Guiana. *Leishmania guyanensis* accounts for 86% of the cases there, a similar proportion to that found in the literature [3,4,35]. Due to missions carried out in the rainforest, service members are exposed to the same parasites as illegal gold miners. The distribution of the cases was interesting. The cases due to *Leishmania braziliensis* were distributed at the gold mining sites around Dorlin, Eau-Claire, and Saül and the parasite may have been introduced in French Guiana by individuals entering illegally from Brazil for gold mining. The Tropical



Forest Training Center in Régina is a historical focus of cutaneous leishmaniasis in French Guiana as far as service members are concerned. It was therefore not surprising that most of the contamination took place there. Compared to the map in the study by Ginouvès et al. [36], the areas of contamination in our study were restricted to the places where service members were located or traveled for missions or training. Thus, fewer areas of contamination were represented. Nevertheless, the main focus is Régina in the two studies, and the general findings relating to the distribution of cases are similar.

The limitations of our study are mainly due to its design. A randomized, controlled, blind trial would have a higher level of evidence. We had several patients lost to follow-up, all of whom were treated with IV pentamidine isethionate. Even though declaration of cutaneous leishmaniasis is mandatory and French military physicians are disciplined, some patients may not have been reported during the time period of the study. However, it is unlikely that diagnosis was missed, since all service members receive information about the local health hazards before shipping out to French Guiana, and cutaneous leishmaniasis is given considerable prominence. Our population is a specific one and is not representative of the general population exposed to NWCL, in particular because only service members in good health can be sent overseas, which can change the host response to the parasite. Another limitation is that our study was restricted to French Guiana and the results cannot be extrapolated to other places, as it is known that geographic location can influence treatment response [15].

In summary, the use of IM pentamidine isethionate administered on a single day in the treatment of *Leishmania guyanensis* cutaneous leishmaniasis is associated with more treatment failures than IV pentamidine isethionate. According to our data, IV pentamidine isethionate should be the preferred treatment for *Leishmania guyanensis* cutaneous leishmaniasis, with the IM route of administration being reserved for situations where IV infusion and medical surveillance are not available or possible. Confirmatory studies, especially in other countries, are necessary. It could also be worthwhile to conduct another study on the IM protocol consisting of two injections given in two different sites for a total of 7 mg/kg of pentamidine isethionate repeated once after 48 h.

## Funding

This work was supported by the French Military Health Service. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## Acknowledgments

The opinions or assertions expressed here are the personal views of the authors and should not be considered official or as a reflection of the views of the French Military Health Service.

## References

- Karimkhani C, Wanga V, Coffeng LE, Naghavi P, Dellavalle RP, Naghavi M. Global burden of cutaneous leishmaniasis: a cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect Dis* 2016;16:584–91.
- Schwartz E, Hatz C, Blum J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. *Lancet Infect Dis* 2006;6:342–9.
- Dedet J-P, Carme B, Desbois N, Bourdoiseau G, Lachaud L, Pratlong F. Epidemiology of autochthonous leishmaniasis in France. *Presse Med* 2013;42:1469–81.
- Simon S, Nacher M, Carme B, Basurko C, Roger A, Adenis A, et al. Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: revising epidemiology with PCR-RFLP. *Trop Med Health* 2017;45:5.
- Buffet PA, Rosenthal É, Gangneux J-P, Lightburne E, Couppié P, Morizot G, et al. Therapy of leishmaniasis in France: consensus on proposed guidelines. *Presse Med* 2011;40:173–84.
- Rotureau B, Joubert M, Clyti E, Djossou F, Carme B. Leishmaniasis among gold miners, French Guiana. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1169–70.
- Berger F, Romary P, Brachet D, Rapp C, Imbert P, Garrabé E, et al. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in military population coming back from French Guiana. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2006;54:213–21.
- Banzet S. Epidemics of cutaneous leishmaniasis in military personnel working in French Guiana. *Med Trop* 2000;60:297–302.
- Lightburn E, Meynard JB, Morand JJ, Garnotel E, Kraemer P, Hovette P, et al. Epidemiologic surveillance of cutaneous leishmaniasis in Guiana. Summary of military data collected over 10 years. *Med Trop* 2002;62:545–53.
- Nacher M, Carme B, Sainte Marie D, Couppié P, Clyti E, Guibert P, et al. Seasonal fluctuations of incubation, healing delays, and clinical presentation of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *J Parasitol* 2001;87:1495–8.
- Simon S, Veron V, Carme B. *Leishmania* spp. identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis and its applications in French Guiana. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;66(2):175–80.
- Nacher M, Carme B, Sainte Marie D, Couppié P, Clyti E, Guibert P, et al. Influence of clinical presentation on the efficacy of a short course of pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Ann Trop Med Parasitol* 2001;95:331–6.
- Neves LO, Talhari AC, Gadelha EP, Silva Júnior RM, Guerra JA, Ferreira LC, et al. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol* 2011;86:1092–101.
- Bourreau E, Ginouvès M, Prévot G, Hartley MA, Gangneux JP, Robert-Gangneux F, et al. Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 in *Leishmania guyanensis* increases the risk of first-line treatment failure and symptomatic relapse. *J Infect Dis* 2016;213:105–11.
- Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, Pearson R, Lopez-Velez R, Weina P, et al. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America (IDSA) and the American society of tropical medicine and Hygiene (ASTMH). *Clin Infect Dis* 2016;63:1539–57.
- Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macêdo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:456–65.
- Nacher M, Couppié P, Carme B, Clyti E, Sainte Marie D, Guibert P, et al. Influence of meteorological parameters on the clinical presentation of cutaneous leishmaniasis in French Guiana and on the efficacy of pentamidine treatment of the disease. *Ann Trop Med Parasitol* 2002;96:773–80.
- Adaui V, Lye L-F, Akopyants NS, Zimic M, Llanos-Cuentas A, Garcia L, et al. Association of the endobiont double-stranded RNA Virus LRV1 with treatment failure for human leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Peru and Bolivia. *J Infect Dis* 2016;213:112–21.
- Machado P, Araújo C, Da Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira Jr. A, Bittencourt A, et al. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin Infect Dis* 2002;34:E69–73.
- Bourreau E, Ronet C, Darsissac E, Lise M-C, Marie DS, Clyti E, et al. In leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis* infection, distinct intralésional interleukin-10 and Foxp3 mRNA expression are associated with unresponsiveness to treatment. *J Infect Dis* 2009;199:576–9.
- Couppié P, Clyti E, Sobesky M, Bissuel F, Del Giudice P, Sainte-Marie D, et al. Comparative study of cutaneous leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients and non-HIV-infected patients in French Guiana. *Br J Dermatol* 2004;151:1165–71.
- Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C, Santamaria-Castrellon G, Ramirez L, et al. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis* 2008;46:223–31.
- Tarr PI, Aline RF, Smiley BL, Scholler J, Keithly J, Stuart K. LR1: a candidate RNA virus of *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:9572–5.
- Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuentes-Marraco S, Schutz F, et al. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science* 2011;331:775–8.
- Hartley M-A, Ronet C, Zangger H, Beverley SM, Fasel N. *Leishmania* RNA virus: when the host pays the toll. *Front Cell Infect Microbiol* 2012;2:99.
- Van der Auwera G, Bart A, Chicharro C, Cortes S, Davidsson L, Di Muccio T, et al. Comparison of *Leishmania* typing results obtained from 16 European clinical laboratories in 2014. *Euro Surveill* 2016:21.
- Delobel P, Pradinaud R. Rhabdomyolysis associated with pentamidine isethionate therapy for American cutaneous leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1319–20.
- Lieber-Mbomeyo A, Lipsker D, Miléa M, Heid E. Rhabdomyolysis induced by pentamidine (Pentacarinat) during treatment of cutaneous leishmaniasis: 2 cases. *Ann Dermatol Venerol* 2002;129:50–2.
- Levy ER, Musick L, Zinter MS, Lang T, Cowan MJ, Weintrub PS, et al. Safe and effective prophylaxis with bimonthly intravenous pentamidine in the pediatric hematopoietic stem cell transplant population. *Pediatr Infect Dis J* 2016;35:135–41.
- DeMasi JM, Cox JA, Leonard D, Koh AY, Aquino VM. Intravenous pentamidine is safe and effective as primary pneumocystis pneumonia prophylaxis in children and adolescents undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32:933–6.
- Roussel M, Nacher M, Frémont G, Rotureau B, Clyti E, Sainte-Marie D, et al. Comparison between one and two injections of pentamidine isethionate, at 7 mg/kg in each injection, in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Ann Trop Med Parasitol* 2006;100:307–14.
- Lightburn E, Morand JJ, Meynard JB, Kraemer P, Chaudier B, Pages F, et al.

- Management of American cutaneous leishmaniasis. Outcome apropos of 326 cases treated with high-dose pentamidine isethionate. *Med Trop* 2003;63:35–44.
- [33] van der Meide WF, Sabajo LO, Jensema AJ, Peekel I, Faber WR, Schallig HD, et al. Evaluation of treatment with pentamidine for cutaneous leishmaniasis in Suriname. *Int J Dermatol* 2009;48:52–8.
- [34] Gangneux JP, Sauzet S, Donnard S, Meyer N, Cornillet A, Pratlong F, et al. Recurrent American cutaneous leishmaniasis. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1436–8.
- [35] Desjeux P, Dedet JP. Isoenzyme characterization of 112 *Leishmania* isolates from French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989;83:610–2.
- [36] Ginouvès M, Simon S, Bourreau E, Lacoste V, Ronet C, Couppié P, et al. Prevalence and distribution of *Leishmania* RNA virus 1 in *Leishmania* parasites from French Guiana. *Am J Trop Med Hyg* 2016;94:102–6.

La publication n°5 rapporte que le LRV augmente de 27% le risque d'échec thérapeutique à la pentamidine. D'un autre côté, les résultats issus de la publication n°6 n'associent pas le LRV aux échecs thérapeutiques. Cette divergence de résultats renforce l'idée que, peut-être, un certain génotype de LRV serait impliqué dans les échecs thérapeutiques. Ces disparités entre études ont déjà été observées dans le cas du TVV (cf. 2.1). Ces différences provenaient du fait que seuls certains génotypes de TVV étaient impliqués dans la sévérité de la maladie. Le but de la publication n°7 est de déterminer si un génotype particulier de LRV est associé aux échecs du traitement.

## **Publication n°7 : Phylogénie des LRV et clinique des patients**

**Leishmaniavirus genetic diversity is not related to leishmaniasis treatment failure.** Ginouvès M, Couppié P, Simon S, Bourreau E, Rogier S, Brousse P, Travers P, de Santi VP, Demar M, Briolant S, Prévot G. Clin Microbiol Infect. 2020 May 4. pii: S1198-743X(20)30265-2. doi: 10.1016/j.cmi.2020.04.037.

Cette étude vise à déterminer si des clusters viraux sont associés aux échecs thérapeutiques. Pour cela, 254 isolats de *L. guyanensis* prélevés chez des patients ayant consulté le CHC ou l'un des CDS entre février 2012 et mai 2016, ont été inclus dans l'étude. Les données cliniques correspondant à ces patients, comprenant l'âge, le genre, le lieu présumé de contamination, le nombre et la taille des lésions, la présence de nodules, de papules, de papules satellites, de lymphangites, d'adénopathies, d'ulcération, le délai entre la contamination et le traitement, le délai entre deux traitements, l'échec au traitement après une première et une deuxième cure, ont été recueillies. La présence de LRV dans les *Leishmania* a été déterminée selon le protocole que nous avons développé (Ginouvès et al. 2016) et le séquençage de 96 virus a été réalisé selon l'article n°2. Un arbre phylogénique a été établi, mettant en avant 2 groupes majoritaires, A et B.

Les différentes données cliniques ont été corrélées à la présence et au génotype du LRV. Cependant, aucun lien entre les différentes variables et la présence du LRV ou leur génotype ne ressortait, mis à part la zone géographique qui indiquait une plus forte prévalence du LRV dans l'intérieur des terres comparativement au littoral. Les échecs thérapeutiques n'étaient aucunement associés à la présence des LRV ou à leur génotype.

Cette divergence observée avec notre première étude (Bourreau et al., 2016) peut provenir de la nature du prélèvement utilisé pour la détection des LRV. En effet, la détection des LRV, présentée dans la publication n°5, a été effectuée à partir des biopsies, ce qui permettrait de se rapprocher des charges virales présentes dans les lésions des patients, tandis que celle de la publication n°6 (Christen et al. 2018) incluait des résultats issus à la fois de biopsies et de cultures parasitaires. Or, il se trouve que les cultures parasitaires favoriseraient le développement des virus au sein de leurs parasites, quelle que soit la charge virale initiale, ne reflétant plus le taux de virus dans le prélèvement de départ (observation personnelle). Néanmoins, dans nos précédents travaux (Bourreau et al., 2016) nous avons observé que la charge virale de LRV dans les

parasites n'était pas corrélée aux échecs thérapeutiques, paramètre qui est cependant corrélé à la réponse immunitaire chez l'hôte murin (Ives et al. 2011). De plus, l'étude menée par Aduai et al. montrait une corrélation entre la présence des LRV détectés dans des cultures de *L. braziliensis* et les échecs thérapeutiques (Aduai et al. 2015).

Une différence notable entre ces travaux était liée au fait que notre première étude (Bourreau et al., 2016), ainsi que celle d'Aduai et al., incluaient des patients présentant des réactivations de la maladie, contrairement à notre seconde étude (Christen et al. 2018) et à la présente étude. D'autre part, une étude menée par Pereira et al., qui ne montrait aucun lien entre la présence du LRV et la sévérité de la maladie, rapportait que la présence du LRV était associée à la réactivation des lésions (Pereira et al. 2013). Ces résultats pourraient indiquer que le LRV pourrait être associé uniquement aux réactivations de la maladie. Pour résoudre cette question, l'étude d'un plus grand nombre de patients, notamment de patients présentant des réactivations de la maladie est nécessaire.



Contents lists available at ScienceDirect

## Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: [www.clinicalmicrobiologyandinfection.com](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com)

Original article

## *Leishmania* virus genetic diversity is not related to leishmaniasis treatment failure

M. Ginouvès<sup>1,2,\*</sup>, P. Couppié<sup>1,3</sup>, S. Simon<sup>1,2</sup>, E. Bourreau<sup>4</sup>, S. Rogier<sup>5</sup>, P. Brousse<sup>6</sup>,  
P. Travers<sup>6</sup>, V. Pommier de Santi<sup>7,8,9</sup>, M. Demar<sup>1,2</sup>, S. Briolant<sup>8,9,10</sup>, G. Prévot<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ecosystemes Amazoniens et Pathologie Tropicale – FA 3593 – Labex CFBA – Medicine Department, University of French Guiana, Cayenne, French Guiana

<sup>2</sup> Laboratoire Associé – Centre National de Référence Leishmania, Laboratory of Parasitology and Mycology, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana

<sup>3</sup> Guianan Institute of Tropical Dermatology, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana

<sup>4</sup> Immunology Laboratory of Leishmaniasis, Pasteur Institute of French Guiana, Cayenne, French Guiana

<sup>5</sup> Centre d'Investigation Clinique Epidémiologie Clinique Antilles Guyane CIC EC 1424, Cayenne General Hospital, Cayenne, French Guiana

<sup>6</sup> Centres Délocalisés de Prévention et de Soins (C.D.P.S.), Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana

<sup>7</sup> French Armed Forces Centre for Epidemiology and Public Health, Marseille, France

<sup>8</sup> Aix Marseille Univ. IRD. AP-HM. SSA. VITROME. Marseille. France

<sup>9</sup> IHU-Méditerranée Infection, Marseille, France

<sup>10</sup> Army Biomedical Research Institute, Marseille, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 12 December 2019

Received in revised form

24 April 2020

Accepted 26 April 2020

Available online xxx

Editor: E. Bottieau

## Keywords:

Genotype

*Leishmania guyanensis*

LRV1

Pentamidine

Treatment failure

## ABSTRACT

**Objectives:** The outcome of American tegumentary leishmaniasis (ATL) may depend on the presence of the *Leishmania* RNA virus (LRV). This virus may be involved in treatment failure. We aimed to determine whether genetic clusters of LRV1 are involved in this therapeutic outcome.

**Methods:** The presence of LRV1 was assessed in 129 *Leishmania guyanensis* isolates from patients treated with pentamidine in French Guiana. Among the 115 (89%) isolates found to carry LRV1, 96 were successfully genotyped. Patient clinical data were linked to the LRV data.

**Results:** The rate of treatment failure for LRV1-positive isolates was 37% (15/41) versus 40% (2/5) among LRV1-negative isolates ( $p$  0.88). Concerning LRV1 genotypes, two predominant LRV1 groups emerged, groups A (23% (22/96)) and B (70% (67/96)). The treatment failure rate was 37% (3/8) for group A and 45% (9/20) for group B ( $p$  0.31).

**Discussion:** Neither the presence nor genotype of LRV1 in patients with *L. guyanensis* seemed to correlate with pentamidine treatment failure. **M. Ginouvès, Clin Microbiol Infect 2020;■:1**

© 2020 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Leishmaniasis are infectious diseases caused by *Leishmania* (*Trypanosomatidae*) parasites, which are transmitted through the bites of infected female sandflies. The disease is characterized by a wide range of clinical presentations, from asymptomatic to severe forms, depending on the *Leishmania* species. American tegumentary leishmaniasis (ATL) is characterized by cutaneous

lesions and can result in self-healing or spread of the lesions. Localized cutaneous leishmaniasis (LCL) is defined as a skin lesion localized at the point of the vector bite. In some patients, parasites spread throughout the body, causing cutaneous diffuse leishmaniasis (CDL). Mucocutaneous leishmaniasis (MCL) occurs when the parasite spreads from a cutaneous lesion to nasopharyngeal areas of the face, leading to destructive metastatic secondary lesions.

The presence of the *Leishmania* RNA virus (LRV) may be a factor associated with the development of mucosal leishmaniasis [1–4]. LRV is a non-enveloped double-stranded RNA virus belonging to the *Totiviridae* family. This virus, initially believed to be exclusively hosted by *Leishmania* parasites, was recently found in another *Trypanosomatidae* of the genus *Blechnomonas* [5]. LRV has been

\* Corresponding author. G. Marine Ginouvès, University of French Guiana, DFR santé, Laboratoire EPaT, Campus Saint Denis, Avenue d'Estrées, 97300 Cayenne, French Guiana.

E-mail address: [marine.ginouves@univ-guyane.fr](mailto:marine.ginouves@univ-guyane.fr) (M. Ginouvès).

<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.04.037>

1198-743X/© 2020 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

described in New and Old World strains of *Leishmania*, named LRV1 and LRV2, respectively, and has been particularly studied for the *Viannia* subgenus. Six phylogenetic groups of LRV1 can be distinguished in this subgenus, from A to F, with two predominant clusters, A and B. Clusters A to E comprise *L. guyanensis* parasites and cluster F includes two isolates from *L. braziliensis* [6].

LRV1 appears to play a role in disease progression by directing it towards severe MCL [1]. Indeed, the presence of this virus, carried by *L. guyanensis* parasites, appears to modulate the host immune response in a murine model, leading to a higher susceptibility to the infection, an increase in parasite burden, swelling of the lesions and metastases. The virus appears to activate host immune receptors, such as Toll-Like Receptor-3 (TLR-3), inducing pro-inflammatory cytokine synthesis and leading to an excessive immune response. The exaggerated immune response directed initially against the parasites simultaneously affects host tissues, leading to their substantial degradation [1]. This exacerbation may be amplified by association of the virus with parasitic exosomes [7] but can be prevented by immunization with LRV capsid proteins in mice [8]. In humans, LRV1 appears to be a predictive factor of first-line treatment failure and symptomatic relapses [9]. However, a recent study has suggested otherwise [10]. Here, we aim to determine whether the presence of LRV1 or one of its genotypes correlates with treatment failure.

## Materials and methods

### Patients

The study, conducted in French Guiana, included patients with a diagnosis of tegumentary leishmaniasis due to *L. guyanensis* between February 2012 and May 2016.

The diagnosis consisted of a biopsy of the interior of the lesions of the patients, followed by incubation of the biopsy in RPMI-1640 (Gibco®), containing L-glutamine, 20 mM HEPES and phenol red, supplemented with 20% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco), 50 IU/mL penicillin (Invitrogen®), 0.05 mg/mL streptomycin (Invitrogen) and non-essential amino acids (Gibco), at 26°C to allow development of the parasite. Part of the culture was used for the routine diagnosis of *Leishmania* species performed by the Cayenne hospital by PCR-RFLP [11] and the other kindly supplied by the Cayenne hospital for LRV1 detection and analysis. Patients diagnosed as positive for *L. guyanensis* but with an unsuccessful culture were not included in the study.

In total, 332 cultures were available. The isolates were associated with patient data. Patients without therapeutic outcome data after the first round of treatment and those under 18 years of age were excluded from the study. Finally, 129 patients were included. A sensitivity analysis was carried out to ensure that patient exclusion did not affect the study results (data not shown).

### LRV RNA extraction

Upon reaching stationary phase, fresh *Leishmania* cultures were counted under a microscope. Pellets of  $1.10^7$  parasites were prepared by a 5-min centrifugation at 587g and elimination of the supernatant. Cells were preserved at -25°C until use.

Total RNA was extracted from *Leishmania* promastigotes using the RNeasy mini kit® according to the manufacturer's recommendations (except for centrifugations of 15 s, which were extended to 30 s because of the characteristics of the centrifuge). The RNA was stored at -80°C until use.

### LRV reverse transcription

RNA reverse transcription was performed using SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) with random hexamers (Invitrogen), according to the manufacturer's recommendations.

### LRV1 detection by PCR

LRV1 was detected by amplification of a 124 bp fragment by PCR with the LRV1 forward primer, LRV1-F1: 5'-CTGACTG-GACGGGGGTAAT-3' and the LRV1 reverse primer, LRV1-R1: 5'-CAAACACTCCCTTACGC-3', at a final concentration of 0.2 µM [12]. The 25-µL reaction mixture included 1 × PCR master mix (Bio-techRabbit™), each primer at 0.2 µM and 2 µL of cDNA. A denaturation step at 94°C for 2 min was followed by 40 cycles at 94°C for 30 s, 54°C for 30 s and 72°C for 1 min. The PCR was completed by a final elongation step at 72°C for 5 min. PCR products were separated on a 2% agarose gel with Midori Green Advance® to verify the presence of amplification products of the expected size. The reference strain of *L. guyanensis* (MHOM/GF/97/LBC6) was used as a positive control and water as a negative control in each PCR experiment.

### LRV genotyping

#### PCR

Positive LRV1 samples were genotyped using the forward primer LRV1s 5'-ATTCGCTAGCTGTBYGGATGTAGYGTAC-3' and the reverse primer LRV2as 5'-CATAGCCAAAACGTTTACA WARTGTYGRGTGT-3' [6], amplifying a 779 bp product. These primers target the ORF1 and ORF2 sequences that encompass the sequence amplified by the LRV1-F1/LRV1-R1 primers used for LRV1 detection. The 50-µL reaction mixture included 1 × AmpliTaq Gold master mix (Applied Biosystem™), each primer at 0.2 µM and 5 µL of cDNA. A denaturation step at 94°C for 5 min was followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, 62°C for 30 s, and 72°C for 1 min. The PCR was completed by a final elongation step at 72°C for 5 min.

Fragments not amplified by the LRV1s/LRV2as primers were amplified using another primer pair proposed by Cantanhêde et al. [13], surrounding the sequence amplified by the LRV1s/LRV2as primers. These primers were LRV1 F orf1 5'-ATGCCTAA-GAGTTTGGATTTCG-3' and LRV R orf2 5'-AATCAATTTTCCCAGT-CATGC-3', amplifying an 850 bp sequence.

The 50-µL reaction mixture included 1 × AmpliTaq Gold master mix (Applied Biosystem™), each primer at 0.4 µM and 5 µL of cDNA. A denaturation step at 94°C for 2 min was followed by 40 cycles at 94°C for 30 s, 56°C for 45 s and 72°C for 30 s. The PCR was completed by a final elongation step at 72°C for 3 min.

PCR products were separated on a 2% agarose gel containing Midori Green Advance® to verify the presence of amplification products of the expected size.

### Sequencing

Sample purification and sequencing were performed from 40 µL of PCR product by the sequencing platform of l'Hôpital Cochin (Eurofins France) with the corresponding primers used for fragment amplification. Both strands of each sample were sequenced and the results delivered by the subcontractor, Eurofins.

### Sequence analysis

Sequence complementarity (forward and reverse) obtained for each sample was tested using BioEdit software (version 7.0.5.3) [14] to confirm the sequencing. The consensus sequence resulting from two strictly identical opposed sequences was selected for the genetic analysis. We also included the 24 sequences from the study of

Tirera et al. [6], 11 of which corresponded to the isolates used in our study. All LRV sequences were aligned with MEGA 7 software [15] using the MUSCLE programme. Some alignment corrections were made manually. A phylogenetic tree was constructed using SeaView software [16], based on maximum likelihood phylogenies (PhyML) and the K80 model (default settings).

#### Clinical data

Clinical data were retrospectively sought for the 129 *Leishmania* samples in the various services of the hospital or health centres spread throughout the territory. Collected data included age, gender, suspected place of infection, number of lesions, lesion size, nodules, papules, satellite papules, lymphangitis, adenopathy and treatment failure.

#### Data analysis

R software (version 3.2.0) was used for data analysis. Univariate and multivariate variables were analysed by logistic regression. Variables included in the statistical analysis were the presence of LRV1, LRV1 genotype, age, gender, suspected place of infection, time between infection and treatment, time between two rounds of pentamidine, number of lesions, lesion size, lymphangitis, adenopathy, nodule, papule, satellite papules and treatment failure after one or two courses of pentamidine.

LRV1 genotypes were separated into six groups, from A to F. Only groups A and B were analysed. The other groups were excluded due to their small size. Age was divided into two groups: from 18 to 35 years and >35. The suspected locations of infection were grouped into two areas: littoral (Iracoubo, Macouria, Sinnamary, Kourou, Matoury, Cayenne, Rémire-Montjoly) and inland (Régina, Saül, Saint-Elie, Roura, Montsinéry-Tonnegrande, Saint-Georges, Camopi, Trois-Sauts, Saint-Laurent du Maroni, Apatou, Grand-Santi, Papaïchton and Maripasoula). Patients who consulted in French Guiana but were infected in neighbouring countries were included in the study. Thus, Suriname and Brazil were also included in the inland group. Lesion number was divided into two groups, the first consisting of patients with one lesion and the second, those with more than one lesion. Lesion size was also divided into two groups, the first consisting of patients with lesions  $\leq 2$  cm and the second those  $> 2$  cm.

Patients included in the study were treated by intramuscular administration of 7 mg/kg pentamidine, divided between two injections given in a single day at different body sites. In the absence of healing of the lesion at least 1 month after the first treatment (treatment 1), a second dose of pentamidine was administered by the intramuscular route. Treatment failure was considered when patients presented a persistent lesion at least 1 month after the second course of treatment (treatment 2). Patients showing treatment failure were hospitalized for meglumine antimoniate (Glucantime®) treatment. The influence of LRV on therapeutic failure was determined after the first and second round of treatment.

#### Ethics approval

Access to these data has been authorized by the Comité de Protection des Personnes (CPP) SUD-EST II, no. ID-RCB: 2017-A00173-50. A declaration was also made to the Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL), no. peV2056324t.

## Results

### LRV and clinical outcomes

The study included 129 *L. guyanensis* isolates, for which the presence of LRV was sought. The results were associated with the available data on the various clinical features of the patients to identify the involvement of this virus in the pathophysiology of the disease (Table 1, Table S1). Thus, among the 115 (89%) *Leishmania* samples harbouring LRV1, 63% (73/115) resulted in the patients being unresponsive to the first round of pentamidine versus 57% (8/14) for the LRV-negative patients. In the second round of treatment, 37% of the 41 positive LRV1 isolates (15/41) were associated with treatment failure versus 40% (2/5) for the LRV-negative patients. There was no significant association between treatment failure and the presence of LRV1 ( $p$  0.88).

Statistical analysis of the other variables showed that LRV1 did not affect the development of adenopathy, lymphangitis, papules, satellite papules, nodules or the size or number of lesions. Neither age nor gender influenced the development of LRV1.

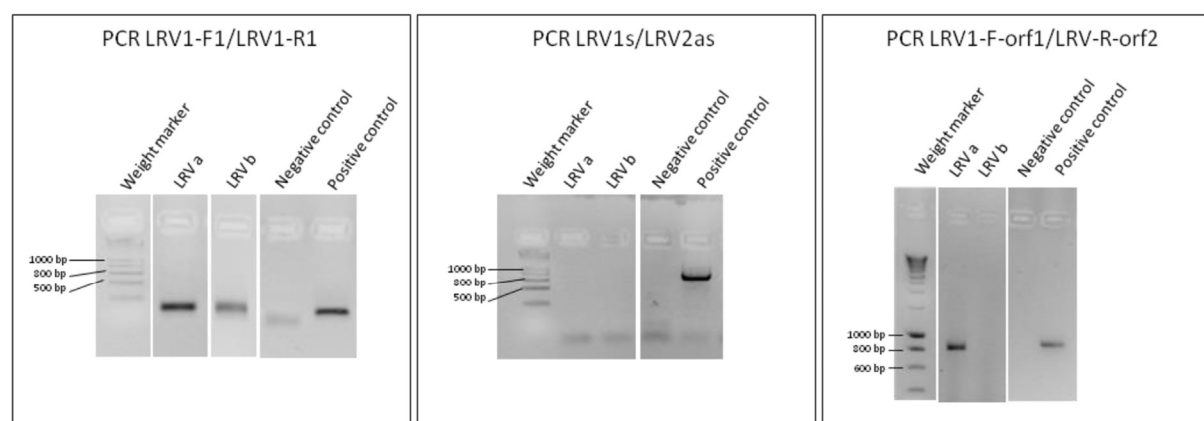
Geographical analysis showed a much stronger presence of LRV1 inland than at the coastline (OR 9.8,  $p$  0.0008).

### LRV genotyping

LRV1 amplification by PCR using the various primers, as part of the sequencing, is shown in Fig. 1. Among the 115 LRV1 isolates, 96 were successfully sequenced and used to construct a phylogenetic tree. Thirteen other sequences, from the study of Tirera et al., were also included [6]. The phylogenetic tree (Fig. S1) highlighted five groups, from A to E. The groups A and B were predominant, accounting for 22 (23%) and 67 (70%) of the LRV1 isolates, respectively. Groups D and E accounted for 1 (1%) and 6 (6%) LRV1 isolates. No LRV1 isolates used in this study belonged to groups C or F.

**Table 1**  
Statistical analysis of variables tested with *Leishmania* RNA virus (LRV)

		LRV-	LRV+	Univariate analysis	
				OR	p
Age	18–35 years old	5	53	0.65	0.46
	>35 years old	9	62		
Gender	Female	4	12	3.04	0.10
	Male	8	73		
Time between two rounds of pentamidine	1 month	1	20	0.28	0.29
	>1 month	3	17		
Time between infection and treatment	$\leq 50$ days	4	44	0.56	0.40
	>50 days	6	37		
Treatment 1	Cure	6	42	1.30	0.64
	Failure	8	73		
Treatment 2	Cure	3	26	0.87	0.88
	Failure	2	15		
Suspected place of infection	Littoral	6	8	9.87	0.0008
	Inland	6	79		
Lesion size	$\leq 2$ cm	1	41	0.16	0.12
	>2 cm	3	20		
Number of lesions	1	8	64	1.02	0.97
	>1	6	49		
Lymphangitis	Absent	7	49	1.17	0.80
	Present	5	41		
Adenopathy	Absent	8	66	0.70	0.58
	Present	4	23		
Papule	Absent	11	69	6782796.24	0.99
	Present	0	6		
Satellite papules	Absent	10	70	0.86	0.89
	Present	1	6		
Nodule	Absent	9	59	0.86	0.84
	Present	3	17		



**Fig. 1.** *Leishmania* RNA virus (LRV) PCR with the different primers: LRV1-F1/LRV1-R1 [12] used for the LRV detection, LRV1s/LRV2as [6] and LRV1-F-orf1/LRV-R-orf2 [13] used for the LRV genotyping. LRVa corresponded to the non-amplified sample using LRV1s/LRV2as primers, but amplified using the LRV1-F-orf1/LRV-R-orf2 primers. LRVb corresponded to the non-amplified sample using LRV1s/LRV2as primers or LRV1-F-orf1/LRV-R-orf2 primers.

### LRV genotypes related to clinical outcome

Among the 96 genotyped LRV isolates, 89 were distributed within clusters A and B. In group A, 59% (13/22) of the LRV isolates were associated with the unresponsiveness of patients to the first round of pentamidine and 63% (42/67) in group B. In the second round of treatment, 37% (3/8) of the LRV isolates of group A were associated with treatment failure versus 45% (9/20) in group B. None of the LRV1 groups seemed to be associated with treatment failure ( $p$  0.31) or to the development of adenopathy, lymphangitis, papules, satellite papules, nodules, large lesions or the number of

lesions. The LRV1 groups did not appear to be associated with age, gender or geographic area (Table 2, Table S1).

### Discussion

The presence of LRV1 has been shown to be a risk factor for therapeutic failure [9,17]. In the present study, we found no correlation between the presence of LRV1 or its genotypes in *L. guyanensis* parasites and treatment failure, either after the first or second course of treatment of pentamidine. The main difference, and limitation, of this study relative to the others was that this study was retrospective and included patients with non-standardized clinical monitoring. Our results contrast with those of Bourreau et al. [9] and Aduai et al. [17], but are in accordance with those of Christen et al. [10]. A prominent difference between our study, that of Bourreau et al. [9] and that of Christen et al. [10] was the diagnostic methodology used. Bourreau et al. performed LRV1 detection directly on biopsies, whereas we detected LRV1 from cultures. Christen et al. used both methodologies, biopsies or cultures, depending on the case (personal communication). However, according to Bourreau et al., LRV1 prevalence was higher in parasite cultures (87%) than in biopsies (58%). Such a higher prevalence of LRV1 in cultures was observed in our study and that of Christen et al., 89% and 85%, respectively. Indeed, low amounts of LRV1 in a biopsy may render the virus undetectable by molecular biology, whereas it may be detected in culture. This may lead to bias, especially since, according to Ives et al., the magnitude of the immune response induced by LRV1 should depend on its amount [1]. This could explain the absence of a correlation between the presence of LRV1 and treatment failure in the present study. Nevertheless, Aduai et al. found a correlation between the presence of LRV1 in cultivated *L. braziliensis* isolates and treatment failure [17]. However, Bourreau et al. reported that treatment failure did not correlate with the LRV1 load per parasite [9] and another study reported that the LRV1 burden (genome equivalent) did not correlate with the state of the lesion (active lesion, lesion in the process of scarring, or scar), as the amount of LRV1 was highly variable, regardless of the state of the lesion [18]. Another difference observed between these various studies was that Aduai et al. and Bourreau et al. included relapsing patients, which was not the case in our study or that of Christen et al. [9,10,17]. Pereira et al. also reported that LRV1 was detected in patients with disease reactivation [19]. Thus, LRV1 may be only responsible for

**Table 2**  
Statistical analysis of variables tested with *Leishmania* RNA virus (LRV) genotypes

		LRV group		Univariate analysis	
		A	B	OR	p
Age	18–35 years old	12	29	1.58	0.35
	>35 years old	10	38		
Gender	Female	4	6	2.43	0.21
	Male	12	46		
Time between two rounds of pentamidine	1 month	5	11	1.07	0.93
	>1 month	1	7		
Time between infection and treatment	≤50 days	6	29	0.58	0.37
	>50 days	8	22		
Treatment 1	Cure	9	25	1.21	0.70
	Failure	13	42		
Treatment 2	Cure	5	11	3.33	0.31
	Failure	3	9		
Suspected place of infection	Littoral	2	4	1.47	0.67
	Inland	18	47		
Lesion size	≤2 cm	7	23	1.12	0.88
	>2 cm	3	11		
Number of lesions	1	12	39	0.81	0.67
	>1	10	26		
Lymphangitis	Absent	10	30	1.07	0.90
	Present	8	27		
Adenopathy	Absent	11	44	0.42	0.13
	Present	7	12		
Papule	Absent	14	47	0.82	0.87
	Present	1	3		
Satellite papules	Absent	15	48	ND	0.99
	Present	0	2		
Nodule	Absent	10	41	0.44	0.21
	Present	5	9		

ND, not determined.



relapses. Future studies to investigate the association of LRV1 genotypes with disease should therefore only be carried out on samples from relapsing patients.

### Transparency declaration

The authors declare that they have no competing interests. This work was supported by the University of French Guiana and the Ministère Français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique. This work has benefited from an 'Investissement d'Avenir' grant managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA, ref. ANR-10-LABX-25-01).

### Author contributions

The conception and design of the study: G.P., P.C. and M.G. Acquisition of data: all the authors. Analysis and interpretation of data: S.B., G.P., M.G. Drafting the article: G.P., P.C., S.B., M.G. Revising it critically for important intellectual content: all authors. Final approval of the version to be submitted: all authors.

### Acknowledgement

We thank all trainees who participated in this project at the level of experimental work (Claudiane Florat, Yasmine Auguste, Ruthly Jean-Baptiste, Keïta Bagadi, Kevin Joseph). We also thank all CHC staff (Audrey Ambouille, Géraldine Gangasing, Basma Guarmit, Céline Michaud) and health centres staff (Maripasoula: Christelle Maabo, Wilmina Alfred, Melaine Boce and their colleagues, Papaïchton: Naïka Amayota and colleagues, in Cacao: Malika Miquel and colleagues, in Saint Georges: Eric Crougneau and colleagues, in Apatou: Pauline Alifons and colleagues, in Saül: Séverine and colleagues, in Trois sauts: Benoit Quentin, Laure Gerold and colleagues) who helped us to carry out this project. We thank Antoine Adenis for his help in the sensitivity study. We thank reviewers and editor for their advice.

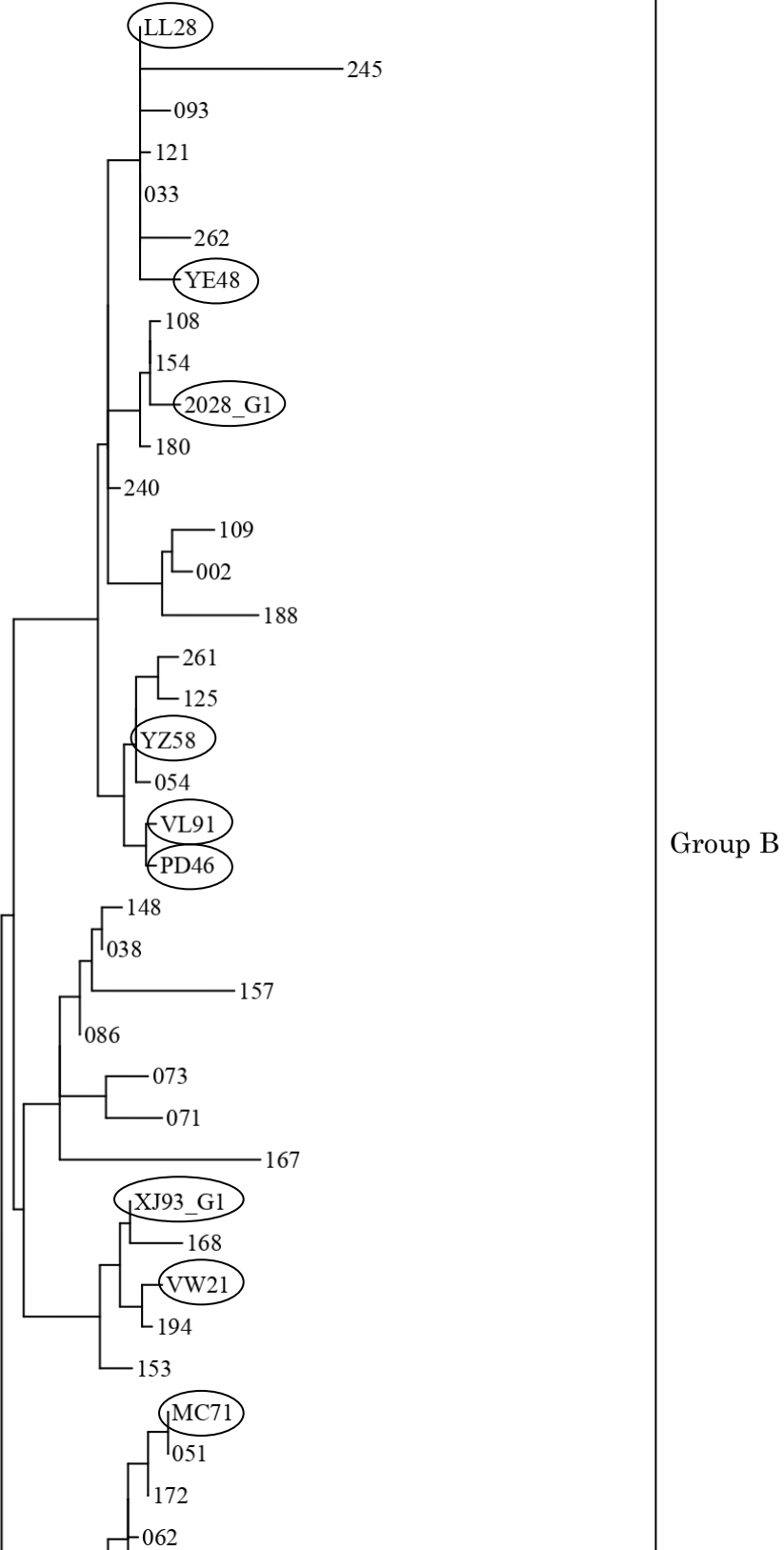
### Appendix A. Supplementary data

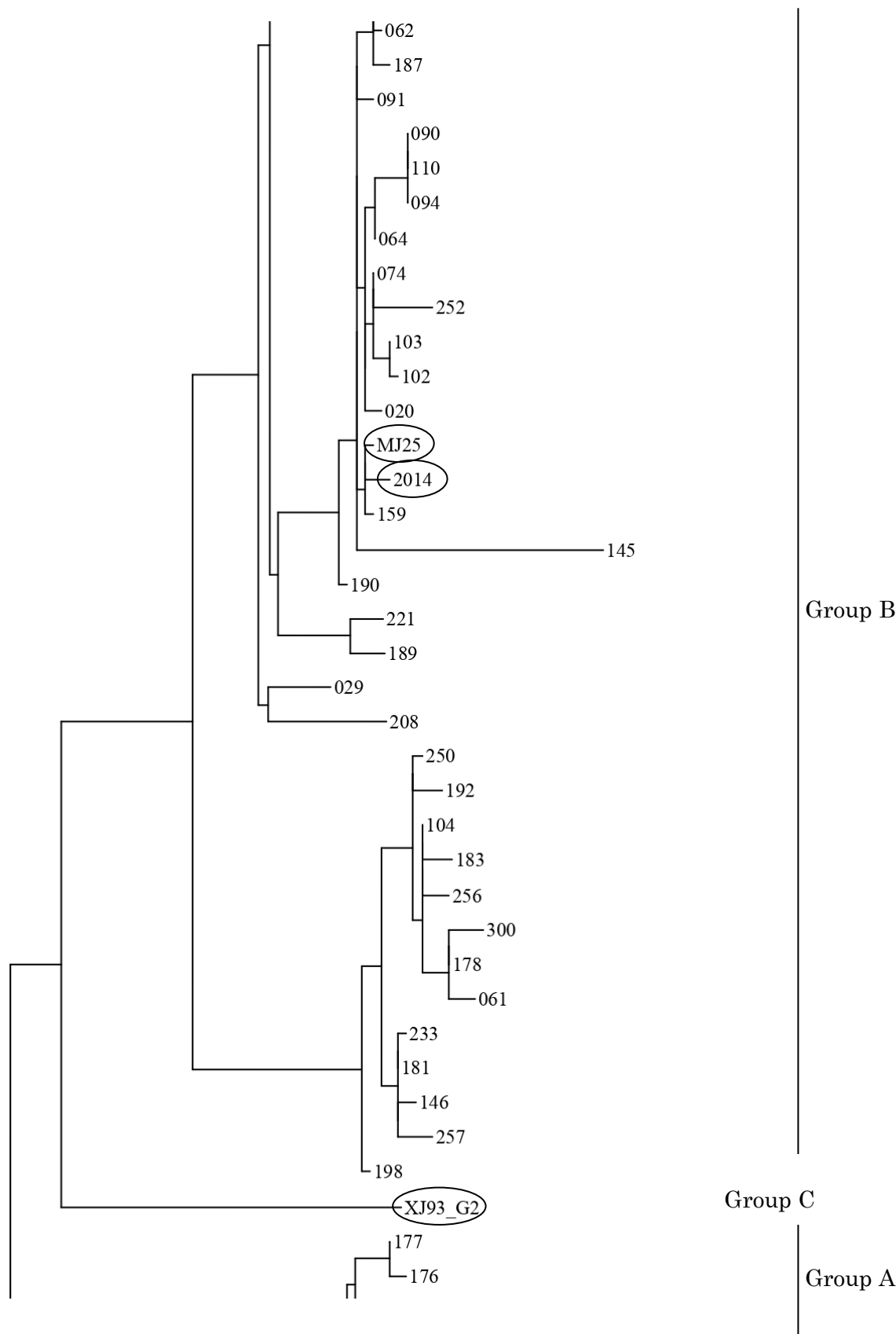
Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.04.037>.

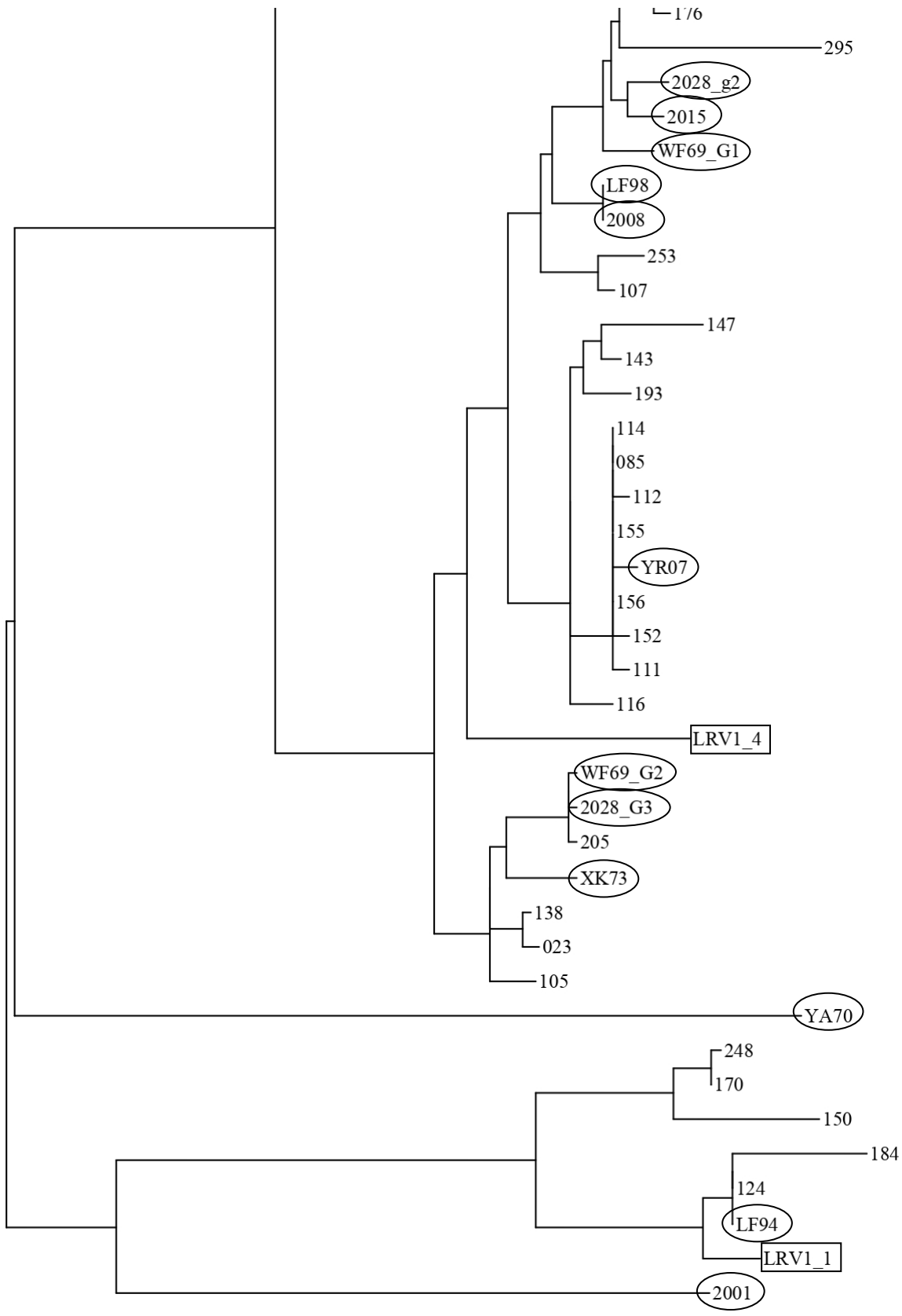
### References

- [1] Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, et al. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science* 2011;331:775–8.
- [2] Cantanhêde LM, da Silva Júnior CF, Ito MM, Felipin KP, Nicolette R, Salcedo JMV, et al. Further evidence of an association between the presence of *Leishmania* RNA virus 1 and the mucosal manifestations in tegumentary leishmaniasis patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0004079.
- [3] Ito MM, Catanhêde LM, Katsuragawa TH, da Silva Junior CF, Camargo LMA, Mattos R de G, et al. Correlation between presence of *Leishmania* RNA virus 1 and clinical characteristics of nasal mucosal leishmaniasis. *Braz J Otorhinolaryngol* 2015;81:533–40.
- [4] de Carvalho RVH, Lima-Junior DS, da Silva MVG, Dilucca M, Rodrigues TS, Horta CV, et al. *Leishmania* RNA virus exacerbates leishmaniasis by subverting innate immunity via TLR3-mediated NLRP3 inflammasome inhibition. *Nat Commun* 2019;10:5273.
- [5] Grybchuk D, Akopyants NS, Kostygov AY, Konovalovas A, Lye L-F, Dobson DE, et al. Viral discovery and diversity in trypanosomatid protozoa with a focus on relatives of the human parasite *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci* 2018;115: E506–15.
- [6] Tirera S, Ginouvès M, Donato D, Caballero IS, Bouchier C, Lavergne A, et al. Unraveling the genetic diversity and phylogeny of *Leishmania* RNA virus 1 strains of infected *Leishmania* isolates circulating in French Guiana. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11:e0005764.
- [7] Atayde VD, da Silva Lira Filho A, Chaparro V, Zimmermann A, Martel C, Jaramillo M, et al. Exploitation of the *Leishmania* exosomal pathway by *Leishmania* RNA virus 1. *Nat Microbiol* 2019;4:714–23. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0352-y>.
- [8] Castiglioni P, Hartley M-A, Rossi M, Prevel F, Desponds C, Utzschneider DT, et al. Exacerbated leishmaniasis caused by a viral endosymbiont can be prevented by immunization with its viral capsid. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11: e0005240.
- [9] Bourreau E, Ginouvès M, Prévot G, Hartley M-A, Gangneux J-P, Robert-Gangneux F, et al. Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 in *Leishmania guyanensis* increases the risk of first-line treatment failure and symptomatic relapse. *J Infect Dis* 2016;213:105–11.
- [10] Christen J-R, Bourreau E, Demar M, Lightburn E, Couppié P, Ginouvès M, et al. Use of the intramuscular route to administer pentamidine isethionate in *Leishmania guyanensis* cutaneous leishmaniasis increases the risk of treatment failure. *Travel Med Infect Dis* 2018;24:31–6.
- [11] Simon S, Veron V, Carne B. *Leishmania* spp. identification by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis and its applications in French Guiana. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;66:175–80.
- [12] Ginouvès M, Simon S, Bourreau E, Lacoste V, Ronet C, Couppié P, et al. Prevalence and distribution of *Leishmania* RNA virus 1 in *Leishmania* parasites from French Guiana. *Am J Trop Med Hyg* 2016;94:102–6.
- [13] Cantanhêde LM, Fernandes FG, Ferreira GEM, Porrozzini R, Ferreira R de GM, Cupolillo E. New insights into the genetic diversity of *Leishmania* RNA Virus 1 and its species-specific relationship with *Leishmania* parasites. *PLoS One* 2018;13:e0198727.
- [14] Hall T. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;41: 95–8.
- [15] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33:1870–4.
- [16] Galtier N, Gouy M, Gautier C. SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 1996;12: 543–8.
- [17] Adauí V, Lye L-F, Akopyants NS, Zimic M, Llanos-Cuentas A, García L, et al. Association of the endobiont double-stranded RNA Virus LRV1 with treatment failure for human leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Peru and Bolivia. *J Infect Dis* 2015;213:112–21.
- [18] Ogg MM, Carrion Jr R, Botelho ACDC, Mayrink W, Correa-Oliveira R, Patterson JL. Quantification of leishmanivirus RNA in clinical samples and its possible role in pathogenesis. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69:309–13.
- [19] Pereira L de OR, Maretti-Mira AC, Rodrigues KM, Lima RB, Oliveira-Neto MP de, Cupolillo E, et al. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with *Leishmania* RNA virus 1 infection in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013;108:665–7.

Données supplémentaires :







**Figure S1 : LRV phylogenetic tree, targeting the ORF1 and ORF2 sequences of the LRV.** Isolates in circles corresponded to isolates used by Tirera et. al 2017, strains in squares corresponded to reference strains. The tree was done with the SeaView software [16], based on a maximum likelihood phylogenies (PhyML) and the K80 model (Kimura 1980, all other default settings : branch support : aLRT : SH-like), TsTV/ratio : fixed at 4.0, none invariable site, across site rate variation optimize, Tree searching operations : NNI, Starting tree : BioNJ, optimized tree topology, 5 random starts).

Supplementary table 1: Multivariate analysis.

		LRV-	LRV+	Multivariate analysis	
				OR	p-value
Gender	female	4	12	0,00	0,9956
	male	8	73		
Suspected place of infection	Littoral	6	8	17,59	0,0391
	Inland	6	79		
Lesion size	≤ 2 cm	1	41	0,41	0,5292
	> 2 cm	3	20		

		LRV group		Multivariate analysis	
		A	B	OR	p-value
Gender	female	4	6	0,95	0,9545
	male	12	46		
Adenopathy	absent	11	44	0,16	0,0376
	present	7	12		
Nodule	absent	10	41	0,16	0,0259
	present	5	9		

# DISCUSSION

---

La leishmaniose est une maladie parasitaire qui se manifeste sous différentes formes. La forme la plus fréquente est la LC qui peut rester localisée (LCL) au point d'injection des parasites. Cette forme peut également évoluer vers des formes tégumentaires plus sévères, telles que la LCM, la LD ou la LCD, suite à la dissémination du parasite dans l'organisme de l'hôte.

Prévenir l'évolution sévère de cette maladie passe par l'identification des facteurs de risque y afférent. Mais la multitude de ces facteurs et la complexité de leurs interactions ne permet pas, à l'heure actuelle, d'établir un schéma précis. Néanmoins, certains facteurs semblent se démarquer, notamment la présence du LRV qui aggraverait la pathologie chez la souris et le hamster infectés par *L. guyanensis* (Ives et al. 2011).

Par ailleurs, des études suggèrent que la présence du LRV pourrait également affecter l'évolution de la maladie chez l'homme (Ito et al. 2015; Cantanhêde et al. 2015). C'est dans ce contexte que cette thèse s'est inscrite avec pour objectif de préciser l'influence de ce virus dans la pathologie humaine.

## **Le LRV en Amérique du Sud**

Ce travail de thèse a nécessité une étape préalable permettant de déterminer la prévalence de ce virus chez les *Leishmania* en Guyane Française. Ainsi, 80% des *L. guyanensis* étaient porteuses du LRV, avec une présence marquée dans l'intérieur du territoire (Ginouvès et al. 2016).

Le LRV a également été identifié dans d'autres régions d'Amérique du Sud, avec une présence restreinte au biome amazonien. Dans les études menées, qui incluaient des échantillons provenant de ce biome et/ou de zones extérieures à ce biome, on observe que la présence du LRV est particulièrement marquée dans les régions situées en Amazonie, tels que les états de Rondônia et d'Amazonas au Brésil (Ito et al. 2015; Cantanhêde et al. 2015), et la partie amazonienne de la Colombie (Salinas et al. 1996). En revanche, dans les régions situées en dehors du biome amazonien, tel que Rio de Janeiro, Bahia, Paraíba (Pereira et al. 2013) et Minas Gerais (Macedo et al. 2016) au Brésil, et la région pacifique de la Colombie (Salinas et al. 1996), le LRV semble être absent. En effet, aucune étude n'a mis en évidence la présence du LRV dans ces régions (0/125) (Salinas et al., 1996; Pereira et al., 2013; Macedo et al., 2016), mis à part 2 études qui rapportaient la présence du LRV dans environ 21% de leurs isolats (Tableau 4) (Saiz et al., 1998 ; Ogg et al. 2003). Ainsi, le taux de LRV rapporté en dehors de la région amazonienne est de 7,6% (14/183), contre 45,7% (103/225) à l'intérieur de cette région (Tableau 4). La présence marquée du LRV dans l'Amazonie s'expliquerait par la diversité des vecteurs, la présence d'espèces de *Leishmania* sympatriques<sup>40</sup> et des hôtes infectieux multiples qui

---

<sup>40</sup> Souches localisées dans la même zone géographique et susceptibles de se rencontrer fréquemment pour une hybridation génétique.

pourraient être des facteurs importants pour le maintien de la prévalence et de la distribution du LRV dans la région amazonienne (Salinas et al. 1996; Reithinger et al. 2007). En revanche, la présence de LRV en dehors de ce biome amazonien, comme en font état les études menées à Cuzco, au Pérou (Saiz et al. 1998) ou au Brésil (Ogg et al. 2003), pourrait être le signe d'une progression de la circulation d'isolats de *Leishmania* LRV+ en dehors de ce biome (Salinas et al. 1996).

### **Impact du LRV dans la pathologie humaine**

Nos différentes études visaient à déterminer l'influence du LRV dans la pathologie humaine. La publication n°5 montrait que la présence du LRV augmentait de 27% le risque d'échec thérapeutique à la pentamidine et de rechute symptomatique dans les infections dues à *L. guyanensis* ( $p=0,0009$ ) (Bourreau et al., 2016). Cette constatation a également été rapportée par Adai et al., dans le cas d'infections dues à *L. braziliensis* ( $p=0,043$ ) (Adai et al. 2015). Le LRV ne semblait pas agir directement sur le métabolisme du parasite pour lui conférer cette résistance aux traitements. Les tests de sensibilités que nous avons menés *in vitro* ne révélaient pas d'impact du LRV dans la sensibilité des *Leishmania* aux médicaments que ce soit dans le modèle promastigote axénique (cf. axe 2) ou le modèle amastigote en macrophage (Adai et al., 2015; Bourreau et al., 2016, communication personnelle). Cela signifie que le LRV affecterait l'efficacité du traitement en agissant plutôt sur la réponse immunitaire de l'hôte.

L'étude n°6, menée en collaboration avec Christen et al. n'affichait pas de rôle du LRV dans les échecs de traitement à la pentamidine ( $p=0.49$ ). La présence du LRV n'était pas non plus corrélée à la clinique des patients (Christen et al. 2018). En revanche, la voie d'administration de la pentamidine s'avérait être un facteur de risque d'échec thérapeutique. Une administration par voie intramusculaire (7mg/kg en 1 injection) entraînait 48,7% d'échecs contre 14,7% pour une administration par voie intraveineuse (12 mg/kg sur 5 jours) (Christen et al. 2018). Néanmoins, cette différence pourrait provenir d'une plus forte dose administrée dans le traitement par voie intraveineuse. En effet, des doses de pentamidine plus élevées semblent permettre une meilleure efficacité pour le traitement des cas sévères de la maladie (Nacher et al. 2001).

Les travaux présentés dans la publication n°7 consistaient à déterminer un lien entre le profil génétique des virus et la clinique ou la réponse thérapeutique des patients. Les résultats montraient que la présence des LRV ou leur profil génétique n'étaient pas liés à l'issue clinique des patients (Ginouvés et al., 2020).

Cette absence de corrélation entre la présence du LRV et les échecs thérapeutiques a également été rapportée récemment, dans une étude menée chez des patients infectés par *L. major* LRV2+ (Abtahi et al. 2020).

En revanche, certaines études ont fait état de l'implication du LRV dans la clinique des patients, à savoir son influence dans le développement de la LCM (Ito et al. 2015; Cantanhêde et al. 2015), qui pourrait être lié à la charge virale (Kariyawasam et al. 2020), rôle néanmoins écarté par d'autres études (Salinas et al. 1996; Saiz et al. 1998; Ogg et al. 2003; Pereira et al. 2013; Macedo et al. 2016; Kariyawasam et al. 2020).



Globalement, la plupart des études menées chez l'homme ne montre pas de lien entre la présence du LRV et les formes sévères de la maladie – en particulier la dissémination des lésions –, contrairement à ce qui a été observé dans le modèle murin. Cela pourrait s'expliquer par le fait que, d'une part, l'homme et la souris ont un fond génétique différent, y compris d'un point de vue immunologique. Cela se manifeste, entre autres, par des signes cliniques différents, puisque la souris ne développe pas de forme nasopharyngée comme chez l'homme, ce qui peut conduire à une mauvaise interprétation des formes muqueuses de la maladie (Kariyawasam et al. 2019). Cela peut également se manifester par une réponse immunitaire différente. Par exemple, chez la souris, la LCD et la LCM se caractérise par une réponse de type Th2 qui ne permet pas de contrôler le parasite, conduisant à une dissémination des lésions ; alors que chez l'homme, on observe une production importante de TNF- $\alpha$  qui conduirait à une réponse de type Th1 robuste, responsable d'une réponse hyper-inflammatoire conduisant à des métastases (Rossi & Fasel 2018).

D'autre part, si les résultats obtenus dans le modèle murin peuvent être variables d'une étude à l'autre, dans des conditions contrôlées et au sein d'une lignée isogénique de souris, cette variation sera accentuée dans le cadre d'une étude au sein d'une population humaine. Les variations rencontrées dans le modèle murin, peuvent être dues à des différences de paramètres entre les études, telles que l'espèce (voire la souche) parasitaire, la quantité de parasites administrée, le point d'injection des parasites (ex. museau ou patte), la présence ou non de salive de phlébotome au moment de l'injection (Cf 1.5.2.1), le stade parasitaire injecté (Giraud et al. 2019), etc. Ces paramètres conduisent à des niveaux d'expression différents de cytokines, engendrant des effets variables, à savoir protecteurs ou délétères. Par exemple, la production d'INF de type I par des macrophages infectés par *L. major*, espèce de l'Ancien Monde, conduit au contrôle de l'infection ; tandis que des macrophages infectés par des espèces du Nouveau Monde, *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*, conduit à la survie des parasites (Rossi et al. 2017).

La réponse immunitaire peut varier selon le modèle d'étude et la souche analysée. Par exemple, l'infection de macrophages de moelle osseuse de souris par la souche métastatique *L. guyanensis* M4147 (LRV1+), entraînait une réponse de type Th1 qui conduisait à une réponse inflammatoire robuste, responsable de métastases chez la souris. Cette réponse était caractérisée par une production importante d'IL-6, CXCL-10, TNF- $\alpha$  et CCL-5 (Ives et al. 2011). En revanche, l'infection de macrophages U937 humains par *L. braziliensis* LRV1+ entraînait une réponse de type Th2, qui pourrait être responsable d'un faible contrôle de l'infection et une forme plus sévère de la maladie. Cette réponse était caractérisée par une expression élevée de superoxyde dismutase<sup>41</sup> (SOD) et une faible expression d'IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et CXCL-10<sup>42</sup> (Kariyawasam et al. 2017). Les auteurs de cette étude indiquaient également que l'expression de ces cytokines/chimiokines variait en fonction de l'espèce de *Leishmania* étudiée et en fonction du temps. Cette variation pouvait également être observée entre souches de *Leishmania* dépourvues de LRV (Kariyawasam et al. 2017).

---

<sup>41</sup> Enzyme anti-oxydante qui piège les radicaux libres, protégeant ainsi les cellules de l'activité anti-oxydante.

<sup>42</sup> L'expression trop faible de l'IL-4, l'IL-5, l'IL-12, l'iNOS et l'IFN- $\beta$  n'ont pas permis leur dosage.

D'autres études menées sur le modèle murin indiquaient que, finalement, le LRV n'était pas responsable de l'aggravation de la maladie, mais que son impact était associé à la présence d'exosomes parasitaires. Atayde et al. indiquaient que les exosomes ont la particularité d'exacerber la maladie, contrairement au LRV seul. C'est l'association exosome/LRV qui amplifierait davantage la sévérité des lésions. Ces vésicules, dont la production est particulièrement accrue à 37°C, renferment un certain nombre de protéines parasitaires telles que la GP63. Les exosomes, qui sont libérés (avec les parasites) par le phlébotome au moment du repas de sang, ont des propriétés immunomodulatrices. Ils créent un environnement favorable à l'infection en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-17A (Atayde et al., 2015; 2019).

Chez l'homme, les formes sévères de la maladie semblent plutôt résulter de comorbidités telles que des co-infections par le VIH, par des mycobactéries disséminées ou par une présence sous-cliniques de tuberculose (Valencia et al. 2014). En effet, en plus d'être responsable de nombreux cas d'échecs thérapeutiques, la présence du VIH conduit à la diminution de la population des cellules LTCD4+, ce qui favorise une réponse de type Th2. Celle-ci entraîne une diminution de la fonction des macrophages et par conséquent la dissémination des parasites (Rossi & Fasel 2018).

La dissémination des parasites est un phénomène très fréquent car, bien que les LC soient considérées comme dermatropiques, elles sont également systémiques, puisque les parasites sont retrouvés dans les muqueuses ou la peau saine des patients guéris (Martínez-Valencia et al. 2017). Cette dissémination du parasite peut faire suite à la perte de la capacité d'adhésion des macrophages – par exemple, suite à l'action de la Matrix Metalloproteïnase 9<sup>43</sup> (MMP-9) – ce qui leur permet de migrer vers le système lymphatique ou sanguin. *L. braziliensis* a la particularité d'augmenter l'activité de cette enzyme (Coutinho et al. 2002; Camera et al. 2006; Maretti-Mira et al. 2011), ce qui pourrait expliquer l'apparition fréquente de lésions secondaires en présence de cette espèce parasitaire. Les cellules de Langerhans pourraient également jouer un rôle dans la dissémination des parasites en transportant les parasites du site d'infection vers les nœuds lymphatiques. Cette migration serait induite par le TNF- $\alpha$  (Moll 1993). D'autres facteurs présentés plus haut sont impliqués dans la dissémination des parasites, tel que la dégradation de l'inflammasome et les co-infections avec d'autres virus dont le LRV.

Après leur migration vers les différentes parties du corps, les parasites peuvent persister des années. Les traitements administrés permettent une résolution clinique des patients, mais ne permettent généralement pas d'éliminer totalement les parasites. La persistance de ces parasites pourrait être un moyen de maintenir une protection immunitaire chez l'hôte. Mais, d'un autre côté, cela pourrait contribuer à des réactivations de la maladie, caractérisées notamment par le développement de lésions secondaires (Martínez-Valencia et al. 2017). C'est la capacité des amastigotes à rentrer dans un état de semi-quiescence qui leur permet de subsister chez l'hôte. Cela se caractérise par une faible multiplication du parasite et une activité métabolique réduite. Ce stade serait le résultat d'un stress environnemental tel que la réponse immunitaire de l'hôte, une pression médicamenteuse, ou un manque en nutriments. Le parasite pourrait ainsi persister des mois, voire des années, afin d'éviter l'extinction de sa

---

<sup>43</sup> Dégrade les composants de la matrice extracellulaire.

population, avant de provoquer une réémergence de la maladie (Jara et al. 2019). Dans certains cas, les traumatismes locaux (piqûre, coupure, coup, tatouage...) peuvent déclencher la réémergence de la maladie (Wortmann et al. 2000).

Les traitements peuvent également être à l'origine de cas de réémergence de la maladie, voire d'échecs thérapeutiques. D'une manière générale, le traitement précoce d'une maladie permet de limiter son développement. Or, le traitement précoce d'une LC constitue un facteur d'échec thérapeutique et ne permet pas de limiter le développement d'ulcères, ni le risque de dissémination. En effet, un traitement à base d'antimoniés administrés dans les 5 semaines après l'infection peut conduire à des échecs thérapeutiques dans 47% des cas (Brésil). Cela pourrait s'expliquer par le fait que la réponse immunitaire acquise précoce n'étant pas encore bien mise en place au moment du traitement, soit modifiée par ce dernier, influençant ainsi la réponse immunitaire. Les échecs thérapeutiques peuvent également faire suite à l'administration d'un traitement inadapté ou mal dosé ou d'un traitement mal suivi (Rodrigues et al. 2006; Unger et al. 2009).

Les résultats de nos travaux ne montraient pas d'implication du LRV dans la dissémination des lésions, puisque la présence du LRV n'était pas associée à des signes de dissémination tels que les lymphangites et les adénopathies (publication n°7). En revanche, la présence du LRV pourrait avoir un lien avec les cas de réactivation de la maladie. En effet, dans notre étude (publication n°5) 12 des 75 patients (16%) ont présenté une réactivation de la maladie. Tous ces patients étaient LRV+ (12/44 (27%) LRV+) (Bourreau et al., 2016). L'étude d'Adaui et al. incluait 2 patients présentant une rechute sur les 54 patients suivis (3,7%), dont l'un était LRV+ et l'autre LRV- (Adaui et al., 2015). Dans leur étude, Pereira et al. ne relevaient aucun lien entre la présence du LRV et la sévérité de la maladie, mais ils soulignaient que les 2 seuls patients LRV+ présentaient une réactivation de la maladie (2/48, 4%) (Pereira et al. 2013). Une autre étude montrait que la présence de LRV, ou d'autres virus, induisait la synthèse d'IFN de type I qui pourrait contribuer aux réactivations de la maladie (Rossi et al. 2017). D'autre part, dans nos travaux correspondant aux études n°6 et 7, aucun des patients inclus ne présentaient de réactivation de la maladie après guérison, d'où, certainement, l'absence de corrélation entre la présence du LRV et les échecs thérapeutiques dans ces études (Christen et al., 2018; Ginouvès et al., 2020). Il serait donc intéressant de confirmer l'implication du LRV dans les rechutes, qui représentent 7% des cas en Guyane Française (Dedet et al. 1989), par l'étude d'un plus grand nombre de patients présentant des réactivations de la maladie.

### **Interactions LRV-*Leishmania*-hôtes**

Afin de mieux comprendre la nature des interactions au sein de la triade LRV-*Leishmania*-homme nous avons tenté de nous appuyer sur les connaissances relatives aux Totiviridae et autres virus de parasites d'intérêt médical.

La plupart de ces virus semblent coexister de manière harmonieuse avec leur hôte parasite, comme cela peut être le cas du TVV (cf. 2.1), du GLV (à condition de rester à une densité virale faible) (Miller et al. 1988; Furfine & Wang 1990; Sepp et al. 1994;

Garlapati et al. 2001), du *Cryptosporidium parvum virus 1* (CSpV-1) (Jenkins et al. 2015), ou encore du virus d'*Entamoeba histolytica* (Mattern et al. 1972). En revanche, les relations entre le duo virus – parasite et l'hôte humain varient d'un virus à un autre. Comme indiqué dans le chapitre 2, certains virus tels que le GLV ou le virus d'*Entamoeba histolytica* ne semblent pas influencer la physiopathologie de l'hôte humain (Olivier et al. 1984; De Jonckheere & Gordts 1987). En revanche, le TVV pourrait influencer la sévérité des symptômes selon son génotype (Wang & Wang, 1985) et induire une augmentation de la réponse immunitaire dans le modèle humain *in vitro*. Il serait également associé à un phénotype sensible *in vitro* au métronidazole, ce qui reste à confirmer chez le macro-hôte.

Dans nos études sur le LRV, nous n'avons pas observé d'influence du virus sur la sensibilité *in vitro* des parasites à la pentamidine, ni de génotype associé à la pathologie. Néanmoins, nous avons observé une modification de la réponse immunitaire (taux de transcrits CXCL-10 et IL-6 plus élevé) et une probable implication du LRV dans les échecs thérapeutiques, plus particulièrement dans la réactivation de la maladie.

La relation harmonieuse qui existe entre la *Leishmania* et son virus (cf. 3.4) ne semble pas toujours être la règle chez l'hôte humain, chez qui le contact avec une forte charge virale déclenche la riposte du système immunitaire. Il s'opère ainsi une « double activation » du système immunitaire : à l'encontre du parasite d'un côté et de son virus de l'autre, intensifiant ainsi la sévérité de la pathologie. Néanmoins, la complexité des interactions entre les microbes et leurs hôtes fait que la présence de certains micro-organismes peut être tolérée, comme cela est cas du duo *Leishmania* – LRV chez les hôtes réservoirs et insectes, jusqu'à être essentielle si l'on considère le microbiote dans son ensemble.

### **Symbiose macro-hôte – parasites**

Les microbes sont souvent perçus comme des agents strictement pathogènes, pourtant la plupart entretiennent une symbiose avec les autres micro-organismes, les organismes ou l'environnement dans lequel ils se trouvent, où ils ont un rôle essentiel dans l'équilibre de ces écosystèmes (Gilbert & Neufeld, 2014). Les bactéries, les archées, les mycètes, les protozoaires sont à la base de toutes les chaînes alimentaires en participant à la décomposition de la biomasse, ce qui permet d'éviter l'accumulation de cette matière organique dans l'environnement, tout en fournissant des molécules simples à partir de la dégradation de molécules complexes, qui sont ainsi assimilables - et essentielles - par d'autres organismes telles que les plantes (Gilbert & Neufeld, 2014). Les virus ont également un rôle bénéfique dans l'environnement, notamment au sein des océans dans lesquels ils contribuent au maintien de l'équilibre des écosystèmes marins à travers les organismes qu'ils parasitent (Suttle 2007).

Chez les macro-organismes, tels que les humains, les animaux, les insectes et les plantes, la présence de micro-organismes est également essentielle et forme le microbiote. Cet ensemble macro-organisme – micro-organismes constitue ainsi l'holobionte (Gordon et al. 2013). Des études menées chez l'homme indiquent que le microbiote, le virobiote et le mycobiote constituent à eux-mêmes un organe essentiel, où

les micro-organismes interagissent non seulement entre eux, mais également avec leur hôte, en participant ainsi à son homéostasie. La contribution de ce biote, qui commence à être mis en lumière depuis peu, englobe la modulation du système immunitaire, la protection contre certaines maladies telles que le diabète et les cancers, la protection contre des micro-organismes pathogènes, la mise à disposition de nutriments essentiels... (Lozupone et al., 2012; Robinson & Pfeiffer, 2014; Laforest-Lapointe & Arrieta, 2018). Les virus ont également un rôle dans l'équilibre du microbiote, qui commence à peine à être considéré, notamment les bactériophages qui apportent des caractéristiques particulières à leurs hôtes bactéries par le mécanisme de transfert de gènes. Ces gènes peuvent apporter : une résistance à la réponse immunitaire innée (par exemple au complément) ou aux antibiotiques, la capacité à dégrader les immunoglobulines, certaines fonctions métaboliques..., mais ces avantages sélectifs peuvent également être transmis aux agents pathogènes. Les virus sont également impliqués dans le façonnage de l'immunité de l'hôte mammifère (Abeles & Pride, 2014).

Cette symbiose, entre les micro-organismes et leurs macro-hôtes, a pu être la règle lors de leur rencontre initiale, dans la mesure où il n'est pas dans l'intérêt d'un parasite de nuire à son hôte ; ou, au contraire, être le fruit d'une lente coévolution entre les deux organismes. Cette harmonie est possible grâce à l'établissement d'une tolérance de l'hôte à l'égard de son microbiote. En particulier, le système immunitaire de l'hôte doit trouver un équilibre dans lequel il ajuste sa réponse vis-à-vis des microbes commensaux et environnementaux non-pathogènes. En effet, une réponse trop intense peut conduire à l'émergence de maladies inflammatoires, alors qu'une réponse trop faible peut conduire à des infections microbiennes invasives (Pamer 2007). Cette modération de la réponse immunitaire pourrait passer par (1) la reconnaissance de PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns (motifs moléculaires associés au pathogène)) – ou plutôt des MAMPs (Microbe Associated Molecular Patterns) – caractéristiques des microbes commensaux qui auraient pu avoir subi des modifications pour être distingués des microbes pathogènes ; (2) la diffusion de signaux tolérogéniques<sup>44</sup> (comme des signaux antagonistes de la réponse immunitaire) par les microbes commensaux. De ce fait, l'intrusion d'un microbe étranger au microbiote et ne présentant pas le même mode de fonctionnement que celui-ci, conduirait à la rupture de cette harmonie entraînant ainsi une dysbiose<sup>45</sup>. D'autre part, ce pathogène qui se retrouve finalement dans un environnement non-naturel, peut déclencher une réponse immunitaire particulièrement puissante qui mène à l'altération des tissus de l'hôte et donc à la manifestation de la pathologie. En fin de compte, les troubles liés à la présence des agents pathogènes sont souvent le résultat d'une réponse immune trop intense plutôt que le résultat du pathogène lui-même (Vance et al. 2009; Sansonetti 2011). Ainsi, la dysbiose occasionnée par le micro-organisme étranger est le résultat de son introduction dans un environnement qui ne lui est pas familier, l'hôte non-naturel, ce dernier pouvant ainsi être considéré comme « hôte accidentel ».

Dans le cas de la leishmaniose, le réservoir primaire et le vecteur constituent les hôtes naturels du parasite, tandis que le réservoir secondaire, tel que l'homme, constitue un hôte non-naturel chez qui le parasite engendre des troubles physiologiques. Néanmoins,

---

<sup>44</sup> Tolérance immunitaire vis-à-vis d'un antigène.

<sup>45</sup> Rupture de la symbiose.

toutes les *Leishmania* ne sont pas pathogènes pour l'homme puisque parmi la cinquantaine d'espèce de *Leishmania* connues à ce jour, une vingtaine a été identifiée comme pathogène, dont certaines sont à l'origine de formes asymptomatiques. Cette pathogénicité dépend du statut immunitaire de l'hôte (patrimoine génétique, immunocompétence...) et des facteurs de virulence du parasite (GP63, LPG...), telle que la présence du gène de virulence A2, présent dans les parasites du complexe *L. donovani* (Azizi et al. 2009), impliqué dans le tropisme viscéral des *Leishmania* (Zhang & Matlashewski, 1997).

Ainsi, les hôtes réservoirs et vecteurs des *Leishmania* auraient établi une tolérance à l'infection. A l'instar des interactions hôtes naturels-virus décrits par Mandl et al., la relation hôte réservoir (hôte naturel) – parasite pourrait également résulter d'un contrôle plus efficace de la réplication des parasites ou d'une tolérance des charges parasitaires plus élevées que chez un hôte non-naturel (Mandl et al. 2015). De plus, une interaction particulière entre le parasite et le microbiote de l'hôte-naturel permettrait une modulation de la réponse immunitaire de l'hôte via son microbiote, prévenant ainsi la pathogénèse (Mandl et al. 2015). Chez l'hôte non-naturel, les différents microbiotes (de la peau, de l'intestin) permettraient également, dans une certaine mesure, de maîtriser l'évolution de la leishmaniose (Lopes et al. 2016). En effet, l'absence de microbiote chez la souris conduit à une prolifération incontrôlée des parasites qui se manifeste par une forme sévère de la maladie (Lopes et al. 2016). Toutefois, même chez les souris saines, une infection par le parasite peut entraîner une dysbiose du microbiote de la peau, aboutissant à une aggravation des lésions cutanées. Étonnamment, cette dysbiose peut s'étendre à des sites cutanés non-infectés par les *Leishmania* voire aux souris avoisinantes. Néanmoins, ce phénomène n'a pas été observé chez l'homme (Gimblet et al. 2017). Chez l'hôte vecteur, bien que le parasite entraîne quelques désagréments telle que l'obstruction de l'intestin et de la valve stomodéale, le rôle du microbiote du phlébotome est fondamental dans le développement et la transmission des *Leishmania* (Telleria et al. 2018).

### *Théories sur la nature des premiers hôtes des Leishmania*

La *Leishmania* vit donc en symbiose avec son hôte naturel et également avec un virus qu'elle abrite, le LRV, grâce à un équilibre établi depuis une rencontre originelle.

De nombreux scientifiques s'interrogent quant à la nature de l'hôte primitif des *Leishmania*. Plusieurs scénarios sont ainsi proposés. L'un suggère que cet hôte était un animal vertébré marin, un poisson, en raison du fait que ce soient les animaux les plus anciens. Les protozoaires, résidant au niveau de ces poissons, auraient été transmis entre poissons via les sangsues, en guise de vecteurs.

L'autre suggère que cet hôte était un animal invertébré, un insecte, et plus précisément un phlébotome qui se serait développée dans des habitats abritant des flagellés libres aux caractéristiques des trypanosomatidés monoxènes. Ces protozoaires, ingérés par les larves de phlébotome, se seraient multipliés au sein celles-ci. Au stade adulte, des phlébotomes renfermant les protozoaires auraient pu les transmettre à un vertébré lors d'un repas de sang. Les protozoaires auraient ensuite continué à maintenir un cycle

entre le vecteur et le vertébré. Ces premiers vertébrés pourraient être les reptiles, puis les rongeurs qui sont ensuite devenus les hôtes réservoirs ayant joué un rôle dans la dispersion du parasite (Tuon et al. 2008; Akhoundi et al. 2016). Dans les néo-tropiques, les premiers hôtes vertébrés des *Leishmania* pourraient être les paresseux (Akhoundi et al. 2016).

### *Théorie sur l'origine des LRV*

En ce qui concerne l'origine du LRV chez les *Leishmania*, ou d'une manière plus globale des virus en général, plusieurs scénarios ont été avancés. Parmi ceux-ci, (1) une origine pré-cellulaire, avant l'ancêtre LUCA (Last Universal Common Ancestor), ou (2) une présence plus récente, avec une origine endogène (suite à la découverte des éléments mobiles de type transposons) où les virus seraient issus d'un gène qui se serait échappé du génome de son organisme hôte et qui aurait évolué de manière indépendante au niveau de sa réplication (Holmes 2011). Dans ce cas-ci, aucune séquence de LRV ayant une homologie avec celles des *Leishmania* n'a été trouvée (Tarr et al. 1988), ce qui écarterait cette origine. Il a également été proposé (3) une évolution à partir d'un ancêtre viral simple qui a ensuite acquis des gènes, lui permettant de se complexifier. Mais cela implique pour les virus à grands génomes que la taille de la capsid ait pu s'agrandir afin d'accueillir de nouveaux gènes, la taille de la capsid étant dépendante de la taille du génome viral. Une autre hypothèse est (4) une évolution à partir d'un ancêtre viral complexe qui a subi une réduction de son génome pour se simplifier. Cette réduction aurait été possible par le fait que l'hôte de l'ancêtre viral dans lequel il vivait lui apportait tous les éléments nécessaires à son développement. Une autre théorie proposée est (5) « la fusion des membranes ». Les virus auraient évolué à partir d'espèces parasitaires intracellulaires qui ont modifié progressivement leurs membranes et, ayant un accès aux ressources de la cellule hôte, auraient fini par perdre leur membrane au sein de cette cellule. Il en aurait résulté la dispersion de leurs composants dans leur cellule hôte. De ce fait, un virus issu d'une cellule hôte infecterait toujours cette cellule (Banda 2009). Pour appuyer cette théorie, Banda indique que les protéines virales de type capsid (capsid-like proteins) seraient retrouvées de manière courante chez les cellules actuelles, mais du fait de leurs séquences peu homologues, voire non homologues, aux protéines de capsid virales, elles ne pourraient pas être identifiées par les programmes phylogénétiques. Parmi ces protéines, on retrouverait la protéine de la couche S des archées, les protéines bactériennes impliquées dans la formation de micro-compartiments (par exemple les carboxysomes<sup>46</sup>)... Aussi, elle indique que les microsporidies<sup>47</sup> pourraient constituer un modèle de compréhension de l'évolution des virus, de par leur mécanisme d'infection des cellules hôtes, avec la formation d'un tube polaire, puis l'injection de leur génome et de leur sporoplasme dans la cellule hôte (Banda 2009).

---

<sup>46</sup> Micro-compartiment retrouvés chez certaines bactéries, qui contiennent des enzymes impliquées dans la fixation du carbone.

<sup>47</sup> Eucaryotes récemment placés dans le règne des *Fungi*. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires des vertébrés et invertébrés.

L'origine des virus reste encore difficile à statuer, d'autant plus que la présence de virus à ADN d'une part et à ARN d'autre part, la petite taille des génomes viraux, un fort transfert de gènes latéral, l'absence de gènes partagés entre tous les virus, les fortes différences de séquences en acides aminés de la RdRp, etc. ajoutent une complexité dans la compréhension de l'histoire des virus (Banda, 2009; Holmes, 2011).

Quant à l'origine du LRV dans les différentes espèces de *Leishmania*, elle pourrait s'expliquer par l'acquisition du virus chez un ancêtre commun aux *Leishmania* (Widmer & Dooley, 1995), qui aurait ensuite évolué vers les différentes espèces actuellement présentes, dont certaines auraient perdu le virus. La persistance du virus dans les *Leishmania* du Nouveau du Monde pourrait impliquer la présence de conditions optimales au maintien de ce virus chez ces parasites. Chez les *Leishmania*, une divergence des LRV (LRV1/2) aurait pu avoir eu lieu après la séparation des continents entre l'Ancien et le Nouveau Monde (Widmer & Dooley, 1995; Grybchuk et al., 2018a).

Selon la classification actuelle de l'ICTV, la famille des Totiviridae renferme 5 genres : les *Giardiavirus*, les *Leishmanivirus*, les *Trichomonasvirus* abrités par des protozoaires (respectivement les *Giardiidae* (*Giardia*), les *Trypanosomatidae* (*Leishmania*), les *Trichomonadidae* (*Trichomonas*)), les *Totivirus* et les *Victorivirus* abrités par des *Fungi* (respectivement les *Saccharomycetaceae* (*Saccharomyces*) et les *Pleosporaceae* (*Helminthosporium*)). Les analyses phylogénétiques indiquent que le *Victorivirus Helminthosporium victoriae virus* (Hv190SV) est plus proche du *Leishmanivirus* que du virus de la levure, ce qui pourrait indiquer que les Totiviridae seraient issus d'un virus non-infectieux abrité par un ancêtre unicellulaire qui aurait donné naissance aux *Fungi* et aux protozoaires (Ghabrial 1998; Stuart et al. 1992). D'autre part, au vu de la similarité de séquence de la RdRp entre les *Partitivirus* et les *Totivirus*, il a été suggéré que les *Partitivirus* dérivent d'un ancêtre *Totivirus*. Au lieu de présenter un génome viral sur un segment (protéine de capsid et RdRp) comme le *Totivirus*, les deux ORF des *Partitivirus* sont répartis sur 2 segments (Ghabrial, 1998; Sabanadzovic et al., 2009).

Toutefois, la question de l'origine du LRV se complique lorsque l'on sait que, d'une part les *Leishmania* peuvent abriter d'autres genres viraux que les Totiviridae (cf. 3) (Grybchuk et al. 2020) et, d'autre part, que les LRV peuvent être retrouvés chez d'autres genres de protozoaires (Grybchuk et al. 2018c). De plus, quand on se penche sur les virus d'autres protozoaires, on se rend compte de la diversité de ces virus au sein d'un même règne de protozoaires, voire au sein d'un même genre ou espèce (annexe 4). Cela est le cas du genre *Leptomonas*, un protozoaire monoxène dont le cycle se déroule chez l'insecte, qui peut abriter différents genres viraux. L'espèce *Leptomonas moramango* abrite le *bunyavirus-like virus (Leishbunyavirus-1, LBV-1)* (Akopyants et al., 2016a; Grybchuk et al., 2018a). *Leptomonas seymouri* abrite le *Narna-like virus (NLV)*, (Grybchuk et al., 2018b). D'autre part, le LBV-1 peut être abrité par des parasites monoxènes d'insectes, tels que *Le. moramango*, *Crithidia spp.* (Grybchuk et al., 2018b), *Bleptomonas spp.* (Grybchuk et al., 2018), mais également par des protozoaires dixéniques tels que *Trypanosoma spp.* (Grybchuk et al., 2018b) et *Leishmania (Leishmania) martiniquensis* (Grybchuk et al. 2020).

Par ailleurs, des virus de la famille des Totiviridae (mais pas officiellement intégrés dans cette famille par l'ICTV) ont également été identifiés chez d'autres parasites tels que les



*Eimeria*<sup>48</sup> (Wu et al., 2016 ; Xin et al., 2016), ou chez des macro-organismes comme (1) les insectes tel que le moustique (*Omono river virus* (OMRV) (Isawa et al. 2011), *Armigeres subalbatus totivirus* (AsTV) (Zhai et al. 2010)...), la drosophile (*Drosophila totivirus* (DTV) (GenBank accession no. NC\_013499)) et la fourmi (*Camponotus nipponicus virus* (CNV) (Koyama et al. 2016)), (2) les animaux tel que le saumon (*Piscine myocarditis virus* (PMCV) (Lovoll et al. 2010)), la crevette pénéide (*Infectious myonecrosis Virus* (IMNV) (Lovoll et al. 2010)) et (3) les plantes (ou les *Fungi* endophytes) (*Panax notoginseng virus A* (PnVA) (Guo et al. 2016)). Un autre virus qui pourrait être issu de la famille des Totiviridae, appelé le *Tianjin totivirus-like virus* (ToV-TJ), a également été identifié dans les fèces de chauves-souris. Ce virus très proche de l'OMRV pourrait appartenir à la même espèce que ce dernier. En effet, de nombreuses chauves-souris étant insectivores, plusieurs virus retrouvés dans leurs fèces pourraient provenir d'insectes et, dans le cas présent, le ToV-TJ pourrait provenir d'un moustique qui hébergeait l'OMRV (Yang et al. 2012). Les chauves-souris sont un réservoir exceptionnel de virus tels que les Totiviridae, les Bunyaviridae, les Narnaviridae et une multitude d'autres familles de virus. Elles jouent ainsi un rôle important dans la dispersion des virus dans l'environnement.

La diversité des virus retrouvés chez les protozoaires et leur répartition au sein de ces hôtes parasites suggère des acquisitions multiples et variées, plutôt qu'une origine unique. Certains virus pourraient provenir d'un ancêtre commun protozoaire, tandis que d'autre pourraient être la conséquence d'infections via les insectes, sachant que la plupart des protozoaires, monoxènes ou dixènes, ont un cycle chez l'insecte (annexe 4, Figure 33). Chez les insectes hématophages, ces infections ont pu avoir eu lieu au cours des repas sanguins, tandis que chez les insectes non-hématophages, elles ont pu se produire suite à la consommation de fèces contaminées, ou autre selon le mode de nutrition de l'insecte. Puis, comme indiqué plus haut, les parasites et les virus faisant partie du microbiote de l'intestin des insectes, ces derniers auraient pu constituer un lieu de rencontre entre ces différents microbes. Les *Fungi*, tels que les levures, font également partie du microbiote des insectes. Ces levures ont la particularité d'abriter des *Narnavirus* qui auraient pu être transmis aux Trypanosomatidae au sein de l'insecte hôte (Grybchuk et al. 2018a). Les mammifères pourraient également constituer un site de rencontre entre les protozoaires et les virus, tel que les *Bunyavirus*. Ces virus ont pour hôtes naturels les chauves-souris mais également les rongeurs. Or, il s'avère que les rongeurs constituent des hôtes réservoirs des *Leishmania*, qui auraient également pu être les hôtes réservoirs primitifs de ces parasites. Ainsi, l'espèce *L. martiniquensis* aurait pu acquérir le BLV-1 chez un rongeur ou chez un insecte. Les *Bunyavirus* sont également retrouvés chez des parasites de plantes, les *Phytomonas*, et chez les plantes elles-mêmes. Le virus aurait pu être transmis des plantes au parasite ou de l'insecte au parasite, qui l'aurait à son tour transmis à la plante. D'autre part, les phlébotomes hématophages se nourrissant également de nectar auraient pu ingérer des *Phytomonas* porteurs du virus (ou des champignons de plantes porteurs de virus) qui, se retrouvant dans l'intestin des phlébotomes (ou d'autres insectes), aurait pu transmettre le virus aux autres Trypanosomatidae présents dans leur intestin. Les animaux, tels que les poissons et les chauves-souris, pour qui les insectes sont des sources de nourriture, auraient pu

---

<sup>48</sup> Parasite intracellulaire responsable de la coccidiose, provoquant des lésions intestinales chez les volailles.

s'infecter à leur tour en les consommant (annexe 4, Figure 33). Reste à savoir comment ces particules virales, dont la plupart sont non-infectieuses, ont pu infecter ces organismes. En effet, des travaux préliminaires que nous avons menés chez les phlébotomes indiquaient que le LRV n'était présent chez le vecteur que lorsque le parasite était également présent. Toutefois, des analyses phylogéniques indiquent que certains virus, tels que l'AToV, le CNV, le PMCV..., seraient proches des *Giardiavirus* (GLV-like), des virus qui ont la particularité d'être infectieux, ce qui pourrait expliquer cette transmission à d'autres organismes (Oliveira et al. 2014; de Lima et al. 2019).

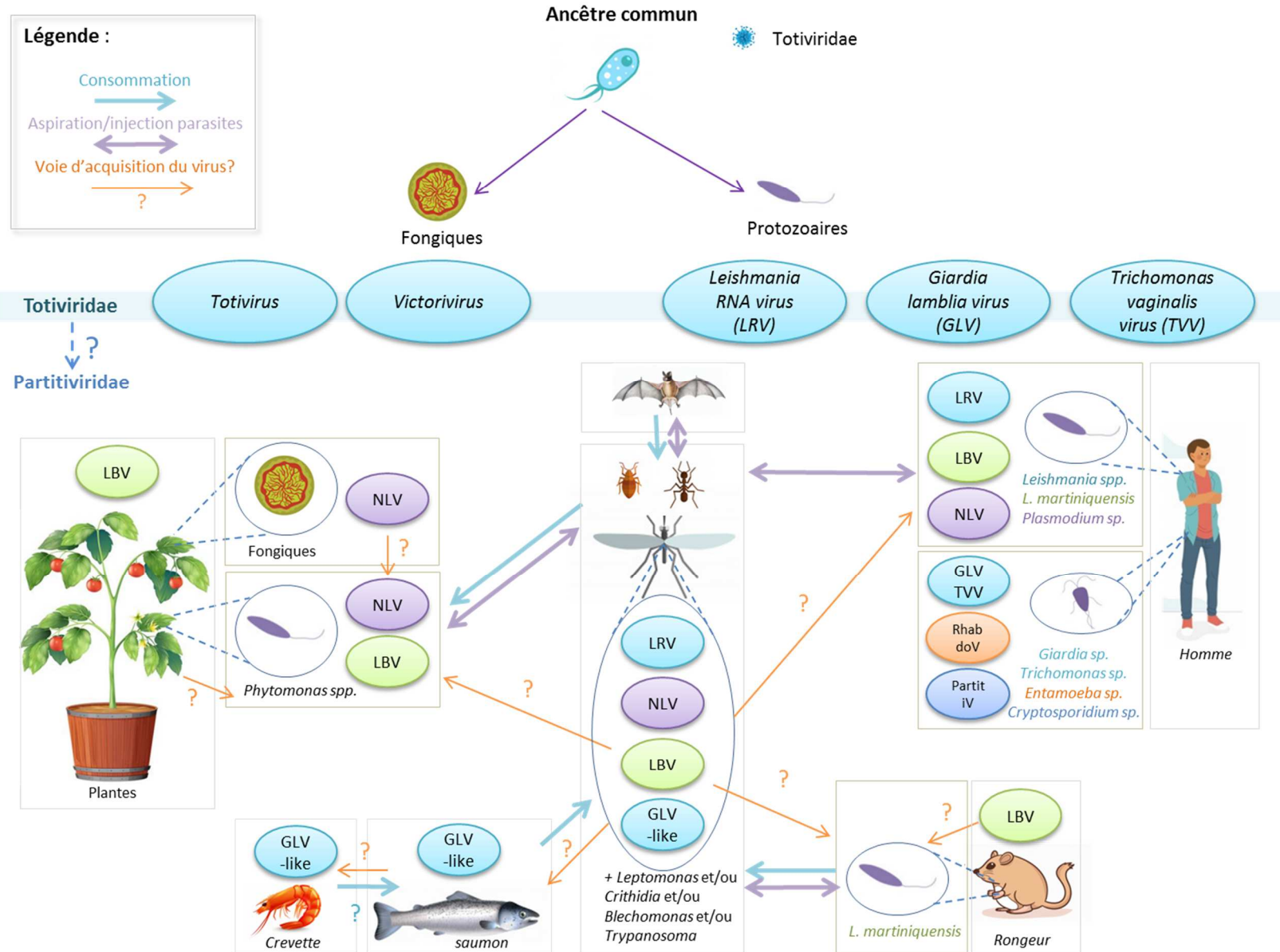


Figure 26 : Origine supposée de quelques virus de parasites et de Totiviridae

LBV : Leishbunyavirus, NLV : Narna-like virus, LRV : Leishmania RNA virus, GLV : Giardia lamblia virus, TVV : Trichomonas vaginalis virus, RhabdoV : Rhabdovirus, PartitIV : Partitivirus

## L'apport des virus

La transmission des virus de protozoaires/*Fungi* aux hôtes non-naturels, tels que le poisson et la crevette, a conduit à la mise en place d'un cycle viral pathogène. Chez l'hôte naturel, on observe un équilibre entre les deux protagonistes voire l'acquisition d'avantages sélectifs, comme on peut l'observer chez la levure avec le phénotype killer. Le LRV pourrait également, malgré lui, apporter un avantage à son hôte parasite dans la mesure où il favorise son développement et sa dissémination chez le macro-hôte. Toutefois, cet avantage ne semble pas être apporté spécifiquement par le LRV, mais par les virus d'une manière générale. En effet, il a été montré dans le modèle murin que l'introduction d'un virus, celui de la chorioméningite lymphocytaire<sup>49</sup> (VCML) ou l'injection d'un virus par le phlébotome au moment du repas de sang tel que le Toscana Virus<sup>50</sup> (TosV), peut également amplifier l'infection en présence de *L. guyanensis* LRV(-). De plus, lorsque le VCML est injecté après la guérison de la lésion, on observe une rechute de la maladie qui se manifeste par une réapparition de la lésion et une augmentation du nombre de parasites. L'impact de ces co-infections *Leishmania* –virus dans la leishmaniose indique que la présence de certains virus chez les patients pourrait être responsable de l'exacerbation de la leishmaniose, d'autant plus qu'il n'est pas nécessaire que le virus pénètre par le même site d'entrée que celui des *Leishmania* (Rossi et al. 2017).

La présence de virus indépendants du parasite pathogène peut également affecter l'évolution de la maladie, comme cela a été rapporté dans des co-infections *L. donovani* /*Leptomonas seymouri* – *Leptomonas seymouri* Narna-like virus 1 (*Lepsey* NLV-1). En effet, *Leptomonas*, un parasite monoxène dont le cycle se déroule uniquement chez son hôte insecte, n'a pas de cycle chez l'hôte mammifère et n'induit pas de pathologie. Cependant, ce parasite abrite un virus, le NLV-1, qui pourrait entraîner, tout comme le LRV, une activation de la réponse immunitaire dans les cas de co-infections *Le. seymouri* – *Lepsey* NLV-1/*L. donovani*, dans la leishmaniose post-kala-azar (Kraeva et al., 2015; Lye et al., 2016; Sukla et al., 2017).

D'autres virus de protozoaires et de *Fungi* sont également potentiellement impliqués dans la pathologie du macro-hôte. Le *L. martiniquensis* LBV-1 (*LmarLBV1*) identifié chez *L. martiniquensis* pourrait entraîner une forme sévère de la LV (Grybchuk et al. 2020). La présence d'un Totiviridae chez la levure *Malassezia restricta*, le *M. restricta* KCTC 27540 Mycovirus, semble induire une réponse inflammatoire médiée par les TLR-3 dans le modèle *in vitro* humain et pourrait être impliqué dans les pathologies cutanées (Olivier et al. 1984; De Jonckheere & Gordts 1987). La présence de TVV chez TV semble aggraver les symptômes de la maladie (cf. 2.1).

Néanmoins, certains virus, notamment de *Fungi*, présentent des effets bénéfiques chez le macro-hôte. Par exemple, en présence de l'hypovirus *Cryphonectria* – un virus du

---

<sup>49</sup> *Arenavirus* (Arenaviridae) retrouvé chez les rongeurs, provoque rarement des infections symptomatiques chez l'homme. Les symptômes peuvent se manifester par un état grippal et dans de rares cas par une méningite.

<sup>50</sup> *Phlébovirus* (Bunyaviridae) transmis à l'homme via la morsure des phlébotomes. Les infections sont généralement asymptomatiques et dans de rares cas ce virus provoque des méningites aiguës.

*Fungi Cryphonectria parasitica* responsable de la brûlure du châtaignier – la pathologie de la plante est considérablement diminuée. D'autres virus, normalement pathogènes pour l'homme, n'induisent pas systématiquement de pathologie et peuvent finalement servir à protéger contre d'autres virus davantage pathogènes, tel que le virus de l'hépatite G, un virus non pathogène rencontré couramment chez l'homme, qui pourrait entraîner une évolution plus lente du VIH chez son hôte. Le *Cytomégalovirus* humain qui pourrait éviter une surinfection due au VIH-1 (Shen 2009; Roossinck 2011), etc.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

Les leishmanioses tégumentaires se caractérisent par une évolution difficilement prévisible de la maladie, allant d'une LC bénigne à des formes plus sévères. Le LRV constitue un élément singulier pouvant être impliqué dans la modulation de la leishmaniose, dans la mesure où sa présence engendre une exacerbation de la maladie dans le modèle murin et que ce processus peut potentiellement se produire chez l'homme.

En Guyane Française, nous avons observé une prévalence de plus de 80% de ce virus dans l'espèce *L. guyanensis*, avec une présence marquée particulièrement dans les régions de l'intérieur. Cette présence marquée du virus témoigne du maintien de la symbiose virus – parasite chez *L. guyanensis*, après la séparation des continents.

Les outils moléculaires définis ont permis de distinguer 6 clusters de LRV, dont 2 clusters majoritaires. L'étude de la sensibilité *in vitro* d'une trentaine d'isolats a montré que la sensibilité des parasites à la pentamidine ou aux autres molécules thérapeutiques testées est extrêmement variable d'une espèce à l'autre, mais également d'un isolat d'une même espèce à un autre, et ne dépend pas de la présence du virus. En ce qui concerne l'implication du LRV dans l'efficacité du traitement chez l'homme, nos résultats étaient plutôt divergents. La première étude présentait le LRV comme un facteur qui augmentait de 27% le risque d'échec thérapeutique et de rechutes, tandis que les deux autres ne mettaient en évidence aucun lien entre la présence du LRV et les échecs thérapeutiques. La recherche d'un génotype de LRV impliqué dans la maladie, comme démontré chez le TVV, n'a pas non plus montré de lien avec ces échecs thérapeutiques. Finalement, la comparaison de plusieurs études menées sur le LRV pourrait indiquer que ce virus serait impliqué uniquement dans les rechutes de la maladie, plutôt que dans les échecs thérapeutiques primaires. Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ce rôle. En effet, si le LRV module la réponse immunitaire et conduit ainsi à des réactivations de la maladie, la détection de ce virus sera essentielle afin de prévenir ces réactivations. Aussi, la compréhension des mécanismes mis en jeu par le virus dans ce processus permettra de mieux agir sur le système immunitaire dans le but d'orienter correctement la réponse immunitaire.

De nombreux autres facteurs pourraient être impliqués dans ces réactivations, mais également dans les échecs thérapeutiques et dans l'évolution clinique de la maladie. Parmi ceux-ci, on compte (1) des éléments parasitaires interagissant avec le LRV, tels que les exosomes, (2) la capacité du parasite à résister aux molécules thérapeutiques, notamment grâce à sa plasticité génomique, (3) les gènes de virulence des parasites, (4) le statut immunitaire de l'hôte, (5) le traitement administré ainsi que son mode d'administration et la dose utilisée, (6) la co-infection des parasites avec des virus à ARN (notamment le LRV), (7) l'équilibre du microbiote de l'hôte, sans compter les facteurs environnementaux, socio-économiques, culturels, comportementaux, etc.

Comme indiqué plus haut, la leishmaniose est une maladie complexe qui implique de nombreuses interactions, dont celle avec le microbiote de l'hôte. Celui-ci peut influencer

la réponse immunitaire de son hôte afin d'éviter le développement de réponses inflammatoires démesurées et délétères. Ainsi, la prise en compte de cet holobionte dans son intégralité est primordial, ce qui pourrait passer par des traitements à base de biotiques bactériens, viraux ou parasitaires (Partida-Rodríguez et al. 2017), de traitements immuno-modulateurs adéquats, etc.

Les activités humaines et la déforestation conduisent à un rapprochement entre les hommes et les phlébotomes qui se nourrissent généralement sur des animaux sauvages. Bien que toutes les espèces de *Leishmania*, ou autres trypanosomatidés, ne soient pas pathogènes pour l'homme, certains de ces protozoaires peuvent le devenir, comme cela a été le cas d'un patient immunocompétent ayant succombé à ce qui semblait être une leishmaniose viscérale, mais causée par un trypanosomatidé monoxène proche de *Crithidia* (Maruyama et al. 2019). Aussi, de nombreuses espèces parasitaires encore cloisonnées dans les forêts primaires pourraient potentiellement présenter un risque, et cette promiscuité augmenterait la possibilité de transmission de ces espèces de *Leishmania* jusqu'alors inconnues (Steverding 2017). A cela pourrait s'ajouter l'échange de nouveaux virus parasitaires entre les protozoaires, voire les organismes. Ces échanges pourraient potentiellement conduire à des formes sévères de la maladie.

Le changement climatique, en plus de la déforestation, pourraient également modifier l'environnement, rendant ainsi des régions plus propice à certaines espèces de phlébotomes. En ce qui concerne la Guyane Française, un des risques qui pourrait en découler serait l'émergence de *Lu. longipalpis*, le vecteur principal de *L. infantum*, parasite responsable de la leishmaniose viscérale. Ce vecteur, localisé dans des régions plutôt sèches, est présent dans certaines régions du Brésil. Absent des régions forestières, on ne le retrouve pas en Guyane Française, ni au Suriname et au Guyana (Rotureau 2006). Néanmoins, une vigilance particulière est apportée à l'espèce *L. infantum* en Guyane Française, du fait que sa présence chez des animaux autochtones (2,3%), notamment des chiens domestiques, ait été rapportée (Medkour et al. 2019). D'autre part, une étude menée en Iran a rapporté la présence de LRV2 dans un isolat de *L. infantum* issu d'un patient atteint d'une LV, résistant aux antimoniés (Hajjarian et al. 2016).

En perspective de ce travail de thèse, une étude de l'implication du LRV, et de ses génotypes, dans les réactivations de la maladie est envisagée. Toutefois, cette investigation pourra présenter des limites dans la mesure où elle nécessitera un nombre important de patient présentant des rechutes. De plus, la distinction entre une récurrence et une nouvelle infection n'est pas toujours aisée, particulièrement en zone endémique. Cette difficulté pourrait être surmontée par la caractérisation génétique des *Leishmania*. Il n'est pas à écarter que dans certains cas, un même profil génétique parasitaire puisse être le résultat d'une réinfection dans la même zone que la primo-infection. Par ailleurs, d'autres virus humains peuvent potentiellement être impliqués dans les réactivations de la maladie.

L'étude de la prévalence et de l'implication des virus de parasites d'intérêt médical en Guyane Française est également envisagée afin d'apporter plus de connaissances sur la diversité des virus de parasites et leur implication dans ces maladies ou leur apport chez leur hôte parasite.

Les travaux présentés dans cette thèse soulignent également l'importance d'étudier les aspects immunologiques de la leishmaniose afin d'approfondir la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu dans les interactions entre le LRV, la *Leishmania* et le macrophage.



# ANNEXES

Annexe 1 : Rôles des différentes cytokines et chimiokines

	Nom abrégé	Nom	Cellules productrice	Cellules cibles	Effets principaux	Action sur la réponse inflammatoire
Cytokines	IL-2	Interleukine-2	Lymphocyte Th1	Lymphocyte T	Croissance différenciation	Pro-inflammatoire
	IL-4	Interleukine-4	Lymphocyte Th2	Lymphocyte B	Synthèse d' IgG et IgE	Anti-inflammatoire
	IL-5	Interleukine-5	Lymphocyte Th2	Lymphocyte B	Synthèse d' IgA	Anti-inflammatoire
	IL-6	Interleukine-6	Macrophages, cellules dendritiques et endothéliales	Macrophages, cellules dendritiques	Attraction, activation	Pro-inflammatoire
	IL-10	Interleukine-10	Lymphocyte Th2	Lymphocyte Th1, macrophages	Inhibition des Th1 et de la réponse inflammatoire	Anti-inflammatoire
	IL-12	Interleukine-12	Macrophages, cellules dendritiques	Cellules NK	Différenciation	Pro-inflammatoire
	IL-13	Interleukine-13	Lymphocyte Th2	lymphocytes B	Stimule croissance et différenciation	Anti-inflammatoire
				Lymphocyte Th1, macrophages	Inhibition	
	TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$	Lymphocyte Th1, macrophages, cellules NK	Macrophages	Activation	Pro-inflammatoire
	IFN- $\beta$	Interferon- $\beta$	TLR-3 des cellules immunitaires	cellules NK, macrophages	Activation	Pro-inflammatoire
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$	Lymphocyte Th1	macrophages	activation	Pro-inflammatoire	
Chimiokines	IL-8	Interleukine-8	Macrophages, fibroblastes, kératinocytes	Neutrophiles, Lymphocyte T	Attraction et activation	Pro-inflammatoire
	CXCL10	C-X-C motif chemokine 10	monocytes, endothélium, fibroblastes, kératinocytes, lymphocytes T	monocytes, cellules NK, lymphocyte T	Attraction	Pro-inflammatoire
	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	Lymphocyte T, endothélium	basophiles, lymphocytes T	Attraction	Pro-inflammatoire

Annexe 2 : Tableau récapitulatif des souches de LRV1 et 2

<b>Espèce de <i>Leishmania</i></b>	<b>Nom souche LRV</b>	<b>Lieu de provenance</b>	<b>Référence</b>
<i>L. guyanensis</i>	WHI/BR/78/M5313/Lg17	Brésil	Calderon-Copete et al., 2012 – non publié
<i>L. guyanensis</i>	Lg1398	Brésil	(Zangger et al. 2013)
<i>L. guyanensis</i>	LgM5313	Brésil	(Zangger et al. 2013)
<i>L. aethiopica</i>	MHOM/ET/2011/LDS327	Ethiopie	(Zangger et al. 2013)
<i>L. aethiopica</i>	MHOM/ET/2011/LDS303	Ethiopie	(Zangger et al. 2013)
<i>L. major</i>	LRV2/IR/2014/HM-1	Iran	Hajjaran et al., 2014 – non publié
<i>L. major</i>	LRV2/IR/2014/HM-2	Iran	Hajjaran et al., 2014 – non publié
<i>L. aethiopica</i>	LRV2-Lae-L494	Ethiopie	(Zangger et al. 2014)
<i>L. amazonensis</i>	Brazil/2012/14	Brésil	(Cantanhêde et al. 2015)
<i>L. lainsoni</i>	Brazil/2013/248	Brésil	(Cantanhêde et al. 2015)
<i>L. guyanensis</i>	Brazil/2013/309	Brésil	(Cantanhêde et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	Brazil/2013/308	Brésil	(Cantanhêde et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	Brazil/2013/304	Brésil	(Cantanhêde et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	Brazil/2013/303	Brésil	(Cantanhêde et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	Brazil/2013/299	Brésil	(Cantanhêde et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	Brazil/2013/291	Brésil	(Cantanhêde et al. 2015)
<i>L. guyanensis</i>	Brazil/2013/271	Brésil	(Cantanhêde et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	Brazil/2013/268	Brésil	(Cantanhêde et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/BO/94/CUM65	Bolivie	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/BO/94/CUM68	Bolivie	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/BO/94/CUM41	Bolivie	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/BO/94/CUM24	Bolivie	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/02/PER010	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/01/PER012	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/91/LC1586	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/91/LC2176	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/03/PER186	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/03/PER212	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/03/PER207	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/02/PER096	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/01/PER014	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/91/LC2318	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/91/LC2321	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/94/LC2284	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/91/LC2041	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/91/LC1569	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/91/LC1578	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/91/LC1568	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/91/LC2043	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/01/PER002	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/02/PER011	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/02/PER065	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/02/PER067	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/02/PER069	Pérou	(Aduai et al. 2015)

<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/03/PER130	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/03/PER201	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/02/PER016	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/03/PER231	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/91/LC2319	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/PE/90/LH825	Pérou	(Aduai et al. 2015)
<i>L. guyanensis</i>	Lg601047	Brésil	Silva et Neto, 2016 – non publié
<i>L. guyanensis</i>	Lg60691	Brésil	Silva et Neto, 2016 – non publié
<i>L. braziliensis</i>	LRV1-LbrLEM3874	Bolivie	(Brettmann et al. 2016)
<i>L. braziliensis</i>	LRV1-LbrLEM2780	Bolivie	(Brettmann et al. 2016)
<i>L. braziliensis</i>	LRV1-LbrLEM2700	Bolivie	(Brettmann et al. 2016)
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/BO/2011/2169	Bolivie	(Parmentier et al. 2016)
<i>L. guyanensis</i>	LgYZ58	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	LgYR07	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	LgYE48	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	LgXK73	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	LgXJ93-1	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	LgXJ93-2	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	LgWF69-1	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	LgWF69-2	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	LgvW21	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	LgVL91	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	LgPD46	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	LgMJ25	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	LgMC71	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	LgLL28	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	LgLF98	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	Lg2028-1	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	Lg2028-2	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	Lg2028-3	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	Lg2015	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	Lg2008	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	Lg2014	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. braziliensis</i>	LbrYA70	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	LgLF94	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	Lg2001	Guyane Française	(Tirera et al. 2017)
<i>L. guyanensis</i>	Lg3542	Brésil	(Cantanhêde et al. 2018)
<i>L. guyanensis</i>	Lg3503	Brésil	(Cantanhêde et al. 2018)
<i>L. shawi</i>	Ls1545	Brésil	(Cantanhêde et al. 2018)
<i>L. guyanensis</i>	Lg3486	Brésil	(Cantanhêde et al. 2018)
<i>L. guyanensis</i>	Lg3461	Brésil	(Cantanhêde et al. 2018)
<i>L. guyanensis</i>	Lg3460	Brésil	(Cantanhêde et al. 2018)
<i>L. braziliensis</i>	Lb308	Brésil	(Cantanhêde et al. 2018)
<i>L. braziliensis</i>	Lb299	Brésil	(Cantanhêde et al. 2018)
<i>L. braziliensis</i>	Lb386	Brésil	(Cantanhêde et al. 2018)
<i>L. braziliensis</i>	Lb275	Brésil	(Cantanhêde et al. 2018)
<i>L. guyanensis</i>	Lg3354	Brésil	(Cantanhêde et al. 2018)
<i>L. guyanensis</i>	Lg271	Brésil	(Cantanhêde et al. 2018)

<i>L. braziliensis</i>	Lb393	Brésil	(Cantanhêde et al. 2018)
<i>L. major</i>	LRV2/CBU17/TR/Lm03	Turquie	Nalcaci et al., 2018 – non publié
<i>L. major</i>	LRV2/CBU18/TR/Lm02	Turquie	Nalcaci et al., 2018 – non publié
<i>L. major</i>	LRV2/CBU33/TR/Lm01	Turquie	Nalcaci et al., 2018 – non publié
<i>L. tropica</i>	LRV2/EP97/TR/Lt07	Turquie	Nalcaci et al., 2018 – non publié
<i>L. tropica</i>	LRV2/EP94/TR/Lt06	Turquie	Nalcaci et al., 2018 – non publié
<i>L. tropica</i>	LRV2/EP92/TR/Lt05	Turquie	Nalcaci et al., 2018 – non publié
<i>L. tropica</i>	LRV2/EP87/TR/Lt04	Turquie	Nalcaci et al., 2018 – non publié
<i>L. tropica</i>	LRV2/EP48/TR/Lt03	Turquie	Nalcaci et al., 2018 – non publié
<i>L. tropica</i>	LRV2/EP20/TR/Lt02	Turquie	Nalcaci et al., 2018 – non publié
<i>L. tropica</i>	LRV2/EP01/TR/Lt01	Turquie	Nalcaci et al., 2018 – non publié
<i>L. major</i>	LRV2-LmjManisa	Turquie	(Kurt et al. 2019)
<i>L. major</i>	Lmj-Uzb1	Uzbekistan	Kleschenko et al., 2019 – non publié
<i>L. major</i>	Lmj-Uzb2	Uzbekistan	Kleschenko et al., 2019 – non publié
<i>L. major</i>	MHOM/IR/18/LRV2-170	Iran	Hajjaran et al., 2019 – non publié
<i>L. major</i>	MHOM/IR/19/LRV2-10	Iran	Hajjaran et al., 2019 – non publié
<i>L. braziliensis</i>	LbM333	Colombie	Parra-Munoz et al., 2019 – non publié
<i>nc</i>	LpM312	Colombie	Parra-Munoz et al., 2019 – non publié
<i>L. braziliensis</i>	LbB44	Colombie	Parra-Munoz et al., 2019 – non publié
<i>L. braziliensis</i>	LbB11	Colombie	Parra-Munoz et al., 2019 – non publié
<i>L. braziliensis</i>	LbB9	Colombie	Parra-Munoz et al., 2019 – non publié
<i>L. braziliensis</i>	LbB8	Colombie	Parra-Munoz et al., 2019 – non publié

Annexe 3 : Synthèse sur la structure des différents virus de parasites

Virus	Famille	Capside	Génome	Transcription	Frameshift	ORF	Autre ORF/génome	Phénotype/effet chez les hôtes Prévalence	Voie RNAi	Transmission	Densité virale	Localisation	Année découverte
LRV	Totiviridae	Icosaédrique, nue : 32 nm	ARNdb non segmenté 5,2Kb	Absence coiffe / queue poly-A Présence IRES	LRV1 : 71 nt Décalage +1 LRV2 : Absent Sauf <i>L. aethiopica</i> : 46 nt décalage-1	ORF1 : régulation traduction ORF2 (gag) : 80kda (LRV1) 78kda (LRV2) ORF3 (pol) : 102 kda (LRV2) Gag-pol : 180 kda (LRV1)	ORFx (LRV1-4) : rôle non défini	Modèle murin : aggravation lésions, métastases, amplification réponse inflammatoire	Présent	verticale	500 à 610 000 copies/cellule	Cytoplasme	1988
ScV	Totiviridae	Icosaédrique, nue : 40 nm (Wickner et al. 2013; Luque et al. 2018)	ARNdb non segmenté 4,6Kb (L-A) (Wickner et al. 2013)	Absence coiffe/queue poly-A : (permet la capture coiffe via His154 protéines de fusion) (Fujimura & Esteban 2011; Wickner et al. 2013)	130nt Décalage -1 (permet la synthèse de 1 à 2% de protéines de fusion) (Icho & Wickner 1988; Wickner 1989; Dinman et al. 1991)	ORF1 : gag (76kDa) ORF2 : pol Protéine de fusion gag-pol : 180kDa, qui fait partie de la capsid (Wickner et al. 2013)	ARNdb satellite M (M1, M2, M28, M-lus : 1,5 à 2,3kb) dépendants du virus L-A (Schmitt & Breinig 2006; Rodríguez-Cousiño et al. 2017)	Phénotype killer : tue levures sensibles environnantes (toxines K1, K2, K28 et K-lus), mais protège les levures exprimant le phénotype killer (pas d'immunité croisée entre les protéines K) (Schmitt & Breinig 2006) Pas de risque relevé chez l'homme ou l'animal (US EPA 1997)	Absent (Drinnenberg et al. 2009)	Verticale (division cellulaire et sporogénèse) et horizontale (fusion cellulaire) (Schmitt & Breinig 2006)	10 000 à 20 000 particules/cellule (Wickner 1989)	Cytoplasme	1972 (Berry & Bevan 1972)
TVV	Totiviridae	Icosaédrique, nue : 32 nm (Benchimol et al. 2002a, 2002b)	ARNdb non segmenté 4,5 à 5,5Kb (TVV1 à TVV4) (Wang & Wang 1986; Liu et al. 1998; Bessarab et al. 2000; Goodman et al. 2011b, 2011a; Fraga et al. 2012a; Parent et al. 2013)		17nt Décalage : -2 (TVV1) -1 (TVV2, 3) (Wang & Wang 1986; Liu et al. 1998; Bessarab et al. 2000; Goodman et al. 2011b, 2011a; Fraga et al. 2012a; Parent et al. 2013)	ORF1 : gag (75kDa) ORF2 : pol Protéine de fusion gag-pol : 160kDa (Wang & Wang 1986; Liu et al. 1998; Bessarab et al. 2000; Goodman et al. 2011b, 2011a; Fraga et al. 2012a; Parent et al. 2013)	4 génotypes : TVV1 et 3 : 2 ORF potentiels codant protéines potentielles de 100 aa chacune TVV2 : ARN db satellite 500 pb non codant (empaqueté dans capsid de TVV) TVV2 : ORF 3 et 4 potentiels, codant protéines potentielles de 200aa (24-25kDa) (Bessarab et al. 2000)	Phénotype sensible de TV <i>in vitro</i> au métronidazole en présence de TVV (Wang & Wang 1985; Snipes et al. 2000; Fraga et al. 2005, 2007, 2011; Malla et al. 2011; Conrad et al. 2012; da Luz Becker et al. 2015; Graves et al. 2019) Surexpression de : - P270 (hypovirulence) (Khoshnan & Alderete 1994; Bessarab et al. 2011) -Protéinases cystéines (hypervirulence) (Provenzano et al. 1997) Amplification de la réponse inflammatoire (modèle humain <i>in vitro</i> ) (Fichorova et al. 2012) TVV1 et 2 : pourraient être liés à sévérité des symptômes génitaux (Wendel et al. 2002; Fraga et al. 2007, 2011, 2012b; El-Gayar et al. 2016; Jehhee et al. 2017) Prévalence : 18,7 à 100% de TVV dans les TV (Weber 2003; Fraga et al. 2012a; El-Gayar et al. 2016; Khanaliha et al. 2017; Rivera et al. 2017; Masha et al. 2017; Graves et al. 2019)		Verticale et horizontale (Benchimol et al. 2002b)	280-1380 particules/cellule (Benchimol et al. 2002b)	Cytoplasme (Benchimol et al. 2002b)	1985 (Wang & Wang 1985)

Virus	Famille	Capside	Génome	Transcription	Frameshift	ORF	Autre ORF/génome	Phénotype/effet chez les hôtes Prévalence	Voie RNAi	Transmission	Densité virale	Localisation	Année découverte
GLV	Totiviridae	Icosaédrique, nue : 33 nm (Tai et al. 1995)	ARNdb non segmenté 6,2Kb (Wang et al. 1993; Tai et al. 1995)	Absence coiffe / queue poly-A Prés. 5'UTR (DB, IRES) et 3'UTR (Yu et al. 1995; Garlapati et al. 2001)	220nt Décalage -1 (Li et al. 2001)	ORF1 : gag (100kDa) ORF2 : pol Protéine de fusion gag-pol : 190kDa (Wang et al. 1993; Tai et al. 1995)		Conduit à la mort du parasite si densité virale >5.10 <sup>5</sup> particules/cellule.  Pas de corrélation avec résistance <i>in vitro</i> , ni avec présence de symptômes chez l'hôte mis en évidence (De Jonckheere & Gordts 1987)  Prévalence : 0 à 100% de GLV dans GL (De Jonckheere & Gordts 1987)		Verticale et horizontale (GLV sensibles) (Tai et al. 1991)	<5.10 <sup>5</sup> particules virales/cellule 100 à 10 000 copies/cellule en phase exponentielle (Miller et al. 1988; Furfine & Wang 1990; Tai et al. 1991, 1993; Sepp et al. 1994; Garlapati et al. 2011)	Cytoplasme (Tai et al. 1991)	1986 (Wang & Wang 1986)
CSpV-1	Partitiviridae	Icosaédrique, nue : 31nm (Khramtsov et al. 1997; Khramtsov & Upton 1998, 2000)	ARNdb bisegmenté : -L (large) 1,7kb -S (small) 1,3 kb (Khramtsov et al. 1997; Khramtsov & Upton 1998, 2000)	Absence coiffe/ queue poly-A (Khramtsov et al. 1997)		Génome L : ORF gag Génome S : ORF pol (Khramtsov et al. 1997; Khramtsov & Upton 1998, 2000)		Possible rôle dans fécondité et donc dans propagation du virus. Pas de lien avec la présence de symptômes (Jenkins et al. 2008; Sharma et al. 2016)		Verticale et horizontale possible (Jenkins et al. 2015)	500 particules/cellule (Kniel et al. 2004)		1995 (Gallimore et al. 1995)
Virus <i>Entamoeba histolytica</i>	Rhabdoviridae	Icosaédrique nue : 70nm Filamenteuse : 150/50nm (Hruska et al. 1974; Fine 1974; Mattern et al. 1977; Olivier et al. 1984)	ADN (Hruska et al. 1974)					Induit lyse de l'enveloppe nucléaire et de la membrane plasmique du parasite en culture axénique, mais la présence du virus n'augmente pas le taux de lyse cellulaire du parasite (Mattern et al. 1972)  Pas de lien mis en évidence avec la pathologie humaine (Olivier et al. 1984)				Cytoplasme (icos.) Noyau (filamenteux) (Hruska et al. 1974; Fine 1974; Mattern et al. 1977; Olivier et al. 1984)	1959 (Deutsch & Zaman 1959; Miller & Schwartz 1960)
Virus de <i>Trypanosoma cruzi</i>	Totiviridae (Flaviviridae ?)	VLP nues 32 nm : Totiviridae VLP enveloppées 48nm : Flaviviridae (Fernández-Presas et al. 2017)										Cytoplasme (Fernández-Presas et al. 2017)	2017 (Fernández-Presas et al. 2017)

Virus	Famille	Capside	Génome	Transcription	Frameshift	ORF	Autre ORF/génome	Phénotype/effet chez les hôtes Prévalence	Voie RNAi	Transmission	Densité virale	Localisation	Année découverte
Virus de <i>Plasmodium</i>	Narnavirus (et autre ?)	- VLP nues hexagonale 42 nm - VLP enveloppées 52 nm (Terzakis et al. 1976) - Virus dépourvus de capside (MaRNAV-1) (Charon et al. 2019)	2 segments ARN sb(+)(Charon et al. 2019)			RdRp 3Kb (Charon et al. 2019)							1976 (Terzakis et al. 1976; Lenstra et al. 1988)  2019

db : double brin, IRES : Internal Ribosome Entry Site, nt : nucléotide, ORF : Open Reading Frame, TV : *Trichomonas vaginalis*, TVV : *Trichomonas vaginalis virus*, DB : Downstream Box, UTR : Untranslated Region, GLV : *Giardia lamblia virus*, RdRp : RNA dependant RNA polymerase

Annexe 4 : Présentation synthétique de quelques virus de parasites

Famille	Parasite			virus			Hôte du parasite		Reproduction parasite		Référence (virus)
	Genre	Espèce	libre/mon- /di-xène	Famille	espèce	caractéristiques	1	2	intra-/extra- cellulaire	type cellulaire ou localisation	
Trypanosomatidés	<i>Leishmania</i>	<i>Leishmania spp.</i>	dixène	Totiviridae	<i>Leishmania RNA virus (LRV)</i>	ARN db 1 segment (Capside, RdRp) capside icosaédrique (32 nm) nue	Phlébotome Hématophagie	Mammifères, reptiles	extracellulaire (vecteur) intracellulaire (animaux/hommes)	intestin (vecteur) macrophage (animaux/hommes)	*
		<i>L. martiniquensis</i>		Bunyaviridae	<i>Leishbunyavirus (LBV) LmarLBV1</i>	ARN sb (-) 3 segments (L : RdRp, M : glycoprotéine, S : capside) capside hélicoïdale (90-100nm) enveloppé	Phlébotome Hématophagie	Mammifères, reptiles	extracellulaire (vecteur) intracellulaire (animaux/hommes)	intestin (vecteur) macrophage (animaux/hommes)	(Grybchuk et al. 2020)
Saccharomycetaceae	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>	libre	Totiviridae	<i>Saccharomyces cerevisiae virus (ScV)</i>	ARN db 1 segment (Capside, RdRp) + ARN satellite db capside icosaédrique (40 nm) nue	-		extracellulaire	-	*
Trichomonadidae	<i>Trichomonas</i>	<i>T. vaginalis</i>	monoxène	Totiviridae	<i>Trichomonas vaginalis virus (TVV)</i>	ARN db 1 segment (Capside, RdRp) capside icosaédrique (32 nm) nue	Homme		extracellulaire	Tractus vaginal	*
Giardiidae	<i>Giardia</i>	<i>G. lamblia</i>	monoxène	Totiviridae	<i>Giardia lamblia virus (GLV)</i>	ARN db 1 segment (Capside, RdRp) capside icosaédrique (33 nm) nue	Homme, animaux (chien)		extracellulaire	Surface des entérocytes	*



Trypanosomatidés	<i>Trypanosoma</i>	<i>Trypanosoma spp.</i> <i>Trypanosoma cruzi</i>	dixène	Bunyaviridae Totiviridae/Flaviviridae?	<i>Leishbunyavirus (LBV)</i> <i>Trypanosma cruzi Virus</i>	ARN sb (-) 3 segments (L, M, S)) capside hélicoïdale (90-100nm) enveloppée  VLP icosaédriques nues (32nm)/VLP enveloppées (48nm)	Insecte (Punaise, autre)	Mammifères, reptiles	sang	(Grybchuk et al. 2018a, 2020)  (Fernández-Presas et al. 2017)	
Cryptosporidiidae	<i>Cryptosporidium</i>	<i>C. parvum</i>	monoxène	Partitiviridae	<i>Cryptosporidium parvum virus (CspV1)</i>	ARN db 2 segments (Capside, RdRp) capside icosaédrique (40 nm) nue	Homme		intracellulaire	cellule intestinale  *	
Plasmodiidae	<i>Plasmodium</i>	<i>P. vivax</i>	dixène	Narnaviridae	<i>Matryoshka RNA virus 1 (MaRNV-1)</i>		Homme	Moustique	Intracellulaire chez l'homme Extracellulaire chez le moustique	Hépatocytes érythrocytes Tractus digestif	(Charon et al. 2019)
Leucocytozoidae	<i>Leucocytozoon</i>	<i>Leucocytozoon spp.</i>	dixène	Narnaviridae	<i>Matryoshka RNA virus 2 (MaRNV-2)</i>	ARN 2 segments (RdRp+ 1 segment non identifié)	Oiseaux	Mouche noire (hématophage)	Intracellulaire chez l'oiseau Extracellulaire chez la mouche	Hépatocytes érythrocytes Tractus digestif	
Endamoebidae	<i>Entamoeba</i>	<i>E. histolytica</i>	monoxène	Rhabdoviridae	<i>Entamoeba histolytica virus</i>	ADN Icosaédrique nue 70 nm + filamenteux 150x50nm	Homme, animaux (chien)		extracellulaire	tractus digestif	*

Trypanosomatidés	<i>Leptomonas</i>	<i>L. moramango</i>	monoxène	Bunyaviridae	<i>Leishbunyavirus (LBV) LepmorLBV1a, LepmorLBV1b</i>	ARN sb (-) 3 segments (L, M, S)) capside hélicoïdale (90-100nm) enveloppée	Insecte**		extracellulaire	intestin	(Akopyants et al. 2016a; Grybchuk et al. 2018a)
	<i>Leptomonas</i>	<i>L. seymouri</i>	monoxène	Narnaviridae (virus de champignons)	<i>Narna-like virus (NLV) LepseyNLV1</i>	ARN sb (+) 1 segment (RdRp) Absence de capsid e et d'enveloppe	Insecte**		extracellulaire	intestin	(Grybchuk et al. 2018a)
	<i>Leptomonas</i>	<i>L. pyrrocoris</i>	monoxène	Tombuviridae (virus de plantes)	<i>Tombus-like virus (TLV) LeppyrTLV1</i>	ARN 2 segments	Insecte**		extracellulaire	intestin	Grybchuk et al., 2018b)
				Ostravirus	<i>Ostravirus (OV) LeppyrOV1</i>	ARN 6 segments	Insecte**		extracellulaire	intestin	Grybchuk et al., 2018b)
	<i>Crithidia</i>	<i>Crithidia spp.</i>	monoxène	Bunyaviridae	<i>Leishbunyavirus (LBV)CC4LBV1, CG15LBV1, CZMLBV1, CabsLBV1, CotoLBV1, CpraLBV1</i>	ARN 3 segments	Insecte**		extracellulaire	intestin	Grybchuk et al., 2018b)
Trypanosomatidés	<i>Bleptomonas</i>	<i>B. luni</i> <i>B. maslovi</i> <i>B. ayalai</i> <i>B. juanalfonzi</i> <i>B. wendygibsoni</i>	monoxène	Bunyaviridae	<i>Leishbunyavirus (LBV) BlunLBV1, BmasLBV1, BayaLBV1</i>	ARN sb (-) 3 segments (L, M, S) capsid e hélicoïdale enveloppée	Insecte (puce) Coprophagie	nd	nd	nd	Grybchuk et al., 2018b)
				Narnaviridae	<i>Narna-like virus (NLV) BmasNV1, BwenNV1</i>	ARN sb (+) 1 segment (RdRp) Absence de capsid e et d'enveloppe					

			Totiviridae	<i>Leishmania RNA virus (LRV)</i> <i>BjuaLRV4</i> , <b><i>BmasLRV3</i></b> , <i>BwenLRV3</i>	ARN db 1 segment (Capside, RdRp) capside icosaédrique (32 nm) nue					
<i>Phytomonas</i>	<i>P. serpens</i>	dixène	Narnaviridae	<i>Narna-virus like (NV)</i> <i>PserNV1</i>	ARN sb (+) 1 segment (RdRp) Absence de capside et d'enveloppe	Insecte phytophage	Plantes (maïs, manioc, tomates...)	intra- et extra- cellulaire	Plante	(Akopyants et al. 2016b)
	<i>Phytomonas spp.</i>		Bunyaviridae	<i>Leishbunyavirus (LBV)</i>	ARN sb (-) 3 segments (L, M, S) capside hélicoïdale enveloppée			Extracellulaire	Vecteur	(Grybchuk et al. 2020)
<i>Strigomonas</i>	<i>Strigomonas spp.</i>	monoxène	Bunyaviridae	<i>Leishbunyavirus (LBV)</i>	ARN sb (-) 3 segments (L, M, S) capside hélicoïdale enveloppée	Insecte**		extracellulaire	intestin	(Grybchuk et al. 2020)
<i>Herpetomonas</i>	<i>Herpetomonas spp.</i>	monoxène	Bunyaviridae	<i>Leishbunyavirus (LBV)</i>	ARN sb (-) 3 segments (L, M, S) capside hélicoïdale enveloppée	Insecte**		extracellulaire	intestin	(Grybchuk et al. 2020)

\* voir annexe 3

\*\*coprophagie ou nécrophagie

## BIBLIOGRAPHIE

---

Abeles, S. R., et D. T. Pride. 2014. Molecular bases and role of viruses in the human Microbiome. *Journal of Molecular Biology* 426(23):3892–3906.

Abtahi, M., G. Eslami, S. Cavallero, M. Vakili, S. S. Hosseini, S. Ahmadian, M. J. Boozhmehrani, et A. Khamesipour. 2020. Relationship of *Leishmania* RNA Virus (LRV) and treatment failure in clinical isolates of *Leishmania major*. *BMC Research Notes* 13(1):126.

Adams, M. J., E. J. Lefkowitz, A. M. Q. King, et E. B. Carstens. 2014. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2014). *Archives of Virology* 159(10):2831–2841.

Adaui, V., L.-F. Lye, N. S. Akopyants, M. Zimic, A. Llanos-Cuentas, L. Garcia, I. Maes, S. De Doncker, D. E. Dobson, J. Arevalo, J.-C. Dujardin, et S. M. Beverley. 2015. Association of the endobiont double-stranded RNA Virus LRV1 with treatment failure for human leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Peru and Bolivia. *Journal of Infectious Diseases*. 213(1):112–121.

Agrela, I. F., et M. D. Feliciangeli. 2015. Effect of *Leishmania* spp infection on the survival, life expectancy, fecundity and fertility of *Lutzomyia longipalpis* s.l. and *Lutzomyia pseudolongipalpis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 110(5):611–617.

Akhoundi, M., K. Kuhls, A. Cannet, J. Votýpka, P. Marty, P. Delaunay, et D. Sereno. 2016. A Historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 10(3):e0004349.

Akopyants, N. S., N. Kimblin, N. Secundino, R. Patrick, N. Peters, P. Lawyer, D. E. Dobson, S. M. Beverley, et D. L. Sacks. 2009. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*. 324(5924):265–268.

Akopyants, N. S., L.-F. Lye, D. E. Dobson, J. Lukeš, et S. M. Beverley. 2016a. A novel *Bunyavirus-Like Virus* of Trypanosomatid protist parasites. *Genome Announcements*. 4(4):e00715-16, /ga/4/4/e00715-16.atom.

Akopyants, N. S., L.-F. Lye, D. E. Dobson, J. Lukeš, et S. M. Beverley. 2016b. A *Narnavirus* in the Trypanosomatid protist plant pathogen *Phytomonas serpens*. *Genome Announcements*. 4(4):e00711-16, /ga/4/4/e00711-16.atom.

Alemayehu, B., et M. Alemayehu. 2017. Leishmaniasis: a review on parasite, vector and reservoir host. *Health Science Journal*. 11(4):519.

Alrajhi, A. A., E. A. Ibrahim, E. B. De Vol, M. Khairat, R. M. Faris, et J. H. Maguire. 2002. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *New England Journal of Medicine*. 346(12):891–895.

- Armstrong, T. C. 1993. Successful transient introduction of *Leishmania* RNA virus into a virally infected and an uninfected strain of *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90(5):1736-40.
- Aronson, N., B. L. Herwaldt, M. Libman, R. Pearson, R. Lopez-Velez, P. Weina, E. M. Carvalho, M. Ephros, S. Jeronimo, and A. Magill. 2016. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clinical Infectious Diseases* 63(12):1539–1557.
- Ashford, R. W. 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in dermatology*. 14(5):523–532.
- Atayde, V. D., H. Shi, J. B. Franklin, N. Carriero, T. Notton, L.-F. Lye, K. Owens, S. M. Beverley, C. Tschudi, et E. Ullu. 2013. The structure and repertoire of small interfering RNAs in *Leishmania (Viannia) braziliensis* reveal diversification in the trypanosomatid RNAi pathway: Divergent RNAi pathways in the trypanosomatid lineage. *Molecular Microbiology*. 87(3):580–593.
- Atayde, V. D., H. Aslan, S. Townsend, K. Hassani, S. Kamhawi, et M. Olivier. 2015. Exosome secretion by the parasitic protozoan *Leishmania* within the sand fly midgut. *Cell Reports*. 13(5):957–967.
- Atayde, V. D., A. da Silva Lira Filho, V. Chaparro, A. Zimmermann, C. Martel, M. Jaramillo, et M. Olivier. 2019. Exploitation of the *Leishmania* exosomal pathway by *Leishmania* RNA virus 1. *Nature Microbiology*. 4(4):714-723.
- Azizi, H., K. Hassani, Y. Taslimi, H. S. Najafabadi, B. Papadopoulou, et S. Rafati. 2009. Searching for virulence factors in the non-pathogenic parasite to humans *Leishmania tarentolae*. *Parasitology*. 136(7):723–735.
- Bandea, C. 2009. The origin and evolution of viruses as molecular organisms. *Nature Precedings*. 4.
- Bañuls, A.-L., M. Hide, et F. Prugnolle. 2007. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*. 64:1-109.
- Bañuls, A. L., P. Bastien, C. Pomares, J. Arevalo, R. Fisa, and M. Hide. 2011. Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. *Clinical Microbiology and Infection* 17(10):1451–1461.
- Bastien, P., C. Blaineau, et M. Pages. 1992. *Leishmania*: sex, lies and karyotype. *Parasitology Today*. 8(5):174–177.
- Bastien P., L. Lachaud. 2016. Leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique. EMC – Maladies infectieuses 2016 ;1-12 [Article 8-506-A-10]

- Bates, P. A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*. 37(10):1097–1106.
- Bates, P. A. 2018. Revising *Leishmania's* life cycle. *Nature Microbiology*. 3(5):529–530.
- Belkaid, Y., S. Mendez, R. Lira, N. Kadambi, G. Milon, et D. Sacks. 2000. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *The Journal of Immunology*. 165(2):969–977.
- Benchimol, M., T.-H. Chang, et J. F. Alderete. 2002a. *Trichomonas vaginalis*: observation of coexistence of multiple viruses in the same isolate. *FEMS Microbiology Letters*. 215(2):197–201.
- Benchimol, M., T.-H. Chang, et J. F. Alderete. 2002b. Visualization of new virus-like-particles in *Trichomonas vaginalis*. *Tissue and Cell*. 34(6):406–415.
- Berry, E. A., et E. A. Bevan. 1972. A new species of double-stranded RNA from yeast. *Nature*. 239(5370):279–280.
- Bessarab, I. N., H.-W. Liu, C.-F. Ip, et J.-H. Tai. 2000. The Complete cDNA Sequence of a Type II *Trichomonas vaginalis* Virus. *Virology*. 267(2):350–359.
- Bessarab, I. N., R. Nakajima, H.-W. Liu, et J.-H. Tai. 2011. Identification and characterization of a type III *Trichomonas vaginalis* virus in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Archives of Virology*. 156(2):285–294.
- Besteiro, S., R. A. M. Williams, G. H. Coombs, et J. C. Mottram. 2007. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*. 37(10):1063–1075.
- Bifeld, E., et J. Clos. 2015. The genetics of *Leishmania* virulence. *Medical Microbiology and Immunology*. 204(6):619–634.
- Blaineau C., P. Bastien, M. Pagès. 1992. Multiple forms of chromosome I, II and V in a restricted population of *Leishmania infantum* contrasting with monomorphism in individual strains suggest haploidy or automixy. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 50(2):197-204.
- Blais, J., V. Garneau, et S. Chamberland. 1993. Inhibition of *Toxoplasma gondii* protein synthesis by azithromycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 37(8):1701–1703.
- Blanc, A., J. C. Ribas, R. B. Wickner, et N. Sonenberg. 1994. His-154 is involved in the linkage of the *Saccharomyces cerevisiae* L-A double-stranded RNA virus Gag protein to the cap structure of mRNAs and is essential for M1 satellite virus expression. *Molecular and Cellular Biology*. 14(4):2664–2674.
- Blum, J., P. Buffet, L. Visser, G. Harms, M. S. Bailey, E. Caumes, J. Clerinx, P. P. A. M. van Thiel, G. Morizot, C. Hatz, T. P. C. Dorlo, and D. N. J. Lockwood. 2014. leishman recommendations for treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis in travelers, 2014. *Journal of Travel Medicine* 21(2):116–129.

- Bourreau, E., M. Ginouves, G. Prévot, M.-A. Hartley, J.-P. Gangneux, F. Robert-Gangneux, J. Dufour, D. Sainte-Marie, A. Bertolotti, F. Pratlong, R. Martin, F. Schütz, P. Couppié, N. Fasel, et C. Ronet. 2016. Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 in *Leishmania guyanensis* increases the risk of first-line treatment failure and symptomatic relapse. *Journal of Infectious Diseases*. 213(1):105–111.
- Bourreau, E., H. Pascalis, G. Prevot, A. Kariminia, N. Jolly, G. Milon, P. Buffet, R. Michel, J.-B. Meynard, J.-P. Boutin, D. Aschimoff, et P. Launois. 2003. Increased production of interferon-gamma by *Leishmania* homologue of the mammalian receptor for activated c kinase-reactive CD4+ T cells among human blood mononuclear cells: an early marker of exposure to *Leishmania*? *Scandinavian Journal of Immunology*. 58(2):201–210.
- Brettmann, E. A., J. S. Shaik, H. Zangger, L.-F. Lye, F. M. Kuhlmann, N. S. Akopyants, D. M. Oswald, K. L. Owens, S. M. Hickerson, C. Ronet, N. Fasel, et S. M. Beverley. 2016. Tilting the balance between RNA interference and replication eradicates *Leishmania* RNA virus 1 and mitigates the inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 113(43):11998–12005.
- Britto, C., C. Ravel, P. Bastien, C. Blaineau, M. Pagès, J.-P. Dedet, and P. Wincker. 1998. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene* 222(1):107–117.
- Buffet, P. A., É. Rosenthal, J.-P. Gangneux, E. Lightburne, P. Couppié, G. Morizot, L. Lachaud, P. Marty, and J.-P. Dedet. 2011. Traitement des leishmanioses en France : proposition d'un référentiel consensuel. *La Presse Médicale* 40(2):173–184.
- Camera, P. de O., J. Junger, F. do E. S. S. Pires, M. Mattos, M. P. Oliveira-Neto, O. Fernandes, and C. Pirmez. 2006. Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100(12):1112–1117.
- Callahan, H. L., I. F. Portal, S. J. Bensinger, et M. Grogl. 1996. *Leishmania* spp.: temperature sensitivity of promastigotes *in vitro* as a model for tropism *in vivo*. *Experimental Parasitology*. 84(3):400–409.
- Cantanhêde, L. M., F. G. Fernandes, G. E. M. Ferreira, R. Porrozzi, R. de G. M. Ferreira, et E. Cupolillo. 2018. New insights into the genetic diversity of *Leishmania* RNA Virus 1 and its species-specific relationship with *Leishmania* parasites. *PLOS ONE*. 13(6):e0198727.
- Cantanhêde, L. M., C. F. da Silva Júnior, M. M. Ito, K. P. Felipin, R. Nicolete, J. M. V. Salcedo, R. Porrozzi, E. Cupolillo, et R. de G. M. Ferreira. 2015. Further evidence of an association between the presence of *Leishmania* RNA virus 1 and the mucosal manifestations in tegumentary leishmaniasis patients. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 9(9):e0004079.

- Carrion, R., Y.-T. Ro, et J. L. Patterson. 2003. Purification, identification, and biochemical characterization of a host-encoded cysteine protease that cleaves a *Leishmaniovirus* Gag-Pol polyprotein. *Journal of Virology*. 77(19):10448–10455.
- de Carvalho, R. V. H., D. S. Lima-Junior, M. V. G. da Silva, M. Dilucca, T. S. Rodrigues, C. V. Horta, A. L. N. Silva, P. F. da Silva, F. G. Frantz, L. B. Lorenzon, M. M. Souza, F. Almeida, L. M. Cantanhêde, R. de G. M. Ferreira, A. K. Cruz, and D. S. Zamboni. 2019. *Leishmania* RNA virus exacerbates Leishmaniasis by subverting innate immunity via TLR3-mediated NLRP3 inflammasome inhibition. *Nature Communications* 10(1):5273.
- Castón, J. R., B. L. Trus, F. P. Booy, R. B. Wickner, J. S. Wall, et A. C. Steven. 1997. Structure of LA virus: a specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. *The Journal of cell biology*. 138(5):975–985.
- Charon, J., M. J. Grigg, J.-S. Eden, K. A. Piera, H. Rana, T. William, K. Rose, M. P. Davenport, N. M. Anstey, et E. C. Holmes. 2019. Novel RNA viruses associated with *Plasmodium vivax* in human malaria and *Leucocytozoon* parasites in avian disease. *PLOS Pathogens*. 15(12):e1008216.
- Christen, J.-R., E. Bourreau, M. Demar, E. Lightburn, P. Couppié, M. Ginouvès, G. Prévot, J.-P. Gangneux, H. Savini, F. de Laval, V. Pommier de Santi, et S. Briolant. 2018. Use of the intramuscular route to administer pentamidine isethionate in *Leishmania guyanensis* cutaneous leishmaniasis increases the risk of treatment failure. *Travel Medicine and Infectious Disease*. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 24:31-36.
- Chrusciak-Talhari, A., R. Dietze, C. Chrusciak Talhari, R. M. da Silva, E. P. Gadelha Yamashita, G. de Oliveira Penna, P. R. Lima Machado, et S. Talhari. 2011. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 84(2):255–260.
- Chung, I. K., T. C. Armstrong, S. M. Scheffter, J. H. Lee, Y. M. Kim, et J. L. Patterson. 1998. Generation of the short RNA transcript in *Leishmaniovirus* correlates with the growth of its parasite host, *Leishmania*. *Molecules and cells*. 8(1):54–61.
- Collazos, J., J. Mayo, E. Martinez, et F. Diaz. 1995. Unusual liver toxicity due to the new antifungal agents fluconazole and itraconazole. *International Hepatology Communications*. 3(2):112–115.
- Conrad, M. D., A. W. Gorman, J. A. Schillinger, P. L. Fiori, R. Arroyo, N. Malla, M. L. Dubey, J. Gonzalez, S. Blank, W. E. Secor, et J. M. Carlton. 2012. Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 6(3):e1573.
- Coughlan, S., A. S. Taylor, E. Feane, M. Sanders, G. Schonian, J. A. Cotton, et T. Downing. 2018. *Leishmania naiffi* and *Leishmania guyanensis* reference genomes highlight genome structure and gene evolution in the *Viannia* subgenus. *Royal Society Open Science*. 5(4):172212.



- Couppié, P., E. Clyti, D. Sainte-Marie, J. P. Dedet, B. Carme, et R. Pradinaud. 2004. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a patient with 425 lesions. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 71(5):558–560.
- Coutinho, S. G., C. Pirmez, and A. M. Da-Cruz. 2002. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96:S173–S178.
- Cruz, A. K., R. Titus, et S. M. Beverley. 1993. Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90(4):1599–1603.
- Darmon, A., N. Leduc, S. Delaigue, M. Ginouves, J. Bonini, J. Dufour, G. Prevot, D. Sainte-Marie, S. Labbé, R. Boukari, M. Nacher, M. Demar, et P. Couppié. 2016. Leishmaniose cutanée multilésionnelle en Guyane Française: étude comparative. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. 143(12):S341.
- Das, B. K. 2011. Azithromycin induced hepatocellular toxicity and hepatic encephalopathy in asymptomatic dilated cardiomyopathy. *Indian Journal of Pharmacology*. 43(6):736–737.
- De Jonckheere, J. F., et B. Gordts. 1987. Occurrence and transfection of a *Giardia virus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 23(1):85–89.
- Dedet, J. P., R. Pradinaud, et F. Gay. 1989. Epidemiological aspects of human cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 83(5):616–620.
- Dedet, J.-P. 1990. Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: A Review. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 43(1):25–28.
- Deutsch, K., et V. Zaman. 1959. An electron microscopic study of *Entamoeba invadens* rodhain 1934. *Experimental Cell Research*. 17(2):310-9
- Dinman, J. D., T. Icho, et R. B. Wickner. 1991. A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88(1):174–178.
- Drinnenberg, I. A., D. E. Weinberg, K. T. Xie, J. P. Mower, K. H. Wolfe, G. R. Fink, et D. P. Bartel. 2009. RNAi in Budding Yeast. *Science*. 326(5952):544–550.
- Drugbank Amphotericin B. (n.d.). Amphotericin B - DrugBank. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00681>. Consulté le 21/07/17
- Drugbank Azithromycin. (n.d.). Azithromycin - DrugBank. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00207>. Consulté le 21/07/17
- Drugbank Fluconazole. (n.d.). Fluconazole - DrugBank. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00196>. Consulté le 21/07/17

Drugbank Miltefosine. (n.d.). Miltefosine - DrugBank.  
<https://www.drugbank.ca/drugs/DB09031>. Consulté le 21/07/17

Drugbank Paromomycin. (n.d.). Paromomycin - DrugBank.  
<https://www.drugbank.ca/drugs/DB01421>. Consulté le 21/07/17

Drugbank Pentamidine. (n.d.). Pentamidine - DrugBank.  
<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00738>. Consulté le 21/07/17

Dubie, T., and Y. Mohammed. 2020. Review on the role of host immune response in protection and immunopathogenesis during cutaneous leishmaniasis infection. *Journal of Immunology Research* 2020:1–12.

Dumas, C., C. Chow, M. Muller, et B. Papadopoulou. 2006. A Novel class of developmentally regulated noncoding RNAs in *Leishmania*. *Eukaryotic Cell*. 5(12):2033–2046.

El-Gayar, E. K., A. B. Mokhtar, et W. A. Hassan. 2016. Molecular characterization of double-stranded RNA virus in *Trichomonas vaginalis* Egyptian isolates and its association with pathogenicity. *Parasitology Research*. 115(10):4027–4036.

El-On, J., S. Halevy, M. H. Grunwald, et L. Weinrauch. 1992. Topical treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*: A double-blind control study. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 27(2):227–231.

Emad, M., F. Hayati, M. K. Fallahzadeh, et M. R. Namazi. 2011. Superior efficacy of oral fluconazole 400 mg daily versus oral fluconazole 200 mg daily in the treatment of cutaneous *Leishmania major* infection: A randomized clinical trial. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 64(3):606–608.

Faghihi, G., et R. Tavakoli-kia. 2003. Treatment of cutaneous leishmaniasis with either topical paromomycin or intralesional meglumine antimoniate. *Clinical and Experimental Dermatology*. 28(1):13–16.

Fernandez, M. M., E. L. Malchiodi, et I. D. Algranati. 2011. Differential Effects of Paromomycin on Ribosomes of *Leishmania mexicana* and Mammalian Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55(1):86–93.

Fernández-Presas, A. M., L. Padilla-Noriega, Ingeborg-Becker, L. Robert, J. A. Jiménez, S. Solano, J. Delgado, P. Tato, et J. L. Molinari. 2017. Enveloped and non-enveloped viral-like particles in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 59:e46.

Fichorova, R. N., Y. Lee, H. S. Yamamoto, Y. Takagi, G. R. Hayes, R. P. Goodman, X. Chepa-Lotrea, O. R. Buck, R. Murray, T. Kula, D. H. Beach, B. N. Singh, et M. L. Nibert. 2012. Endobiont Viruses Sensed by the Human Host – Beyond Conventional Antiparasitic Therapy. *PLoS ONE*. 7(11):e48418.

Figuroa, R. A., L. E. Lozano, I. C. Romero, M. T. Cardona, M. Prager, R. Pacheco, Y. R. Diaz, J. A. Tellez, et N. G. Saravia. 2009. Detection of *Leishmania* in unaffected mucosal

- tissues of patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)* species. *The Journal of Infectious Diseases*. 200(4):638–646.
- Fine, P. E. M. 1974. *In vitro* maintenance of *Parahistomonas sp.* *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 68(1):2–3.
- Fraga, J., L. Rojas, I. Sariago, et A. Fernández-Calienes. 2005. Double-stranded RNA viral infection in Cuban *Trichomonas vaginalis* isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 9(6):521–524.
- Fraga, J., L. Rojas, I. Sariago, A. Fernández-Calienes, et A. Núñez. 2007. Double-Stranded RNA Viral Infection of *Trichomonas vaginalis* and Association with Clinical Presentation. *Archives of Virology*. 157(9):1789-95
- Fraga, J., L. Rojas, I. Sariago, et A. Fernández-Calienes. 2011. Double-stranded RNA viral infection of *Trichomonas vaginalis* and correlation with genetic polymorphism of isolates. *Experimental Parasitology*. 127(2):593–599.
- Fraga, J., L. Rojas, I. Sariago, et A. Fernández-Calienes. 2012a. Genetic characterization of three Cuban *Trichomonas vaginalis virus*. Phylogeny of Totiviridae family. *Infection, Genetics and Evolution*. 12(1):113–120.
- Fraga, J., L. Rojas, I. Sariago, A. Fernández-Calienes, et F. A. Nuñez. 2012b. Species typing of Cuban *Trichomonas vaginalis virus* by RT-PCR, and association of TVV-2 with high parasite adhesion levels and high pathogenicity in patients. *Archives of Virology*. 157(9):1789–1795.
- Francesconi, V. A., F. Francesconi, R. Ramasawmy, G. A. S. Romero, et M. das G. C. Alecrim. 2018. Failure of fluconazole in treating cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania guyanensis* in the Brazilian Amazon: An open, nonrandomized phase 2 trial. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 12(2):e0006225.
- Fujimura, T., et R. Esteban. 2011. Cap-snatching mechanism in yeast L-A double-stranded RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(43):17667–17671.
- Fujimura, T., R. Esteban, L. M. Esteban, et R. B. Wickner. 1990. Portable Encapsidation Signal of the L-A Double-Stranded RNA Virus of *S. cetwisiae*. *Cell*. 62(4):819-28.
- Furfine, E. S., et C. C. Wang. 1990. Transfection of the *Giardia lamblia* double-stranded RNA virus into *Giardia lamblia* by electroporation of a single-stranded RNA copy of the viral genome. *Molecular and Cellular Biology*. 10(7):3659–3662.
- Gabriel, Á., A. Valério-Bolas, J. Palma-Marques, P. Mourata-Gonçalves, P. Ruas, T. Dias-Guerreiro, et G. Santos-Gomes. 2019. Cutaneous Leishmaniasis: the complexity of host's effective immune response against a polymorphic parasitic disease. *Journal of Immunology Research*. 1;2019:2603730.
- Gallimore, C. I., J. Green, D. P. Casemore, et D. W. G. Brown. 1995. Detection of a picobirnavirus associated with *Cryptosporidium* positive stools from humans. *Archives of Virology*. 140(7):1275–1278.

- Garlapati, S., J. Chou, et C. C. Wang. 2001. Specific secondary structures in the capsid-coding region of *Giardiavirus* transcript are required for its translation in *Giardia lamblia* 1 Edited by D. E. Draper. *Journal of Molecular Biology*. 308(4):623–638.
- Garlapati, S., A. A. Saraiya, et C. C. Wang. 2011. A La autoantigen homologue is required for the Internal Ribosome Entry Site mediated translation of *Giardiavirus*. *PLoS ONE*. 6(3):e18263.
- Gathany, J. (n.d.). Phlebotomine sand flies - Factsheet for experts. <https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/phlebotomine-sand-flies>. Consulté le 29/07/20
- Ghabrial, S. A. 1998. Origin, Adaptation and Evolutionary Pathways of Fungal Viruses. *Virus Genes*. 16(1):119-31.
- Ghorbani, M., and R. Farhodi. 2017. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Design, Development and Therapy* Volume 12:25–40.
- Gilbert, J. A., et J. D. Neufeld. 2014. Life in a World without Microbes. *PLoS Biology*. 12(12):e1002020.
- Gimblet, C., J. S. Meisel, M. A. Loesche, S. D. Cole, J. Horwinski, F. O. Novais, A. M. Mistic, C. W. Bradley, D. P. Beiting, S. C. Rankin, L. P. Carvalho, E. M. Carvalho, P. Scott, et E. A. Grice. 2017. Cutaneous leishmaniasis induces a transmissible dysbiotic skin microbiota that promotes skin inflammation. *Cell Host & Microbe*. 22(1):13-24.e4.
- Ginouvés, M., P. Couppié, S. Simon, E. Bourreau, S. Rogier, P. Brousse, P. Travers, V. P. de Santi, M. Demar, S. Briolant, et G. Prévot. 2020. *Leishmaniavirus* genetic diversity is not related to leishmaniasis treatment failure. *Clinical Microbiology and Infection*. S1198743X20302652.
- Ginouvés, M., S. Simon, E. Bourreau, V. Lacoste, C. Ronet, P. Couppié, M. Nacher, M. Demar, et G. Prévot. 2016. Prevalence and Distribution of *Leishmania* RNA Virus 1 in *Leishmania* parasites from French Guiana. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 94(1):102–106.
- Giraud, E., O. Martin, L. Yakob, and M. Rogers. 2019. Quantifying *Leishmania* Metacyclic Promastigotes from Individual Sandfly Bites Reveals the Efficiency of Vector Transmission. *Communications Biology* 2(1):84
- Glennie, N. D., and P. Scott. 2016. Memory T cells in cutaneous leishmaniasis. *Cellular Immunology* 309:50–54.
- Goodman, R. P., S. A. Ghabrial, R. N. Fichorova, et M. L. Nibert. 2011a. *Trichomonasvirus*: a new genus of protozoan viruses in the family Totiviridae. *Archives of Virology*. 156(1):171–179.
- Goodman, R. P., T. S. Freret, T. Kula, A. M. Geller, M. W. T. Talkington, V. Tang-Fernandez, O. Suciú, A. A. Demidenko, S. A. Ghabrial, D. H. Beach, B. N. Singh, R. N. Fichorova, and M. L. Nibert. 2011b. Clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*

concurrently infected by strains of up to four *Trichomonasvirus* species (family Totiviridae). *Journal of Virology*. 85(9):4258–4270.

Gordon, J., N. Knowlton, D. A. Relman, F. Rohwer, et M. Youle. 2013. Superorganisms and Holobionts: Looking for a term for the functional entity formed by a macrobe and its associated symbiotic microbes and viruses? The term is “holobiont.” *Microbe Magazine*. 8(4):152–153.

Gossage, S. M., M. E. Rogers, et P. A. Bates. 2003. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International journal for parasitology*. 33(10):1027–1034.

Gramiccia, M., et L. Gradoni. 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*. 35(11–12):1169–1180.

Graves, K. J., A. P. Ghosh, N. Schmidt, P. Augostini, W. E. Secor, J. R. Schwebke, D. H. Martin, P. J. Kissinger, et C. A. Muzny. 2019. *Trichomonas vaginalis Virus* among women with trichomoniasis and associations with demographics, clinical outcomes, and metronidazole resistance. *Clinical Infectious Diseases*. 69(12):2170-2176.

Grybchuk, D., N. S. Akopyants, A. Y. Kostygov, A. Konovalovas, L.-F. Lye, D. E. Dobson, H. Zangger, N. Fasel, A. Butenko, A. O. Frolov, J. Votýpka, C. M. d’Avila-Levy, P. Kulich, J. Moravcová, P. Plevka, I. B. Rogozin, S. Serva, J. Lukeš, S. M. Beverley, et V. Yurchenko. 2018a. Viral discovery and diversity in trypanosomatid protozoa with a focus on relatives of the human parasite *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 115(3):E506–E515.

Grybchuk, D., A. Y. Kostygov, D. H. Macedo, C. M. d’Avila-Levy, et V. Yurchenko. 2018b. RNA viruses in trypanosomatid parasites: a historical overview. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 113(4):e170487.

Grybchuk, D., A. Y. Kostygov, D. H. Macedo, J. Votýpka, J. Lukeš, et V. Yurchenko. 2018c. RNA viruses in *Blechnomonas* (Trypanosomatidae) and evolution of *Leishmaniavirus*. *mBio*. 9(5):e01932-18.

Grybchuk, D., D. H. Macedo, Y. Kleschenko, N. Kraeva, A. N. Lukashev, P. A. Bates, P. Kulich, T. Leštinová, P. Volf, A. Y. Kostygov, et V. Yurchenko. 2020. The first non-LRV RNA Virus in *Leishmania*. *Viruses*. 12(2):168.

Guilbride, L., P. J. Myler, et K. Stuart. 1992. Distribution and sequence divergence of LRV1 viruses among different *Leishmania* species. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 54(1):101–104.

Guo, L., X. Yang, W. Wu, G. Tan, S. Fang, S. Zhang, et F. Li. 2016. Identification and molecular characterization of *Panax notoginseng virus A*, which may represent an undescribed novel species of the genus *Totivirus*, family Totiviridae. *Archives of Virology*. 161(3):731–734.

- Hajjarian, H., M. Mahdi, M. Mohebbali, K. Samimi-Rad, A. Ataei-Pirkooh, E. Kazemi-Rad, S. R. Naddaf, et R. Raoofian. 2016. Detection and molecular identification of *Leishmania* RNA virus (LRV) in Iranian *Leishmania* species. *Archives of Virology*. 161(12):3385–3390.
- Hartley M-A., E. Bourreau, M. Rossi, P. Castiglioni, R. O. Eren, F. Prevel, P. Couppié, S-M. Hickerson, P. Launois, S. M. Beverley, C. Ronet, N. Fasel. 2016. *Leishmaniavirus*-dependent metastatic leishmaniasis is prevented by blocking IL-17A. *PLoS Pathogens*. 22;12(9):e1005852.
- Hartley, M.-A., S. Drexler, C. Ronet, S. M. Beverley, et N. Fasel. 2014. The immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic leishmaniasis. *Trends in Parasitology*. 30(8):412–422.
- Hartley, M.-A., K. Kohl, C. Ronet, et N. Fasel. 2013. The therapeutic potential of immune cross-talk in leishmaniasis. *Clinical Microbiology and Infection*. 19(2):119–130.
- Hartley, M.-A., C. Ronet, H. Zangger, S. M. Beverley, et N. Fasel. 2012. *Leishmania* RNA virus: when the host pays the toll. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2:99.
- Hay, R. J. 1994. Liposomal amphotericin B, AmBisome. *Journal of Infection*. 28:35–43.
- Holmes, E. C. 2011. What Does Virus Evolution Tell Us about Virus Origins? *Journal of Virology*. 85(11):5247–5251.
- Hruska, J. F., C. F. T. Mattern, L. S. Diamond, et D. B. Keister. 1974. Viruses of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Virology*. 11(1):129-36.
- Iantorno, S. A., C. Durrant, A. Khan, M. J. Sanders, S. M. Beverley, W. C. Warren, M. Berriman, D. L. Sacks, J. A. Cotton, et M. E. Grigg. 2017. Gene Expression in *Leishmania* Is Regulated Predominantly by Gene Dosage. *mBio*. 8(5):e01393-17.
- Icho, T., et R. Wickner. 1988. The Double-strandedRNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. *The Journal of Biological Chemistry*. 264(12):8.
- Ikeogu, N. M., G. N. Akaluka, C. A. Edechi, E. S. Salako, C. Onyilagha, A. F. Barazandeh, and J. E. Uzonna. 2020. *Leishmania* immunity: advancing immunotherapy and vaccine development. *microorganisms* 8(8):1201.
- Inbar, E., N. S. Akopyants, M. Charmoy, A. Romano, P. Lawyer, D.-E. A. Elnaiem, F. Kauffmann, M. Barhoumi, M. Grigg, K. Owens, M. Fay, D. E. Dobson, J. Shaik, S. M. Beverley, and D. Sacks. 2013. The mating competence of geographically diverse *Leishmania major* strains in their natural and unnatural sand fly vectors. *PLoS Genetics* 9(7):e1003672.
- Inbar, E., J. Shaik, S. A. Iantorno, A. Romano, C. O. Nzelu, K. Owens, M. J. Sanders, D. Dobson, J. A. Cotton, M. E. Grigg, S. M. Beverley, and D. Sacks. 2019. Whole genome sequencing of experimental hybrids supports meiosis-like sexual recombination in *Leishmania*. *PLOS Genetics* 15(5):e1008042.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2011. Totiviridae - dsRNA Viruses. [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/dsrna-viruses-2011/w/dsrna\\_viruses/192/totiviridae-figures](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsrna-viruses-2011/w/dsrna_viruses/192/totiviridae-figures). Consulté le 11/03/20

Isawa, H., R. Kuwata, K. Hoshino, Y. Tsuda, K. Sakai, S. Watanabe, M. Nishimura, T. Satho, M. Kataoka, N. Nagata, H. Hasegawa, H. Bando, K. Yano, T. Sasaki, M. Kobayashi, T. Mizutani, et K. Sawabe. 2011. Identification and molecular characterization of a new nonsegmented double-stranded RNA virus isolated from *Culex* mosquitoes in Japan. *Virus Research*. 155(1):147–155.

Ito, M. M., L. M. Catanhêde, T. H. Katsuragawa, C. F. da Silva Junior, L. M. A. Camargo, R. de G. Mattos, et J. M. Vilallobos-Salcedo. 2015. Correlation between presence of *Leishmania* RNA virus 1 and clinical characteristics of nasal mucosal leishmaniasis. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 81(5):533–540.

Ives, A., S. Masina, P. Castiglioni, F. Prével, M. Revaz-Breton, M.-A. Hartley, P. Launois, N. Fasel, et C. Ronet. 2014. MyD88 and TLR9 dependent immune responses mediate resistance to *Leishmania guyanensis* infections, irrespective of *Leishmania* RNA virus burden. *PLoS ONE*. 9(5):e96766.

Ives, A., C. Ronet, F. Prevel, G. Ruzzante, S. Fuertes-Marraco, F. Schutz, H. Zangger, M. Revaz-Breton, L.-F. Lye, S. M. Hickerson, S. M. Beverley, H. Acha-Orbea, P. Launois, N. Fasel, et S. Masina. 2011. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science*. 331(6018):775–778.

Jara, M., I. Maes, H. Imamura, M. A. Domagalska, J. Claude Dujardin, et J. Arevalo. 2019. Tracking of quiescence in *Leishmania* by quantifying the expression of GFP in the ribosomal DNA locus. *Scientific Report*. 9(1):18951

Jehee, I., C. van der Veer, M. Himschoot, M. Hermans, et S. Bruisten. 2017. Direct detection of *Trichomonas vaginalis virus* in *Trichomonas vaginalis* positive clinical samples from the Netherlands. *Journal of Virological Methods*. 250:1–5.

Jenkins, M. C., J. Higgins, J. E. Abrahante, K. E. Kniel, C. O'Brien, J. Trout, C. A. Lancto, M. S. Abrahamsen, et R. Fayer. 2008. Fecundity of *Cryptosporidium parvum* is correlated with intracellular levels of the viral symbiont CPV. *International Journal for Parasitology*. 38(8–9):1051–1055.

Jenkins, M. C., C. N. O'Brien, M. Santin, et R. Fayer. 2015. Changes in the levels of *Cryspovirus* during *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology Research*. 114(6):2063–2068.

Kamalisarvestani, E., M. Rasouli, H. Mortazavi, et B. Gharesifard. 2006. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Iranian patients. *Cytokine*. 35(3–4):159–165.

Kamhawi, S. 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*. 22(9):439–445.

- Kariyawasam, R., J. Grewal, R. Lau, A. Purcell, B. M. Valencia, A. Llanos-Cuentas, and A. K. Boggild. 2017. Influence of *Leishmania* RNA Virus 1 on proinflammatory biomarker expression in a human macrophage model of american tegumentary leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases* 216(7):877-886.
- Kariyawasam, R., A. Mukkala, R. Lau, B. Valencia, A. Llanos-Cuentas, and A. K. Boggild. 2018. Influence of *Leishmania* RNA Virus-1 (LRV-1) on virulence factor rna transcript expression of *Leishmania Viannia* spp. *International Journal of Infectious Diseases* 73:321.
- Kariyawasam, R., A. N. Mukkala, R. Lau, B. M. Valencia, A. Llanos-Cuentas, et A. K. Boggild. 2019. Virulence factor RNA transcript expression in the *Leishmania Viannia* subgenus: influence of species, isolate source, and *Leishmania RNA virus-1*. *Tropical Medicine and Health*. 47(1):25.
- Katara, G., A. Raj, R. Kumar, K. Avishek, H. Kaushal, N. Ansari, R. Bumb, and P. Salotra. 2013. Analysis of localized immune responses reveals presence of Th17 and Treg cells in cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. *BMC Immunology* 14(1):52.
- Kazemi, B. 2011. Genomic organization of *Leishmania* species. *Iranian journal of parasitology*. 6(3):1-18.
- Kerdel-Vegas, F. 1982. American Leishmaniasis. *International Journal of Dermatology*. 21(6):291–303.
- Khanaliha, K., H. Masoumi-Asl, F. Bokharaei-Salim, A. Tabatabaei, et M. Naghdalipoor. 2017. Double-stranded RNA viral infection of *Trichomonas vaginalis* (TVV1) in Iranian isolates. *Microbial Pathogenesis*. 109:56–60.
- Khoshnan, A., et J. F. Alderete. 1993. Multiple double-stranded RNA segments are associated with virus particles infecting *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Virology*. 67(12):6950-5.
- Khoshnan, A., et J. F. Alderete. 1994. *Trichomonas vaginalis* with a double-stranded RNA virus has upregulated levels of phenotypically variable immunogen mRNA. *Journal of Virology*. 68(6):4035-8.
- Khoshnan, A., D. Provenzano, et J. F. Alderete. 1994. Unique double-stranded RNAs associated with the *Trichomonas vaginalis* Virus are synthesized by viral RNA-Dependent RNA Polymerase. *Journal of Virology*. 68(11):7108-14.
- Khramtsov, N. V., P. A. Chung, C. C. Dykstra, J. K. Griffiths, U. M. Morgan, et S. J. Upton. 2000. Presence of double-stranded RNAs in human and calf isolates of *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of Parasitology*. 86(2):275-82
- Khramtsov, N. V., et S. J. Upton. 1998. High-temperature inducible cell-free transcription and replication of double-stranded RNAs within the parasitic protozoan *Cryptosporidium parvum*. *Virology*. 245(2):331–337.



- Khramtsov, N. V., et S. J. Upton. 2000. Association of RNA polymerase complexes of the parasitic protozoan *Cryptosporidium parvum* with virus-like particles: heterogeneous system. *Journal of Virology*. 74(13):5788–5795.
- Khramtsov, N. V., K. M. Woods, M. V. Nesterenko, C. C. Dykstra, et S. J. Upton. 1997. Virus-like, double-stranded RNAs in the parasitic protozoan *Cryptosporidium parvum*. *Molecular Microbiology*. 26(2):289–300.
- Killick-Kendrick, R. 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in dermatology*. 17(3):279–289.
- Killick-Kendrick, R., T. J. Wilkes, M. Bailly, I. Bailly, et L. A. Righton. 1986. Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 80(1):138–142.
- Kimblin, N., N. Peters, A. Debrabant, N. Secundino, J. Egen, P. Lawyer, M. P. Fay, S. Kamhawi, et D. Sacks. 2008. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(29):10125–10130.
- Kniel, K. E., J. A. Higgins, J. M. Trout, R. Fayer, et M. C. Jenkins. 2004. Characterization and potential use of a *Cryptosporidium parvum* virus (CPV) antigen for detecting *C. parvum* oocysts. *Journal of Microbiological Methods*. 58(2):189–195.
- Kostygov, A. Y., and V. Yurchenko. 2017. Revised classification of the subfamily *Leishmaniinae* (Trypanosomatidae). *Folia Parasitologica* 64.
- Koyama, S., C. Sakai, C. E. Thomas, T. Nunoura, et S. Urayama. 2016. A new member of the family Totiviridae associated with arboreal ants (*Camponotus nipponicus*). *Archives of Virology*. 161(7):2043–2045.
- Kraeva, N., A. Butenko, J. Hlaváčová, A. Kostygov, J. Myšková, D. Grybchuk, T. Leštinová, J. Votýpka, P. Volf, F. Opperdoes, P. Flegontov, J. Lukeš, et V. Yurchenko. 2015. *Leptomonas seymouri*: adaptations to the dixenous life cycle analyzed by genome sequencing, transcriptome profiling and co-infection with *Leishmania donovani*. *PLOS Pathogens*. 11(8):e1005127.
- Krolewiecki, A. J., H. D. Romero, S. P. Cajal, D. Abraham, T. Mimori, T. Matsumoto, M. Juarez, et N. J. Taranto. 2007. A randomized clinical trial comparing oral azithromycin and meglumine antimoniate for the treatment of American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 77(4):640–646.
- Kurt, Ö., N. Mansur, İ. Çavuş, O. Özcan, M. B. Batir, C. Gündüz, O. U. Sezerman, et A. Özbilgin. 2019. First report and in silico analysis of *Leishmania* virus (LRV2) identified in an autochthonous *Leishmania major* isolate in Turkey. *The New Microbiologica*. 42(1):64–67.

- Lachaud, L., N. Bourgeois, N. Kuk, C. Morelle, L. Crobu, G. Merlin, P. Bastien, M. Pagès, et Y. Sterkers. 2014. Constitutive mosaic aneuploidy is a unique genetic feature widespread in the *Leishmania* genus. *Microbes and Infection*. 16(1):61–66.
- Laforest-Lapointe, I., et M.-C. Arrieta. 2018. Microbial Eukaryotes: a missing link in gut microbiome studies. *mSystems*. 13;3(2):e00201-17.
- Lai A Fat, E. J. S. K., M. A. Vrede, R. M. Soetosenojo, et R. F. M. Lai A Fat. 2002. Pentamidine, the drug of choice for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Surinam: Pentamidine for cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Dermatology*. 41(11):796–800.
- Lainson, R., J. J. Shaw, F. T. Silveira, A. A. de Souza, R. R. Braga, et E. A. Ishikawa. 1994. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 89(3):435–443.
- Lanotte, G., et J. A. Rioux. 1990. Cell fusion in *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*. 310(7):285–288.
- Laskay, T., G. van Zandbergen, et 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.
- Lee, S. E., J. M. Suh, S. Scheffter, J. L. Patterson, et I. K. Chung. 1996. Identification of a ribosomal frameshift in *Leishmania* RNA virus 1-4. *Journal of Biochemistry*. 120(1):22–25.
- Lenstra, R., A. Samsó, B. Andrieu, J. Le Bras, et F. Galibert. 1988. Viruslike particles containing knob-associated histidine-rich protein are secreted into the culture medium of *Plasmodium falciparum* *in vitro* cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 151(2):749–757.
- Li, L., A. L. Wang, et C. C. Wang. 2001. Structural analysis of the -1 ribosomal frameshift elements in *Giardiavirus* mRNA. *Journal of Virology*. 75(22):10612-22.
- de Lima, J. G. S., D. G. Teixeira, T. T. Freitas, J. P. M. S. Lima, et D. C. F. Lanza. 2019. Evolutionary origin of 2A-like sequences in Totiviridae genomes. *Virus Research* 259:1–9.
- Liu, D., et J. E. Uzonna. 2012. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 12;2:8.
- Liu, H.-W., Y. D. Chu, et J.-H. Tai. 1998. Characterization of *Trichomonas vaginalis* virus proteins in the pathogenic protozoan *T. vaginalis*. *Archives of Virology*. 143(5):963–970.
- Loiseau, R., C. Nabet, S. Simon, M. Ginouves, P. Brousse, D. Blanchet, M. Demar, P. Couppie, et R. Blaizot. 2019. American cutaneous leishmaniasis in French Guiana: an

- epidemiological update and study of environmental risk factors. *International. Journal of Dermatology*. 58(11):1323–1328.
- Lopes, M. E. M., M. B. H. Carneiro, L. M. dos Santos, et L. Q. Vieira. 2016. Indigenous microbiota and Leishmaniasis. *Parasite Immunology*. 38(1):37–44.
- Louradour I., T. R. Ferreira, K. Ghosh, J. Shaik, D. Sacks. 2020. *In vitro* generation of *Leishmania* hybrids. *Cell Reports* 31(2): 719-721.
- Lovoll, M., J. Wiik-Nielsen, S. Grove, C. R. Wiik-Nielsen, A. B. Kristoffersen, R. Faller, T. Poppe, J. Jung, C. S. Pedamallu, A. J. Nederbragt, M. Meyerson, E. Rimstad, et T. Tengs. 2010. A novel *Totivirus* and *piscine reovirus* (PRV) in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with cardiomyopathy syndrome (CMS). *Virology Journal*. 7(1):309.
- Lozupone, C. A., J. I. Stombaugh, J. I. Gordon, J. K. Jansson, et R. Knight. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 489(7415):220–230.
- Luque, D., C. Mata, N. Suzuki, S. Ghabrial, et J. Castón. 2018. Capsid structure of dsRNA fungal viruses. *Viruses*. 10(9):481.
- da Luz Becker, D., O. dos Santos, A. P. Frasson, G. de Vargas Rigo, A. J. Macedo, et T. Tasca. 2015. High rates of double-stranded RNA viruses and *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* clinical isolates in South Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*. 34:181–187.
- Lye, L.-F., N. S. Akopyants, D. E. Dobson, et S. M. Beverley. 2016. A *Narnavirus* -like element from the Trypanosomatid protozoan parasite *Leptomonas seymouri*. *Genome Announcements*. 4(4):e00713-16.
- Lye, L.-F., K. Owens, H. Shi, S. M. F. Murta, A. C. Vieira, S. J. Turco, C. Tschudi, E. Ullu, et S. M. Beverley. 2010. Retention and loss of RNA interference pathways in Trypanosomatid protozoans. *PLoS Pathogens*. 6(10):e1001161.
- MacBeth, K. J., et J. L. Patterson. 1995. Single-site cleavage in the 5'-untranslated region of *Leishmaniovirus* RNA is mediated by the viral capsid protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92(19):8994–8998.
- Macedo, D. H., A. Menezes-Neto, J. M. Rugani, A. C. Rocha, S. O. Silva, M. N. Melo, L.-F. Lye, S. M. Beverley, C. M. Gontijo, et R. P. Soares. 2016. Low frequency of LRV1 in *Leishmania braziliensis* strains isolated from typical and atypical lesions in the State of Minas Gerais, Brazil. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 210(1–2):50–54.
- Machado, G. U., F. V. Prates, et P. R. L. Machado. 2019. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 94(1):9–16.
- Maga, J. A., G. Widmer, et J. H. LeBowitz. 1995. *Leishmania* RNA virus 1-mediated cap-independent translation. *Molecular and Cellular Biology*. 15(9):4884–4889.

- Malla, N., P. Kaul, R. Sehgal, et I. Gupta. 2011. The presence of dsRNA virus in *Trichomonas vaginalis* isolates from symptomatic and asymptomatic Indian women and its correlation with *in vitro* metronidazole sensitivity. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 29(2):152.
- Mandl, J. N., R. Ahmed, L. B. Barreiro, P. Daszak, J. H. Epstein, H. W. Virgin, et M. B. Feinberg. 2015. Reservoir host immune responses to emerging zoonotic viruses. *Cell*. 160(1–2):20–35.
- Mannaert, A., T. Downing, H. Imamura, et J.-C. Dujardin. 2012. Adaptive mechanisms in pathogens: universal aneuploidy in *Leishmania*. *Trends in Parasitology*. 28(9):370–376.
- Maretti-Mira, A. C., K. M. de Pinho Rodrigues, M. P. de Oliveira-Neto, C. Pirmez, and N. Craft. 2011. MMP-9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal leishmaniasis. *Acta Tropica* 119(2–3):160–164.
- Márquez, L. M., et M. J. Roossinck. 2012. Do persistent RNA viruses fit the trade-off hypothesis of virulence evolution? *Current Opinion in Virology*. 2(5):556–560.
- Martínez-Valencia, A. J., C. F. Daza-Rivera, M. Rosales-Chilama, A. Cossio, E. J. Casadiego Rincón, M. M. Desai, N. G. Saravia, and M. A. Gómez. 2017. Clinical and parasitological factors in parasite persistence after treatment and clinical cure of cutaneous leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11(7):e0005713.
- Maruyama, S. R., A. K. M. de Santana, N. T. Takamiya, T. Y. Takahashi, L. A. Rogerio, C. A. B. Oliveira, C. M. Milanezi, V. A. Trombela, A. K. Cruz, A. R. Jesus, A. S. Barreto, A. M. da Silva, R. P. Almeida, J. M. Ribeiro, et J. S. Silva. 2019. Non- *Leishmania* parasite in fatal visceral leishmaniasis-like disease, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 25(11):2088–2092.
- Masha, S. C., P. Cools, T. Crucitti, E. J. Sanders, et M. Vaneechoutte. 2017. Molecular typing of *Trichomonas vaginalis* isolates by actin gene sequence analysis and carriage of *T. vaginalis* viruses. *Parasites & Vectors*. 10(1):537.
- Mattern, C. F. T., L. S. Diamond, et W. A. Daniel. 1972. Viruses of *Entamoeba histolytica*. II. Morphogenesis of the Polyhedral Particle (ABRM2→41K-9)→HB-301 and the Filamentous Agent (ABRM)2→IHK-9. *Journal of Virology*. 9(2):342–58.
- Mattern, C. F. T., D. B. Keister, W. A. Daniel, L. S. Diamond, et A. D. Kontonis. 1977. Viruses of *Entamoeba histolytica*. VII. Novel Beaded Virus. *Journal of Virology*. 23(3):7.
- Maxfield, L., et J. S. Crane. 2020. Leishmaniasis. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls.
- McClelland, R. S., L. Sangaré, W. M. Hassan, L. Lavreys, K. Mandaliya, J. Kiarie, J. Ndinya-Achola, W. Jaoko, et J. M. Baeten. 2007. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *The Journal of Infectious Diseases*. 195(5):698–702.

- Medkour, H., B. Davoust, F. Dulieu, L. Maurizi, T. Lamour, J.-L. Marié, et O. Mediannikov. 2019. Potential animal reservoirs (dogs and bats) of human visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in French Guiana. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 13(6):e0007456.
- de Menezes, J. P. B., C. E. S. Guedes, A. L. de O. A. Petersen, D. B. M. Fraga, et P. S. T. Veras. 2015. Advances in development of new treatment for Leishmaniasis. *BioMed Research International*. 2015:815023.
- Miller, J., et J. Schwartzwelter. 1960. Virus-like particles in an *Entamoeba histolytica* trophozoite. *Bulletin of the World Health Organization*. 43(2):301.
- Miller, R. L., A. L. Wang, et C. C. Wang. 1988. Purification and characterization of the *Giardia lamblia* double-stranded RNA virus. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 28(3):189–195.
- Moafi, M., H. Rezvan, R. Sherkat, and R. Taleban. 2019. *Leishmania* vaccines entered in clinical trials: A review of literature. *International Journal of Preventive Medicine* 10(1):95.
- Moll, H. 1993. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunology Today* 14(8):383–387.
- Molyneux, D. H. 1974. Virus-like particles in *Leishmania* parasites. *Nature*. 249(5457):588–589.
- Mottram laboratory. 2008. Protocols for handling and working with leishmania species. Mottram laboratory.
- Nacher M., B. Carme, D. Sainte Marie, P. Couppié, E. Clyti, P. Guibert and R. Pradinaud. 2001. Influence of clinical presentation on the efficacy of a short course of pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 95:4, 331-336.
- Nibert, M. L., K. M. Woods, S. J. Upton, et S. A. Ghabrial. 2009. *Cryspovirus*: a new genus of protozoan viruses in the family Partitiviridae. *Archives of Virology*. 154(12):1959–1965.
- Nieves, E., et P. F. P. Pimenta. 2000. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*. 37(1):134–140.
- Ogg, M. M., R. Carrion Jr, A. C. D. C. Botelho, W. Mayrink, R. Correa-Oliveira, et J. L. Patterson. 2003. Quantification of *Leishmaniovirus* RNA in clinical samples and its possible role in pathogenesis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 69(3):309–313.
- Oliveira, R. A., R. V. Almeida, M. D. Dantas, F. N. Castro, J. P. M. Lima, et D. C. Lanza. 2014. In silico single strand melting curve: a new approach to identify nucleic acid polymorphisms in Totiviridae. *BMC Bioinformatics*. 15(1):243.

- Olivier, L. R., M. Lecatsas, T. F. H. G. Jackson, V. Gathiram, A. E. Simjee, et O. W. Prozesky. 1984. Viruses and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *The Lancet*. 324(8401):528.
- Olivier, M., and D. S. Zamboni. 2020. *Leishmania Viannia guyanensis*, LRV1 virus and extracellular vesicles: a dangerous trio influencing the faith of immune response during muco-cutaneous leishmaniasis. *Current Opinion in Immunology* 66:108–113.
- Osorio, Y., P. C. Melby, C. Pirmez, B. Chandrasekar, N. Guarin, and B. L. Travi. 2003. The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. *Parasite Immunology* 25(3):139–148.
- Ouellette, M., M. Olivier, S. Sato, et B. Papadopoulou. 2003. Le parasite *Leishmania* à l'ère de la post-génomique. *Médecine/Sciences*. 19(10):900–909.
- Pajot, F. X., F. Le Pont, B. Gentile, et R. Besnard. 1982. Epidemiology of leishmaniasis in French Guiana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 76(1):112–113.
- Pamer, E. G. 2007. Immune responses to commensal and environmental microbes. *Nature Immunology*. 8(11):1173–1178.
- Papadopoulou, B., X-F. Huang, N. Boucher, et F. McNicoll. 2003. Stage-specific regulation of gene expression in *Leishmania*. *ASM News-American Society for Microbiology*. 69(6):282–288.
- Parent, K. N., Y. Takagi, G. Cardone, N. H. Olson, M. Ericsson, M. Yang, Y. Lee, J. M. Asara, R. N. Fichorova, T. S. Baker, et M. L. Nibert. 2013. Structure of a protozoan virus from the human genitourinary parasite *Trichomonas vaginalis*. *mBio*. 4(2):e00056-13.
- Parmentier, L., A. Cusini, N. Müller, H. Zangger, M.-A. Hartley, C. Desponds, P. Castiglioni, P. Dubach, C. Ronet, S. M. Beverley, et N. Fasel. 2016. Severe cutaneous leishmaniasis in a Human Immunodeficiency Virus patient coinfecting with *Leishmania braziliensis* and its endosymbiotic virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 94(4):840–843.
- Partida-Rodríguez, O., A. Serrano-Vázquez, M. E. Nieves-Ramírez, P. Moran, L. Rojas, T. Portillo, E. González, E. Hernández, B. B. Finlay, et C. Ximenez. 2017. Human intestinal microbiota: interaction between parasites and the host immune response. *Archives of Medical Research*. 48(8):690–700.
- Patterson, J. L. 1993. The current status of *Leishmania* RNA virus I. *Parasitology Today*. 9(4):135–136.
- Patterson, J. L. 2017. Role of LRV1 and RNAi in the Pathogenesis of *Leishmania*. *Trends in Parasitology*. 33(2):76–78.
- 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. O. Tosi, B. Barrell, A. K. Cruz, J. C. Mottram, D. F. Smith, et M. Berriman. 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genetics*. 39(7):839–847.
- Pereira, L. de O. R., A. C. Maretta-Mira, K. M. Rodrigues, R. B. Lima, M. P. de Oliveira-Neto, E. Cupolillo, C. Pirmez, et M. P. de Oliveira. 2013. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with *Leishmania* RNA virus 1 infection in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 108(5):665–667.
- Petrin, D., K. Delgaty, R. Bhatt, et G. Garber. 1998. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(2):300–317.
- Pinto, M. C., D. H. Campbell-Lendrum, A. L. Lozovei, U. Teodoro, et C. R. Davies. 2001. Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Medical and Veterinary Entomology*. 15(2):132–139.
- Podaliri Vulpiani, M., L. Iannetti, D. Paganico, F. Iannino, and N. Ferri. 2011. Methods of control of the *Leishmania infantum* dog reservoir: state of the art. *Veterinary Medicine International* 2011:1–13.
- Ponte-Sucre, A., F. Gamarro, J.-C. Dujardin, M. P. Barrett, R. López-Vélez, R. García-Hernández, A. W. Pountain, R. Mwenechanya, and B. Papadopoulou. 2017. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11(12):e0006052.
- Prata, A., M. L. Silva-Vergara, L. Costa, A. Rocha, A. Krolewiecki, J. C. Silva, E. V. de Paula, F. G. Pimenta Junior, et L. E. R. Giraldo. 2003. Efficacy of azithromycin in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*. 36(1):65–69.
- Prevention, C.-C. for D. C. and. 2017, August 21. CDC - Leishmaniasis - Resources for Health Professionals. [https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health\\_professionals/index.html](https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html). Consulté le 05/12/17
- Provenzano, D., et J. F. Alderete. 1995. Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*. 63(9):3388-95.
- Provenzano, D., A. Khoshnan, et J. F. Alderete. 1997. Involvement of dsRNA virus in the protein composition and growth kinetics of host *Trichomonas vaginalis*. *Archives of Virology*. 142(5):939–952.
- Rafati, S., S. Couty-Jouve, M. H. Alimohammadian, et J. A. Louis. 1997. Biochemical analysis and immunogenicity of *Leishmania major* amastigote fractions in cutaneous leishmaniasis. *Clinical and experimental immunology*. 110(2):203.

- Ramalho-Ortigao, M., E. M. Saraiva, et Y. M. Traub-Csekö. 2010. Sand fly-*Leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy. *The open parasitology journal*. 4:195-204.
- Reithinger, R., J.-C. Dujardin, H. Louzir, C. Pirmez, B. Alexander, et S. Brooker. 2007. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*. 7(9):581–596.
- Ribeiro-Romão, R. P., O. C. Moreira, E. Y. Osorio, L. Cysne-Finkelstein, A. Gomes-Silva, J. G. Valverde, C. Pirmez, A. M. Da-Cruz, and E. F. Pinto. 2014. Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania (Viannia) braziliensis* concentrations. *Infection and Immunity* 82(12):5203–5213.
- Rivera, W. L., C. A. C. Justo, M. A. C. V. Relucio-San Diego, et L. M. Loyola. 2017. Detection and molecular characterization of double-stranded RNA viruses in Philippine *Trichomonas vaginalis* isolates. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 50(5):669–676.
- Ro, Y. T., E. J. Kim, H. I. Lee, M. Saiz, R. C. Jr, et J. L. Patterson. 2004. Evidence that the fully assembled capsid of *Leishmania* RNA virus 1-4 possesses catalytically active endoribonuclease activity. *Experimental & Molecular Medicine*. 36(2):145–156.
- Ro, Y. T., S. M. Scheffter and J. L. Patterson. 1997a. Hygromycin B resistance mediates elimination of *Leishmania* virus from persistently infected parasites. *Journal of Virology*. 71(12):8991-8
- Ro, Y. T., S. M. Scheffter, et J. L. Patterson. 1997b. Specific *in vitro* cleavage of a *Leishmania* virus capsid–RNA- dependent RNA polymerase polyprotein by a host cysteine-like protease. *Journal of Virology*. 71(12):8983-90.
- Ro, Y.-T., et J. L. Patterson. 2000. Identification of the minimal essential RNA sequences responsible for site-specific targeting of the *Leishmania* RNA Virus 1-4 capsid endoribonuclease. *Journal of Virology*. 74(1):130–138.
- Robinson, C. M., et J. K. Pfeiffer. 2014. Viruses and the microbiota. *Annual Review of Virology*. 1(1):55–69.
- Robinson, J. I., and S. M. Beverley. 2018. Concentration of 2'C-methyladenosine triphosphate by *Leishmania guyanensis* enables specific inhibition of *Leishmania* RNA virus 1 via its RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry* 293(17):6460–6469.
- Rodrigues, A. M., M. Hueb, T. A. R. R. dos Santos, and C. J. F. Fontes. 2006. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(2):139–145.
- Rodríguez-Cousiño, N., P. Gómez, et R. Esteban. 2017. Variation and distribution of L-A helper *Totiviruses* in *Saccharomyces sensu stricto* yeasts producing different killer toxins. *Toxins*. 9(10):313.
- Roger, A., M. Nacher, M. Hanf, A. S. Drogoul, A. Adonis, C. Basurko, J. Dufour, D. Sainte Marie, D. Blanchet, S. Simon, B. Carme, et P. Couppie. 2013. Climate and



- Leishmaniasis in French Guiana. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 89(3):564–569.
- Rogers, M. E. 2012. The Role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Frontiers in Microbiology* 3:223.
- Rogers, M. E., J. D. Hilley, N. J. Dickens, J. Wilkes, P. A. Bates, D. P. Depledge, D. Harris, Y. Her, P. Herzyk, H. Imamura, T. D. Otto, M. Sanders, K. Seeger, J.-C. Dujardin, M. Berriman, D. F. Smith, C. Hertz-Fowler, et J. C. Mottram. 2011. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Research*. 21(12):2129–2142.
- Rogers, M. E., T. Ilg, A. V. Nikolaev, M. A. J. Ferguson, et P. A. Bates. 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*. 430(6998):463–467.
- Ronet, C., S. M. Beverley, et N. Fasel. 2011. Muco-cutaneous leishmaniasis in the New World: The ultimate subversion. *Virulence*. 2(6):547–552.
- Roossinck, M. J. 2011. The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nature Reviews Microbiology*. 9(2):99–108.
- Roque, A. L. R., et A. M. Jansen. 2014. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 3(3):251–262.
- Rossi, M., P. Castiglioni, M.-A. Hartley, R. O. Eren, F. Prével, C. Desponds, D. T. Utzschneider, D. Zehn, M. G. Cusi, F. M. Kuhlmann, S. M. Beverley, C. Ronet, et N. Fasel. 2017. Type I interferons induced by endogenous or exogenous viral infections promote metastasis and relapse of leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 114(19):4987–4992.
- Rossi, M., and N. Fasel. 2018. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! *International Immunology* 30(3):103–111.
- Rotureau, B. 2006. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 74(1):81–96.
- Rougeron, V., T. De Meeûs, et A.-L. Bañuls. 2015. Response to Tibayrenc et al.: can recombination in *Leishmania* parasites be so rare? *Trends in Parasitology*. 31(7):280–281.
- Rougeron, V., T. De Meeûs, et A.-L. Bañuls. 2017. Reproduction in *Leishmania*: A focus on genetic exchange. *Infection, Genetics and Evolution*. 50:128–132.
- Rougeron, V., T. De Meeûs, M. Hide, E. Waleckx, H. Bermudez, J. Arevalo, A. Llanos-Cuentas, J.-C. Dujardin, S. De Doncker, et D. Le Ray. 2009. Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(25):10224–10229.

- Rougeron, V., T. De Meeûs, S. Kako Ouraga, M. Hide, et A.-L. Bañuls. 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 Pathogens*. 6(8):e1001004.
- Sabanadzovic, S., R. A. Valverde, J. K. Brown, R. R. Martin, et I. E. Tzanetakis. 2009. Southern *Tomato virus*: The link between the families Totiviridae and Partitiviridae. *Virus Research*. 140(1–2):130–137.
- Saha, P., D. Mukhopadhyay, et M. Chatterjee. 2011. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. *International Immunopharmacology*. 11(11):1668–1679.
- Saiz, M., A. Llanos-Cuentas, J. Echevarria, N. Roncal, M. Cruz, M. T. Muniz, C. Lucas, D. F. Wirth, S. Scheffter, A. J. Magill, et J. L. Patterson. 1998. Short report: detection of *Leishmaniovirus* in human biopsy samples of leishmaniasis from Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 58(2):192–194.
- Saiz, M., Y. T. Ro, D. F. Wirth, et J. L. Patterson. 1999. Host cell proteins bind specifically to the capsid-cleaved 5' end of *Leishmaniovirus* RNA. *Journal of Biochemistry*. 126(3):538–544.
- Sakthianandeswaren, A., S. J. Foote, et E. Handman. 2009. The role of host genetics in leishmaniasis. *Trends in Parasitology*. 25(8):383–391.
- Salinas, G., M. Zamora, K. Stuart, et N. Saravia. 1996. *Leishmania* RNA viruses in *Leishmania* of the *Viannia* subgenus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 54(4):425–429.
- Samarasinghe, S. R., N. Samaranayake, U. L. Kariyawasam, Y. D. Siriwardana, H. Imamura, et N. D. Karunaweera. 2018. Genomic insights into virulence mechanisms of *Leishmania donovani*: evidence from an atypical strain. *BMC Genomics*. 19(1):843.
- Sansonetti, P. J. 2011. To be or not to be a pathogen: that is the mucosally relevant question. *Mucosal Immunology*. 4(1):8–14.
- Sardinha, J. F. J., R. G. Tarlé, V. M. Fava, A. S. Francio, G. B. Ramos, L. C. de L. Ferreira, N. A. B. Schriefer, M. T. Mira, et S. Talhari. 2011. Genetic risk factors for human susceptibility to infections of relevance in dermatology. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 86(4):708–715.
- Scheffter, S. M., Y. T. Ro, I. K. Chung, et J. L. Patterson. 1995. The Complete Sequence of *Leishmania* RNA Virus LRV2-1, a Virus of an Old World Parasite Strain. *Virology*. 212(1):84–90.
- Scheffter, S., G. Widmer, et J. L. Patterson. 1994. Complete sequence of *Leishmania* RNA virus 1-4 and identification of conserved sequences. *Virology*. 199(2):479–483.
- Schlein, Y., R. L. Jacobson, et G. Messer. 1992. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89(20):9944–9948.

- Schmitt, M. J., et F. Breinig. 2006. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews Microbiology*. 4(3):212–221.
- Scott, P. 2003. Development and regulation of cell-mediated immunity in experimental Leishmaniasis. *Immunologic Research*. 27(2–3):489–498.
- Scott, P. 2011. Leishmania—a parasitized parasite. *The New England Journal of Medicine*. 364(18):1773–1774.
- Scott, P., and F. O. Novais. 2016. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology* 16(9):581–592.
- Sepp, T., A. L. Wang, et C. C. Wang. 1994. *Giardavirus*-resistant *Giardia lamblia* lacks a virus receptor on the cell membrane surface. *Journal of Virology*. 68(3):1426-31
- Sharma, P., S. Khurana, A. Sharma, R. Sehgal, et N. Malla. 2016. Presence of intracellular viruses in human *Cryptosporidium* isolates. *Annals of Parasitology*. 62(2):139–147.
- Sharma, U., et S. Singh. 2009. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian Journal of Experimental Biology*. 47(6):412-23.
- Shaw, J. J. 1988. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 83:486–490.
- Shen, H.-H. 2009. The challenge of discovering beneficial viruses. *Journal of Medical Microbiology*. 58(4):531–532.
- Simon, S., M. Nacher, B. Carme, C. Basurko, A. Roger, A. Adenis, M. Ginouves, M. Demar, et P. Couppie. 2017. Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: revising epidemiology with PCR-RFLP. *Tropical Medicine and Health*. 45:5.
- Simon, S., V. Veron, et B. Carme. 2010. *Leishmania* spp. identification by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis and its applications in French Guiana. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 66(2):175–180.
- Snipes, L. J., P. M. Gamard, E. M. Narcisi, C. B. Beard, T. Lehmann, et W. E. Secor. 2000. Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(8):3004-9
- Soto, J., B. A. Arana, J. Toledo, N. Rizzo, J. C. Vega, A. Diaz, M. Luz, P. Gutierrez, M. Arboleda, J. D. Berman, K. Junge, J. Engel, et H. Sindermann. 2004. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*. 38(9):1266–1272.
- Sousa, A. Q., M. S. Frutuoso, E. A. Moraes, R. D. Pearson, et M. M. L. Pompeu. 2011. High-dose oral fluconazole therapy effective for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Vianna) braziliensis*. *Clinical Infectious Diseases*. 53(7):693–695.
- Sousa-Franco, J., É. Araújo-Mendes, I. Silva-Jardim, J. L.-Santos, D. R. Faria, W. O. Dutra, and M. de F. Horta. 2006. Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible

- involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis. *Microbes and Infection* 8(2):390–400.
- Sterkers, Y., L. Crobu, L. Lachaud, M. Pagès, et P. Bastien. 2014. Parasexuality and mosaic aneuploidy in *Leishmania*: alternative genetics. *Trends in Parasitology*. 30(9):429–435.
- Sterkers, Y., L. Lachaud, N. Bourgeois, L. Crobu, P. Bastien, et M. Pagès. 2012. Novel insights into genome plasticity in eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*: mosaic aneuploidy in *Leishmania*. *Molecular Microbiology*. 86(1):15–23.
- Sterkers, Y., L. Lachaud, L. Crobu, P. Bastien, et M. Pagès. 2011. FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*: constitutive chromosomal mosaicism in *Leishmania*. *Cellular Microbiology*. 13(2):274–283.
- Steverding, D. 2017. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. 10(1):82.
- Stuart, K. D., R. Weeks, L. Guilbride, et P. J. Myler. 1992. Molecular organization of *Leishmania* RNA virus 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89(18):8596–8600.
- Sukla, S., S. Roy, S. Sundar, et S. Biswas. 2017. *Leptomonas seymouri* narna-like virus 1 and not *Leishmaniaviruses* detected in kala-azar samples from India. *Archives of Virology*. 162(12):3827–3835.
- Sundar, S., A. Singh, M. Rai, V. K. Prajapati, A. K. Singh, B. Ostyn, M. Boelaert, J.-C. Dujardin, and J. Chakravarty. 2012. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. *Clinical Infectious Diseases* 55(4):543–550.
- Suttle, C. A. 2007. Marine viruses — major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology*. 5(10):801–812.
- Tai, J. H., S. C. Chang, C. F. Ip, et S. J. Ong. 1995. Identification of a satellite double-stranded RNA in the parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis* infected with *T. vaginalis* virus T1. *Virology*. 208(1):189–196.
- Tai, J. H., H. M. Su, J. Tsai, M. F. Shaio, et C. C. Wang. 1993. The divergence of *Trichomonas vaginalis* virus RNAs among various isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Experimental Parasitology*. 76(3):278–286.
- Tai, J. H., A. L. Wang, S. J. Ong, K. S. Lai, C. Lo, et C. C. Wang. 1991. The course of *Giardiavirus* infection in the *Giardia lamblia* trophozoites. *Experimental Parasitology*. 73(4):413–423.
- Tarr, P. I., R. F. Aline, B. L. Smiley, J. Scholler, J. Keithly, et K. Stuart. 1988. LR1: a candidate RNA virus of *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 85(24):9572–9575.

- Teixeira, A. C., M. G. Paes, J. de O. Guerra, A. Prata, et M. L. Silva-Vergara. 2007. Low efficacy of azithromycin to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*. 49(4):235–238.
- Telleria, E. L., A. Martins-da-Silva, A. J. Tempone, et Y. M. Traub-Csekö. 2018. *Leishmania*, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology*. 145(10):1336–1353.
- Terzakis, J. A., J. P. Vanderberg, et M. M. Weiss. 1976. Viruslike particles in malaria parasites. *The Journal of Parasitology*. 62(3):366–371.
- Theodos, Cynthia. M., et R. Titus. 1993. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function *in vitro*. *Parasite immunology*. 15(8):481–487.
- Tibayrenc, M., et F. J. Ayala. 2013. How clonal are *Trypanosoma* and *Leishmania* ? *Trends in Parasitology*. 29:264–269.
- Tibayrenc, M., et F. J. Ayala. 2015. Response to Rougeron et al.: *Leishmania* population genetics: clonality, selfing and aneuploidy. *Trends in Parasitology*. 31(7):279–280.
- Tibayrenc, M., F. Kjellberg, et F. J. Ayala. 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87(7):2414–2418.
- Tirera, S., M. Ginouves, D. Donato, I. S. Caballero, C. Bouchier, A. Lavergne, E. Bourreau, E. Mosnier, V. Vantilcke, P. Couppié, G. Prevot, et V. Lacoste. 2017. Unraveling the genetic diversity and phylogeny of *Leishmania* RNA virus 1 strains of infected *Leishmania* isolates circulating in French Guiana. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 11(7):e0005764.
- Torres-Guerrero, E., M. R. Quintanilla-Cedillo, J. Ruiz-Esmenjaud, et R. Arenas. 2017. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*. 6:750.
- Tuon, F. F., V. Amato Neto, et V. Sabbaga Amato. 2008. *Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 54(2):158–166.
- Ubeda, J.-M., D. Légaré, F. Raymond, A. A. Ouameur, S. Boisvert, P. Rigault, J. Corbeil, M. J. Tremblay, M. Olivier, et B. Papadopoulou. 2008. Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. *Genome biology*. 9(7):R115.
- Unger A., S. O'Neal, P. R. Machado, L. H. Guimarães, D.J. Morgan, A. Schriefer, O. Bacellar, M. J. Glesby, E.M. Carvalho. 2009. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 80(4):574-9.
- US EPA. 1997. Attachment I--final risk assessment of *Saccharomyces cerevisiae*. United States Environmental Protection Agency.

- Valencia B., M. Jara, V. Adauí, M. Chantry, M. Alba, A. P. Ramos, J. Arevalo, A. Llanos-Cuentas, A. Boggild. 2014. Controversial role of leishmania RNA virus as a determinant of pathogenicity in human leishmaniasis. *International Journal of Infectious Diseases*. 21:165-166.
- Vance, R. E., R. R. Isberg, et D. A. Portnoy. 2009. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host & Microbe*. 6(1):10–21.
- Wanasen, N., and L. Soong. 2008. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunologic Research* 41(1):15–25.
- Wang, A. L., et C. C. Wang. 1985. A linear double-stranded RNA in *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 260(6):3697–3702.
- Wang, A. L., et C. C. Wang. 1986. The double-stranded RNA in *Trichomonas vaginalis* may originate from virus-like particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 83(20):7956–7960.
- Wang, A. L., H. M. Yang, K. A. Shen, et C. C. Wang. 1993. *Giardiovirus* double-stranded RNA genome encodes a capsid polypeptide and a gag-pol-like fusion protein by a translation frameshift. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90(18):8595–8599.
- Weber, B. 2003. Double stranded RNA virus in South African *Trichomonas vaginalis* isolates. *Journal of Clinical Pathology*. 56(7):542–543.
- Weeks, R., R. F. A. Jr, P. J. Myler, K. Stuart, et J. Virol. 1992a. LRV1 viral particles in *Leishmania guyanensis* contain double-stranded or single-stranded RNA. *Journal of Virology*. 66(3): 1389–1393.
- Weeks, R. S., J. L. Patterson, K. Stuart, et G. Widmer. 1992b. Transcribing and replicating particles in a double-stranded RNA virus from *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 52(2):207–213.
- Weill, F. X., J. P. Dedet, et M. S. Doutre. 2000. Leishmaniose cutanée due à *Leishmania (Leishmania) amazonensis* contractée en Guyane Française. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 30(1)47-49.
- Wendel, K. A., A. M. Rompalo, E. J. Erbeding, T. -H. Chang, et J. F. Alderete. 2002. Double-stranded RNA viral infection of *Trichomonas vaginalis* infecting patients attending a sexually transmitted diseases Clinic. *The Journal of Infectious Diseases*. 186(4):558–561.
- WHO. 2010. Control of the leishmaniasis, Geneva.
- WHO. 2018a. GHO\_VL\_2018.pdf.  
[https://www.who.int/leishmaniasis/burden/GHO\\_VL\\_2018.pdf?ua=1](https://www.who.int/leishmaniasis/burden/GHO_VL_2018.pdf?ua=1). Consulté le 13/03/20

WHO. 2018b. GHO\_CL\_2018.pdf.

[https://www.who.int/leishmaniasis/burden/GHO\\_CL\\_2018.pdf?ua=1](https://www.who.int/leishmaniasis/burden/GHO_CL_2018.pdf?ua=1). Consulté le 13/03/20

WHO Visceral leishmaniasis. (n.d.). WHO | Visceral leishmaniasis. [http://www.who.int/leishmaniasis/visceral\\_leishmaniasis/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/visceral_leishmaniasis/en/). Consulté le 13/03/20

Wickner, R. B. 1989. Yeast virology. *The FASEB Journal*. 3(11):2257–2265.

Wickner, R. B. 1996. Double-Stranded RNA Viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Review* 60(1):250-265.

Wickner, R. B., T. Fujimura, et R. Esteban. 2013. Viruses and prions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Virus Research*. 86:1-36.

Widmer, G., A. M. Comeau, D. B. Furlong, D. F. Wirth, et J. L. Patterson. 1989. Characterization of a RNA virus from the parasite *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86(15):5979–5982.

Widmer, G., et S. Dooley. 1995. Phylogenetic analysis of *Leishmania* RNA virus and *Leishmania* suggests ancient virus-parasite association. *Nucleic Acids Research*. 23(12):2300–2304.

Widmer, G., M. C. Keenan and J. L. Patterson. 1990. RNA polymerase activity is associated with viral particles isolated from *Leishmania braziliensis* subsp. *guyanensis*. *Journal of Virology*. 64(8):3712-5.

Widmer, G., et J. L. Patterson. 1991. Genomic Structure and RNA polymerase activity in *Leishmania* virus. *Journal of Virology*. 65(8):4211-5.

Wincker, P., C. Ravel, C. Blaineau, M. Pages, Y. Jauffret, J.-P. Dedet, and P. Bastien. 1996. The *Leishmania* Genome Comprises 36 Chromosomes Conserved Across Widely Divergent Human Pathogenic Species. *Nucleic Acids Research* 24(9):1688–1694.

Wortmann, G. W., N. E. Aronson, R. S. Miller, D. Blazes, and C. N. Oster. 2000. Cutaneous leishmaniasis following local trauma: a clinical pearl. *Clinical Infectious Diseases* 31(1):199–201.

Wu, B., X. Zhang, P. Gong, M. Li, H. Ding, C. Xin, N. Zhao, et J. Li. 2016. *Eimeria tenella*: a novel dsRNA virus in *E. tenella* and its complete genome sequence analysis. *Virus Genes* 52(2):244–252.

Xin, C., B. Wu, J. Li, P. Gong, J. Yang, H. Li, X. Cai, et X. Zhang. 2016. Complete genome sequence and evolution analysis of *Eimeria stiedai* RNA virus 1, a novel member of the family Totiviridae. *Archives of Virology*. 161(12):3571–3576.

Yang, X., Y. Zhang, X. Ge, J. Yuan, et Z. Shi. 2012. A novel *Totivirus-like virus* isolated from bat guano. *Archives of Virology*. 157(6):1093–1099.

Yu, D. C., A. L. Wang, C. H. Wu, et C. C. Wang. 1995. Virus-mediated expression of firefly luciferase in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *Molecular and Cellular Biology*. 15(9):4867–4872.

Zamora, M., L. Sacks, et K. Stuart. 1995. Intracellular localization of LRV1 in infected *Leishmania* cells and epitope conservation of the coat protein. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 42(5):580–582.

Zangger, H., A. Hailu, C. Desponds, L.-F. Lye, N. S. Akopyants, D. E. Dobson, C. Ronet, H. Ghalib, S. M. Beverley, et N. Fasel. 2014. *Leishmania aethiopica* field isolates bearing an endosymbiotic dsRNA virus induce pro-inflammatory cytokine response. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 8(4):e2836.

Zangger, H., C. Ronet, C. Desponds, F. M. Kuhlmann, J. Robinson, M.-A. Hartley, F. Prevel, P. Castiglioni, F. Pratlong, P. Bastien, N. Müller, L. Parmentier, N. G. Saravia, S. M. Beverley, et N. Fasel. 2013. Detection of *Leishmania* RNA virus in *Leishmania* parasites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 7(1):e2006.

Zhai, Y., H. Attoui, F. Mohd Jaafar, H. -q. Wang, Y. -x. Cao, S. -p. Fan, Y. -x. Sun, L. -d. Liu, P. P. C. Mertens, W. -s. Meng, D. Wang, et G. Liang. 2010. Isolation and full-length sequence analysis of *Armigeres subalbatus totivirus*, the first *Totivirus* isolate from mosquitoes representing a proposed novel genus (*Artivirus*) of the family Totiviridae. *Journal of General Virology*. 91(11):2836–2845.

Zhang, W. W., G. Ramasamy, L. I. McCall, A. Haydock, S. Ranasinghe, P. Abeygunasekara, G. Sirimanna, R. Wickremasinghe, P. Myler, et G. Matlashewski. 2014. Genetic analysis of *Leishmania donovani* tropism using a naturally attenuated cutaneous strain. *PLoS Pathogens*. 10(7):e1004244.

Zhang, W. W., et G. Matlashewski. 1997. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94(16):8807–8811.



## RESUME

---

Le *Leishmania RNA virus* (LRV), un virus à ARN double brin retrouvé chez certaines *Leishmania*, pourrait constituer un facteur d'aggravation des leishmanioses tégumentaires. En Guyane Française, ce virus est retrouvé dans plus de 80% des isolats de *L. guyanensis*, dont la plupart sont issus des communes de l'intérieur. La présence de ce virus dans les *Leishmania* ne semble pas influencer la sensibilité *in vitro* des parasites aux principaux antiparasitaires, mais pourrait augmenter de 27% le risque d'échec thérapeutique et de rechutes chez les patients traités à la pentamidine. L'analyse génétique des LRV, dont le but était d'identifier l'implication de clusters dans la maladie, a permis de déterminer six groupes, dont deux majoritaires. Toutefois, aucun de ces clusters ne semblait être associé aux échecs thérapeutiques primaires. Le LRV ne semble être impliqué que dans les réactivations de la maladie. Ainsi, l'étude d'un plus grand nombre de sujets présentant une réactivation de la maladie permettrait de confirmer l'implication du LRV dans ces rechutes et de déterminer si un génotype de LRV particulier serait impliqué.

Mots clés : *Leishmania guyanensis*, LRV, génotype, échec thérapeutique, pentamidine

## SUMMARY

---

*Leishmania RNA virus* (LRV), a double-stranded RNA virus found in some *Leishmania*, could be a factor of tegumentary leishmaniasis aggravation. In French Guiana, this virus is found in more than 80% of *L. guyanensis* isolates, most of which come from the inlands. The presence of this virus in *Leishmania* does not seem to influence *Leishmania in vitro* susceptibility to antiparasitics, but could increase the risk of treatment failure and relapses by 27% in patients treated with pentamidine. The genetic analysis of LRV, to identify LRV clusters involved in the disease, revealed six LRV groups, including two main groups. However, none of these clusters appeared to be associated with primary treatment failures. LRV appears to be involved only in disease reactivations. Thus, the study of a larger number of cases with disease reactivation would confirm the involvement of LRV in these relapses and determine if a particular LRV genotype is involved.

Keywords: *Leishmania guyanensis*, LRV, genotype, treatment failure, pentamidine