

Université Pierre et Marie Curie

Ecole Doctorale Complexité du Vivant

Unité Cytokines et Inflammation, Institut Pasteur

**Rôle de l'ADN dans l'activation du TLR9 lors
de l'infection par *Leishmania major* :**

**Propriétés des séquences génomiques
et implication des facteurs protéiques**

Par ERIN KHAN MéliSSa

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par Mme DOYEN Noëlle

Présentée et soutenue publiquement le 21 mars 2014

Devant un jury composé de :

Mme Fabienne TACCHINI-COTTIER

Rapporteur

Mme Loredana SAVEANU

Rapporteur

Mr Vincent MARECHAL

Examineur

Mr Philippe GRELLIER

Examineur

Mme Noëlle DOYEN

Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie en tout premier lieu Mme Noëlle Doyen qui m'a guidé et accompagné durant toute cette thèse. J'espère avoir réussi à acquérir sa rigueur et sa méthodologie scientifiques. *Merci pour votre soutien, votre patience à mon égard, votre sincérité, merci de m'avoir défendu aux moments critiques et me permettre de contribuer au projet encore quelques mois... en espérant un jour réussir à égaler vos qualités.*

Je tiens également à remercier les membres du jury : Mr Vincent Maréchal d'en avoir accepté la présidence; merci à Mme Fabienne Tacchini-Cottier et Mme Loredana Saveanu d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteurs ; merci à Mr Philippe Grellier d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail.

Merci à Mr Jean-Marc Cavaillon de m'avoir accueillie dans son laboratoire, de m'avoir accordé sa bienveillance et son oreille attentive, et pour toutes les riches anecdotes historiques (scientifiques, politiques et autres) dont il nous fait profiter. Merci à Véronique Mériaux et Chloé Borde pour leur bonne humeur et les efforts partagés sur le projet, à Catherine Fitting pour sa poly(-multi-méga-giga-)valence, son éternelle disponibilité et ses bonnes adresses, à Françoise Guinet pour son regard scientifique toujours très critique et que je n'imagine plus autrement que dans les vallées bavaroises sur une mélodie de Mozart, à Orhan pour sa jovialité et la précision de ses connaissances, à Oumäima Ibrahim-Granet pour sa franchise et ses chocolats. Merci aussi aux ex du labo, notamment à Marianna Parlato pour la justesse et la brillante qualité de ses points de vue scientifiques et non scientifiques, Amélie Savers pour avoir été un soutien et un exemple de persévérance, Virginie Puchois pour sa joie de vivre et ses petites gaufrettes, Fernando Guimaraes (ainsi qu'aux autres membres du comité d'organisation des doctorants/jeunes chercheurs de notre département) de m'avoir permis de contribuer pendant 2 années de ma thèse à la vie des jeunes chercheurs du campus en me nommant à leurs côtés, François Philippart et Charlène Blanchet pour leur soutien passé. Je garde une pensée pour Minou Adib-Conquy pour sa force, sa douceur et son aide scientifique.

Merci à tous nos collaborateurs. Un grand merci à Mr Eduardo Rocha qui m'a apporté une aide précieuse pour la réalisation de ce projet doctoral et qui m'a guidé dans les bases de l'analyse bio-informatique. Merci à Mme Bénédicte Manoury de m'avoir maintes fois accueillie dans son laboratoire et pour toutes les discussions constructives lors des réunions. Merci à Sophia Maschalidi et à Delphyne Descamps pour leur contribution active et les lourdes manip pendant lesquelles elles m'ont accompagnée. Merci à Mme Sophie Goyard et Simon d'Archivio pour les longues heures de microscopie que j'ai pu mener chez eux. Merci à Mr Alexandre Chenal pour m'initier aux joies des activités des protéases, pour sa disponibilité et ses nombreux conseils. Merci à Mr Serge Gangloff, à Claire et à Célia pour toutes les discussions et les « mini-pauses ».

Merci à tous mes amis les plus proches, sans qui j'aurais oublié le temps passer, je n'aurais

sûrement pas « vécu » pendant cette thèse, merci pour leur soutien, leurs conseils et pour tous les moments partagés et les nombreuses joies récentes et à venir : merci à Divya Babin, Sylvestre Chea, Flora Bouchacourt, Vincent Barbier, Sarah Casulli, Urs Lucas Böhm, Mathieu Massette, Xavier Bourry, Victor-Emmanuel Brunel, Jonathann Hugon, Claire Méliissari.

Et enfin, merci à toute ma famille dont la joie de vivre et le soutien sont les bases de mon bonheur : merci à mon père Anwar Hossein Khan qui n'a pas arrêté de me tenir la main depuis toute petite, qui me pousse toujours à aller plus haut, qui me rattrape à chaque faux pas, *sans toi je ne serai pas là*; merci à ma mère Jasmin Khan qui est toujours derrière moi et qui me rappelle de donner le meilleur de moi-même quelles que soient les conditions, merci d'avoir transformé une chambre de bonne en un studio cosy, rien que pour moi, en plein centre de Paris, pour me faciliter le travail ; merci à tous les deux pour l'excellence de vos plats bangladais les midis et les soirs, de sorte que même Seb préfère aujourd'hui votre cuisine à la mienne...Un grand merci à l'homme de ma vie, Sébastien Leuridan, pour son soutien quotidien, sa patience, ses attentions, son amour. Merci à mon petit frère Emmanuel Khan qui me fait rire à tout moment, il est le meilleur, le petit frère le plus talentueux, quand il ne fait pas son sérieux ou sa tête de mule. Merci à Guy Letellier pour son soutien et ses conseils avisés. Merci à la famille de Seb : Pascal et Sylvie Leuridan, Laëtitia et Cédric Martin, Ambre et Clara, Dorothée Leuridan et Didier Astabie, et à tout le reste de la famille Leuridan.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	2
LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES FIGURES.....	7
ABREVIATIONS	8
INTRODUCTION.....	11
I- LE PARASITE <i>LEISHMANIA</i>.....	11
A. CYCLE DU PARASITE	11
B. LA PATHOGENESE	13
C. EPIDEMIOLOGIE ET TRAITEMENTS.....	16
D. CARACTERISTIQUES DU PARASITE	17
1. Génome.....	17
2. Kinétoplaste.....	19
3. Molécules de surface.....	20
i. LPG	21
ii. gp63.....	22
iii. GIPLs.....	23
4. Phosphatases et Kinases du Parasite <i>Leishmania</i>	24
5. Cystéines Protéases.....	24
6. Exosomes	26
7. Antigènes Peptidiques.....	26
E. COMPARAISON AU NIVEAU GENOMIQUE AVEC <i>T. CRUZI</i> ET <i>BRUCEI</i>	28
II- ETUDE DE L'INFECTION PAR LE PARASITE <i>LEISHMANIA</i>	30
A. DIFFERENCES INTER-SPECIFIQUES ET INTRA-SPECIFIQUES DU PARASITE.....	30
B. MODELES EXPERIMENTAUX	31
C. ROLE DE L'ENVIRONNEMENT AU MOMENT DE L'INFECTION	33
III- ELEMENTS DE LA REPONSE IMMUNITAIRE AU PARASITE <i>LEISHMANIA MAJOR</i>	34
A. RENCONTRE AVEC LE COMPLEMENT	35
B. LES RECEPTEURS IMPLIQUES DANS L'INTERNALISATION DU <i>LEISHMANIA</i>	36
1. Les récepteurs du complément (CR1 et CR3)	36
2. Le récepteur Fc γ (Fc γ R).....	37
3. Le récepteur du mannose-fucose (MFR)	38
4. Le récepteur de la fibronectine (FnR).....	38
5. Autres récepteurs	39
C. LES TOLL-LIKE RECEPTORS (TLRs).....	40
1. Généralités sur les TLRs	40
2. Signalisation des TLRs.....	42
i. Signalisation via MYD88.....	42
ii. Signalisation via TRIF.....	43
3. TLR et <i>Leishmania</i>	43
4. Détournement de la réponse TLR par le parasite <i>Leishmania</i>	49
D. REPONSE DES CELLULES IMMUNITAIRES AU PARASITE <i>LEISHMANIA</i>	49
1. NEUTROPHILES	49
i. Rôle différent selon le fond génétique de la souris	50
ii. Recrutement des neutrophiles	51
iii. Influence sur la réponse T.....	52
iv. NETose	52
2. MONOCYTES	53
3. MACROPHAGES.....	54
4. CELLULES DENDRITIQUES	56
i. Caractéristiques	56
ii. Devenir des DCs après stimulation par un pathogène	57
iii. Importance de la production d'IL-12 par les cellules dendritiques.....	58

iv. Réponse du parasite <i>Leishmania</i> aux cellules dendritiques	59
5. REPONSE NK	60
6. FIBROBLASTES ET KERATINOCYTES DE LA PEAU.....	61
7. REPONSE T.....	62
i. Le rôle des molécules de co-stimulation.....	62
ii. Les lymphocytes T CD4 ⁺	63
iii. Les lymphocytes T CD8 ⁺	65
iv. La réponse cytokine des cellules T.....	67
8. REPONSE B	68
i. Rôle négatif de la réponse B	68
ii. Rôle protecteur de la réponse B.....	68
9. CELLULES SUPPRESSIVES T Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	69
10. CELLULES B REGULATRICES	70
11. CONCLUSION SUR LE ROLE DES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES IMMUNITAIRES DANS LA REPONSE AU PARASITE <i>LEISHMANIA</i>	71
IV- ROLE DE L'ADN ET DE SON RECEPTEUR TLR9 DANS L'INFECTION PAR UN PATHOGENE.....	73
A. DECOUVERTE DE SEQUENCES ACTIVATRICES ET INHIBITRICES	73
B. INTERNALISATION ET ACTIVATION CELLULAIRE PAR LE CpG	74
C. MISE EN EVIDENCE DE L'IMPLICATION DU TLR9 EN REPONSE AU CpG	74
D. ETUDE DES PROPRIETES DU TLR9	75
1. Synthèse et Localisation du TLR9.....	75
2. Maturation et Clivage du TLR9.....	77
3. Protéases impliquées dans la maturation du TLR9	78
i. Cathepsines	78
ii. Asparagine Endopeptidase	79
4. Liaison au CpG et activation du TLR9	80
E. DIFFERENTS OLIGONUCLEOTIDES ACTIVATEURS POUR LE TLR9	82
F. ACTIVATION DIFFERENTIELLE SELON L'ODN CpG ACTIVATEUR	84
G. MOTIFS INHIBITEURS	85
H. REMISE EN CAUSE DES MOTIFS ADN CAPABLES D'ACTIVER LE TLR9.....	86
1. La méthylation.....	86
2. L'importance de la charpente de l'ADN (séquence et structure)	87
3. L'accès au TLR9.....	87
I. IMPLICATION DE FACTEURS ASSOCIES A L'ADN POUR L'ACTIVATION DU TLR9	88
1. Anticorps	88
2. LL37.....	89
3. HMGB1	90
4. Granuline.....	91
5. CD14.....	92
J. IMPLICATION DU TLR9 DANS LES INFECTIONS PAR D'AUTRES PARASITES	92
1. TLR9 et ADN de <i>Trypanosoma cruzi</i> et <i>brucei</i>	92
2. TLR9 et ADN de <i>Plasmodium falciparum</i>	93
3. TLR9 et ADN de <i>Toxoplasma gondii</i>	94
HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE LA THESE.....	95
PARTIE 1.....	97
PRESENTATION	97
HMGB1 is involved in TLR9-dependent dendritic cell activation by <i>Leishmania major</i> but not vertebrate DNA.....	99
ABSTRACT	100
INTRODUCTION.....	101
MATERIALS AND METHODS	103
RESULTS.....	107

TLR9-dependent specific activation of dendritic cells by <i>Trypanosomatidae</i> DNA	107
Similar cellular uptake of <i>Trypanosomatidae</i> and vertebrate DNA	107
HMGB1 enhances TLR9-dependent dendritic cell activation by <i>L. major</i> DNA	108
<i>L. major</i> and vertebrate DNA differ in their nuclease sensitivity	109
Different distribution of inhibitory and activating sequences between <i>L. major</i> and vertebrates	109
Competition by vertebrate DNA prevents the immunostimulatory activity of <i>L. major</i> DNA	110
The properties of <i>L. major</i> DNA are shared by other <i>Trypanosomatidae</i> DNA	111
TLR9 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells occurs with <i>L. major</i> DNA but not vertebrate DNA	112
DISCUSSION	113
ACKNOWLEDGEMENTS	118
REFERENCES	119
FIGURE LEGENDS AND FIGURES	126
ETUDES COMPLEMENTAIRES	142
MATERIEL ET METHODES	142
RESULTATS	145
I- Internalisation du parasite et de son ADN dans les cellules dendritiques.	145
II- Etude de la localisation de l'ADN dans les cellules dendritiques	148
III- Etude la maturation du TLR9 dans les cellules dendritiques suite à une stimulation ADN	148
A. Etude du pH endosomal	148
B. Etude du clivage du TLR9	150
CONCLUSIONS DE LA 1^E PARTIE	152
 PARTIE 2	 154
IMPLICATION DE L'ASPARAGINE ENDOPEPTIDASE ET DES CATHEPSINES DANS L'INFECTION PAR LE LEISHMANIA MAJOR	154
PRESENTATION	154
MATERIEL ET METHODES	155
RESULTATS	157
I- Suivi de l'infection des souris AEP ^{-/-} , TLR9 ^{-/-} et C57BL/6 par le <i>Leishmania major</i>	157
II- Suivi de l'infection des souris déficientes pour la cathepsine L ou S par le <i>Leishmania major</i>	158
III- Suivi de l'infection des souris déficientes pour la Cathepsine B par le <i>Leishmania major</i>	160
IV- Recrutement cellulaire dans les ganglions après infection	161
V- Etude de l'expression de cytokines dans les ganglions drainants	162
VI- Suivi de la charge parasitaire et de la production de la cytokine IL-1β dans les coussinets plantaires des souris C57BL/6 et CatB ^{-/-} après infection	167
CONCLUSIONS DE LA 2^E PARTIE	169
 DISCUSSION ET PERSPECTIVES	 171
Les facteurs protéiques impliqués dans l'activation du TLR9	171
L'interaction HMGB1 avec l'ADN de parasite	172
La nature du ligand du TLR9	174
La maturation du TLR9 est-elle dépendante de l'activation par l'ADN ?	176
L'implication des protéases de maturation du TLR9 dans l'infection par <i>L. major</i>	177
Implication de l'inflammasome dans l'infection par <i>L. major</i>	178
La présentation antigénique	180
 BIBLIOGRAPHIE	 182

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Les différentes formes de leishmaniose et leur répartition géographique	14
Tableau 2 Les facteurs de virulence du parasite Leishmania	27
Tableau 3 TLR2 et TLR4 dans la réponse contre Leishmania	46
Tableau 4 Les TLR endosomaux dans la réponse contre Leishmania	47

LISTE DES FIGURES

Figure 1 La synthèse de la base J	18
Figure 2 Les molécules de surface du parasite Leishmania	20
Figure 3 Les récepteurs impliqués dans l'internalisation du parasite Leishmania	38
Figure 4 Les TLRs murins, leur localisation et leurs ligands	40
Figure 5 Structure d'un TLR	40
Figure 6 Signalisation des TLR selon la voie MyD88 ou la voie TRIF	41
Figure 7 Eléments de la réponse innée dans les souris C57BL/6 contre le parasite Leishmania	68
Figure 8 Maturation et translocation du TLR9	75
Figure 9 Squelette phosphodiester et squelette phosphorothioate	81
Figure 10 Activation cellulaire par les différentes classes de CpG	84

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN-Ac	ADN lié à des anticorps
AEP	Asparagine Endopeptidase
AP	Activator Protein
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
ARN	Acide Ribonucléique
BCR	B cell receptor
BMDC	Bone Marrow Derived Dendritic Cell
Cat	Cathepsin
CD36	Cluster of Differentiation 36 ou Thrombospondin Receptor
CD207	Langerin
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CCNDDNNGGG	Lettres représentant les bases ADN (A, C, G, T) où N équivaut à toute base ADN et D à toute base non C.
COX	Cyclooxygénase
CP	Cysteine Protease
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CR	Complement Receptor
CRP	C-Reactive Protein
DC	Dendritic Cell ou Cellule Dendritique
cDC	conventional Dendritic Cell
dDC	dermal Dendritic Cell
mDC	myeloid Dendritic Cell
moDC	monocyte derived- Dendritic Cell
pDC	plasmacytoïd Dendritic Cell
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
FcγR	Fragment Fc gamma receptor
FnR	Récepteur de la Fibronectine
GF	Germ Free, sans pathogène
GIPLs	Glycosyl-Inositol PhosphoLipides
Gp63	GlycoProtein of 63 kDa
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
Grp94	Glucose-Regulated Protein de 94 kDa (ou gp96)
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HRWCGTTN	Lettres représentant les bases ADN (A, C, G, T) où H équivaut à toute base non G, R à A ou G, W à A ou T, N à toute base ADN
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IκB	Inhibitor of kappa B

IKK	IκB kinase
iNOS	inducible Nitric Oxyde Synthase
IRAK	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase
IRF	Interferon-Regulatory Factor
ISP	Inhibiteurs de Sérines Protéases
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LACK	Leishmania homolog of receptors for activated C-kinase
LCF	Leishmania Chemokine Factor
LPG	Lipophosphoglycan
LPS	Lipopolysaccharide
LRV1	Leishmania RNA Virus 1
MAC	Complexe d'Attaque Membranaire
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MARCO	Macrophage Receptor with COLLAGENOUS structure
MBP	Mannan-Binding Protein
MD-2	Lymphocyte antigen 96, TLR4 coreceptor
MFR	Récepteur du Mannose-Fucose
MSP	Major Surface Protein
MyD88	Myeloid Differentiation primary response gene 88
NADPH oxidase	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxidase
NE	Neutrophil Elastase
NEMO	NF-kappa-B Essential Modulator
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NF-kB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural Killer
NO	Nitric Oxyde
NOS-2	Nitric Oxyde Synthase-2
ODN	Oligo-Déoxy-Nucléotides
PAMP	Pathogen Associated Microbial Pattern
PGE ₂	prostaglandine E ₂
PKC	Protéinase Kinase C
PKD1	Protein Kinase D1
PKR	Protéinase Kinase R
PO	Phosphodiester
PRAT4A	Protein Associated with TLR4 (ou CNPY3)
PRR	Pattern Recognition Receptor
PS	Phosphorothioate
PSP	Promastigote Surface Protein
PTP	Protein Tyrosine Phosphatase
RACK	Receptor for Activated Protein Kinase C
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End-Products
ROS	Reactive Oxygen Species ou Espèces Oxygénées Réactives

RRCGY	Lettres représentant les bases ADN (A, C, G, ou T) où R équivaut à A ou G et Y à C ou T
SAP	Acide Phosphatase Sécrétée
SAPK	Stress-Activated Protein Kinase
SHP-1	Src homology 2 domain-containing phosphatase 1
SIDER	Short Interspersed DEgenerated Retroposons
SLA	Soluble <i>Leishmania</i> Antigen
SLE	Lupus Erythémateux Systémique
SLPI	Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling protein
SOD-1	Superoxyde Dismutase – 1
SPF	Sans pathogène spécifique
SR-A	Scavenger Receptor
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAK	Transforming growth factor kinase
TBK	Tank-binding kinase
TE	Transposable Element ou ADN transposable
TGF	Transforming growth factor
Th	T helper
TIR Domain	Toll/IL-1R domain
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAF	TNFR-associated factor
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
UNC93B1	Unc-93 homolog B1
UTR	Untranslated Region ou Région non Traduite
v-ATPase	Vacuolar ATPase
WD	Tryptophane-Aspartate
WKKVGGGG	Lettres représentant les bases ADN (A, C, G, ou T) où W équivaut à A ou T, K à G ou T, V à A ou C ou T.

INTRODUCTION

I- LE PARASITE *LEISHMANIA*

Le parasite *Leishmania* été identifié en 1903 par Leishman dans le foie d'un ressortissant anglais décédé de la fièvre Dum-Dum, du nom de la ville indienne où la maladie avait été contractée. Quelques mois plus tard, Donovan décrivait des protozoaires identiques dans une biopsie splénique. Le parasite avait alors été décrit comme mesurant 2-5 μm et présentant un noyau et un kinétoplaste (Choi et al, 2001).

Par la suite, le *Leishmania* a été classifié comme un parasite unicellulaire appartenant à la classe des *Kinetoplastidae* et à l'ordre des *Trypanosomatidae*. Parmi les *Trypanosomatidae*, on retrouve aussi le genre *Trypanosoma*, tels *Trypanosoma cruzi*, *brucei* et *vivax*.

Par ailleurs, on différencie les parasites *Leishmania* de l'Ancien Monde ou du Nouveau Monde selon qu'ils ont respectivement pour vecteurs principaux la mouche de sable du genre *Phlebotomus* ou du genre *Lutzomyia*, tous les deux de la sous-famille des *Phlebotominae*. On trouve ces vecteurs en Afrique, Asie et Europe pour les premiers et en Amérique Centrale, du Nord et du Sud pour les seconds, ce qui correspond à la vaste distribution géographique du parasite *Leishmania*.

Les parasites *Leishmania* du Nouveau Monde regroupent l'ensemble des parasites *Leishmania* (*Leishmania*) et *Leishmania* (*Viannia*).

A. CYCLE DU PARASITE

Les parasites *Leishmania* ont pour vecteurs la mouche de sable de la sous-famille des *Phlebotominae*, du genre *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* (Killick-Kendrick, 1999). Seules les femelles sont hématophages. Ces parasites ont un spectre d'infection très large, ils peuvent infecter les reptiles et différentes classes de mammifères.

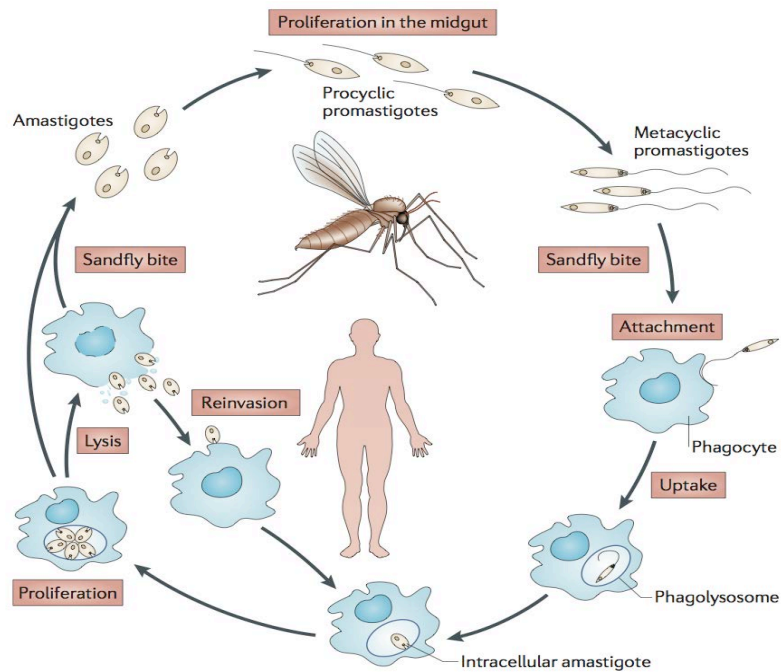


Figure 1 Le cycle du parasite (extrait de Kaye & Scott, 2011)

Les parasites *Leishmania* peuvent être sous deux formes : flagellée (ou promastigote) ou non flagellée (amastigote). Lors de son repas sanguin sur un reptile ou un mammifère, la mouche ingère des parasites au stade amastigote. Ces derniers se transforment rapidement en une forme promastigote procyclique, qui porte beaucoup de lipophosphoglycan (LPG) et de la métalloprotéinase gp63 à la surface. Ces derniers leur permettent de résister aux enzymes hydrolytiques de l'intestin de la mouche et de ne pas être éliminé par défécation, en restant au niveau des voies intestinales grâce à la liaison entre le LPG et une galectine présente dans le vecteur. La forme procyclique du parasite est une forme très peu mobile, pouvant se répliquer. Petit à petit, les parasites se répliquent de moins en moins rapidement et deviennent de plus en plus mobiles. De l'intestin, le parasite remonte au niveau des cavités buccales du phlébotome. Avant que la mouche transmette le parasite au vertébré, les parasites qui sont retrouvés dans les glandes salivaires sont sous forme promastigote métacycliques. Ce sont des parasites infectieux, très mobiles, qui ne se divisent pas (Alexander et al, 1999 ; Bates, 2007). Lors d'un nouveau repas sanguin, le parasite promastigote métacyclique sera injecté chez un hôte mammifère et internalisé dans les cellules phagocytaires de l'hôte. Dans les macrophages, le parasite subit une transformation en 2-5 jours selon le parasite, passant d'une forme promastigote à une forme amastigote pouvant se répliquer. La mort de la cellule infectée permettra le relargage des parasites amastigotes et propager l'infection à d'autres cellules d'une part. D'autre part, un autre vecteur pourra récupérer ces formes amastigotes lors d'un nouveau repas sanguin et continuer le cycle d'infection à d'autres organismes.

B. LA PATHOGENESE

Le parasite *Leishmania* provoque des leishmanioses. On distingue quatre formes principales de leishmaniose (Choi & Lerner, 2001 ; Banuls et al, 2007). Il existe une forme :

- cutanée : elle est surtout causée par les parasites *L. major* et *L. tropica* de l'Ancien Monde et *L. mexicana*, *L. amazonensis* et *L. braziliensis* du Nouveau Monde. La période d'incubation est de 1 semaine à 3 mois. Elle se traduit par l'apparition d'une plaque rouge sur le site de la piqûre, qui peut se développer en un ulcère. Elle peut être traitée. Mais il existe des cas sévères, plus difficiles à traiter, où la pathologie devient chronique et cause des cicatrices défigurantes inesthétiques.

Avec les parasites du Nouveau Monde dont *L. amazonensis* et *L. mexicana*, il existe une forme cutanée diffuse qui concerne les personnes avec une déficience dans la réponse immunitaire cellulaire. Elle cause des lésions disséminées sur tout le corps et provoque un état semblable à la lèpre (sans toucher les voies nerveuses). Les drogues thérapeutiques existantes peuvent ne pas être entièrement efficaces et la maladie peut devenir chronique.

Avec le parasite *L. tropica* de l'Ancien Monde, au niveau du Moyen-Orient (Iran, Irak) et autour de la Méditerranée (Afrique du Nord), une forme chronique et rare de leishmaniose cutanée a été décrite. Il s'agit de la leishmaniose chronique dite récidivante ou lupoïde. Elle débute à 95% au niveau du visage, progresse très lentement, avec des variations saisonnières et une détérioration surtout en été. Cette forme de leishmaniose peut être rarement traitée. Elle peut donc être très défigurante et peut persister 20 à 40 ans.

- muco-cutanée : elle peut être causée par les parasites *L. braziliensis* et plus rarement par les parasites *L. panamensis* ou *L. guyanensis*. Elle cause la destruction massive de la cavité oro-naso-pharyngée. Les personnes infectées meurent souvent de malnutrition ou de pneumonie.

- viscérale : elle est aussi appelée Kala-azar ("fièvre noire"), en raison de la fièvre et du noircissement de la peau qu'elle cause. Elle provoque aussi une augmentation du foie, des reins et des ganglions, ainsi qu'une perte de poids et une anémie. Elle est causée par les parasites *L. donovani* en Asie, *L. infantum* en Afrique et autour de la Méditerranée ou *L.*

chagasi en Amérique Centrale et Amérique du Sud. Il s'agit de la forme la plus sévère de leishmaniose, qui se révèle fatale si elle n'est pas traitée.

Jusqu'à 20% des patients traités efficacement de la leishmaniose viscérale peuvent subir des complications et avoir un syndrome post-kala-azar (PKDL, Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis) 2 à 10 ans après le traitement d'une leishmaniose viscérale et guérison (Zijlstra et al, 2003). Les symptômes sont l'apparition de lésions nodulaires dans lesquels on retrouve des parasites *Leishmania*, qui seraient donc des parasites persistants après guérison et qui, pour une raison encore inconnue, redeviennent pathogéniques lors des périodes inter-épidémiques de leishmaniose viscérale. Il concerne surtout l'Asie du Sud et les pays de la Corne de l'Afrique, où sévit le parasite *L. donovani*.

TYPE DE LEISHMANIOSE	PRESENCE GEOGRAPHIQUE
Leishmaniose cutanée	
Ancien Monde	
<i>Leishmania major</i>	Afrique sub-saharienne, Moyen-Orien, Asie du Sud, Asie Centrale
<i>Leishmania tropica</i>	Bassin méditerranéen, Moyen-Orien, Asie du Sud
<i>Leishmania aethiopica</i>	Ethiopie, Kenya
<i>Leishmania infantum</i>	Bassin méditerranéen, Asie centrale
Nouveau Monde	
<i>Leishmania (Leishmania)</i>	
<i>Leishmania chagasi</i>	Honduras, Costa Rica
<i>Leishmania mexicana</i>	Amérique Centrale
<i>Leishmania amazonensis</i>	Bassin amazonien
<i>Leishmania (Viannia)</i>	
<i>Leishmania braziliensis</i>	Amérique du Sud
<i>Leishmania panamensis</i>	
<i>Leishmania guyanensis</i>	
<i>Leishmania amazonensis</i>	
Leishmaniose cutanée diffuse	
<i>Leishmania aethiopica</i>	Ethiopie, Kenya, Yemen, Namibie
<i>Leishmania mexicana</i>	Amérique Centrale
<i>Leishmania (Viannia) amazonensis</i>	Bassin amazonien
Leishmaniose récidivante	
<i>Leishmania tropica</i>	Bassin méditerranéen, Moyen-Orien
Leishmaniose muco-cutanée	
<i>Leishmania braziliensis</i>	Amérique du Sud
<i>Leishmania panamensis</i>	
<i>Leishmania guyanensis</i>	
Leishmaniose viscérale	
<i>Leishmania donovani</i>	Bagladesh, Inde, Népal, Ethiopie, Kenya, Soudan
<i>Leishmania infantum</i>	Bassin méditerranéen, Asie centrale, Ethiopie, Kenya, Soudan
<i>Leishmania chagasi</i>	Amérique du Sud et Amérique Centrale
<i>Leishmania (Viannia) amazonensis</i>	Bassin amazonien
Leishmaniose syndrome post-kala-azar	
<i>Leishmania donovani</i>	Bagladesh, Inde, Népal, Ethiopie, Kenya, Soudan

Tableau 1

Les différentes formes de leishmaniose et leur répartition géographique

Adapté de Magill, Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease, 2012

C. EPIDEMIOLOGIE ET TRAITEMENTS

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, la leishmaniose est considérée comme une maladie tropicale émergente à risque pour 350 millions de personnes dans le monde, réparties sur 88 pays différents. Près de 12 millions de personnes en sont infectées. Le taux d'incidence de la maladie est d'environ 1-2 millions de nouveaux cas par an et le taux de mortalité annuel atteint 20 à 30 000 décès.

Les formes cutanées et muco-cutanées sont essentiellement reportées au niveau du bassin méditerranéen, au Moyen-Orient, en Asie Centrale et en Amérique Centrale/ du Sud. 90% des leishmanioses cutanées ont été reportées dans 7 pays : l'Afghanistan, l'Algérie, le Brésil, l'Iran, le Pérou, l'Arabie Saoudite et la Syrie (Desjeux, 2004). Quant à la forme viscérale, la plus sévère, elle se concentre à 90% dans six pays principaux : le Brésil, le Bangladesh, l'Inde, l'Ethiopie, le Soudan et le Sud-Soudan.

La leishmaniose affecte surtout les sociétés dans le besoin, qui connaissent les difficultés d'absence de logement ou de logements insalubres, de malnutrition, de ressources très limitées et d'un système immunitaire faible.

L'infection peut être diagnostiquée par la mise en évidence des formes parasitaires (biopsie de peau, ponctions de la rate, moelle, ganglions...), de l'ADN ou des antigènes parasitaires dans le sang ou les produits de ponctions/biopsies ou par des tests sérologiques avec la mise en évidence d'anticorps contre le parasite.

Il n'existe pas encore de vaccin efficace contre la leishmaniose. Les traitements de la leishmaniose sont multiples et doivent prendre en compte pour certaines formes de leishmaniose l'espèce parasitaire concernée et l'existence d'infection concomitante. Il s'agit surtout de chimiothérapies, qui sont souvent anciennes et toxiques.

Le premier traitement oral contre la leishmaniose est la miltéfosine, très efficace aussi contre la leishmaniose viscérale. Il s'agit d'un composé lipidique synthétique, actif sur la membrane des parasites, et qui a été montré comme induisant la condensation et la fragmentation de l'ADN de parasites promastigotes et amastigotes *L. donovani* et à leur mort par apoptose

(Verma et al, 2004). Il existe aussi d'autres traitements oraux comme le fluconazole qui empêche le développement du parasite.

Les premiers produits ayant servi à traiter la leishmaniose se font souvent par voie intraveineuse ou intramusculaire, mais ils nécessitent l'injection de volumes importants (Buffet et al, 2010). Parmi ceux qui sont toujours utilisés aujourd'hui, on retrouve les dérivés de l'antimoine pentavalent, comme l'antimoniote de méglumine Glucantime®. Convertis en dérivé trivalent dans les macrophages, ils pourraient avoir un rôle d'inhibiteur des enzymes glycolytiques du parasite. D'autres traitements anti-leishmaniens sont basés sur l'amphotéricine B et le paromomycine. Des macrophages traités avec l'amphotéricine B montraient une internalisation plus faible des parasites *L. donovani*, probablement dû à la séquestration de composés lipidiques (dont le cholestérol) qui pourraient intervenir dans les mécanismes d'internalisation du parasite (Paila et al, 2010). Tous ces produits ont cependant une toxicité cardiaque, rénale, pancréatique ou hépatique (Buffet et al, 2010). Le traitement à la pentamidine n'est par exemple plus utilisé du fait d'une forte dose nécessaire pour son usage. Des formes améliorées de l'amphotéricine B ont été développées (amphotéricine B liposomale AmBisome® à la place de l'amphotéricine B désoxycholate Fungizone®), mieux tolérée et avec une durée d'administration plus courte (Buffet et al, 2010).

Cependant, dans les années 1990s, des cas de chimiorésistance sont apparus en Inde et au Népal chez des parasites *Leishmania donovani*, comme dans le cas du traitement à l'antimoine pentavalent. Les parasites résistants présentent une importante hétérogénéité génétique, suggérant l'existence de différentes populations parasitaires résistantes (Decuyper et al, 2012).

D. CARACTERISTIQUES DU PARASITE

1. Génome

Le génome haploïde référence du parasite *Leishmania* est de 33 Mb (Ivens et al, 2005). Cependant, les différentes souches de parasites *Leishmania* diffèrent par le nombre de chromosomes. Les parasites de l'Ancien Monde (*L. major*, *L. infantum* ou *L. donovani*) présentent 36 paires de chromosomes alors que ceux du Nouveau Monde (*L. mexicana* ou *L. braziliensis*) présentent 34 ou 35 paires de chromosomes, 2 chromosomes ayant fusionné

entre eux (Peacock et al, 2007). Les parasites *Leishmania* sont des organismes diploïdes, certains chromosomes pouvant être polyploïdes ou aneuploïdes (Rogers et al, 2011).

En général, la distribution génique et les séquences sont conservées entre toutes les souches de parasites *Leishmania*. Leur génome présente une forte synténie, avec des gènes organisés en unités polycistroniques. Ces unités peuvent être divergentes ou convergentes, sans introns, avec la synthèse d'un long messager où les gènes sont en tandem (Martinez-Calvillo, 2003). La régulation se fait essentiellement au niveau post-transcriptionnel, notamment sur la stabilité et la traduction des messagers par des régions 3' non traduites (3' UTR – Untranslated Region), par polyadénylation ou par l'intervention de facteurs spécifiques (Clayton, 2002).

Au niveau des régions 3'UTR, des séquences correspondant aux rétrotransposons SIDER (pour Short Interspersed DEgenerated Retroposons) pourraient avoir un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. Les rétro-transposons sont des séquences d'ADN transposables (TE – Transposable Element), qui peuvent se déplacer d'une région chromosomiques à une autre, et ce par reverse transcription avec un intermédiaire ARN. Parmi les TEs, on trouve aussi les DNA transposons qui se déplacent avec un intermédiaire ADN. Chez les *trypanosomatidae*, les rétro-transposons peuvent constituer jusqu'à 5% des génomes, ce qui en fait la majorité des TEs présentés par ces parasites (El-Sayed et al, 2005 ; Berriman et al, 2005 ; Peacock et al, 2007; Bringaud et al, 2009). On en retrouve aussi dans le génome humain où ils constituent jusqu'à 45 % du génome (Lander et al, Nat, 2001). On estime que l'ensemble des TEs a une fonction importante de régulation à différents niveaux (transcription, traduction...).

Dans le génome du *Leishmania*, les rétrotransposons SIDER (0.55 kb en moyenne) ont été retrouvées à 95.4% dans les régions intergéniques (1.4 kb en moyenne), entre les unités polycistroniques, à la suite d'un cinquième de ses gènes. Les gènes suivis d'un élément SIDER sont alors moins exprimés que les autres gènes (Bringaud et al, 2007 ; Bringaud et al, 2008). Cependant, les rétro-transposons du parasite *Leishmania* ne sont plus actifs. Au cours de l'évolution, le *Leishmania* a perdu les éléments responsables de leur mobilité et de leur multiplication (Bringaud et al, 2006 ; Peacock et al, 2007).

Le génome du *Leishmania* présente des particularités nucléotidiques. C'est un génome riche en GC (58%). De plus, le parasite *Leishmania* présente une base spécifique des

Kinétoplastidae, la base J, qui a d'abord été identifiée dans le génome du parasite *T. brucei* (Gommers-Ampt et al, 1993). Il s'agit d'une thymine modifiée par l'ajout d'un résidu hydroxyle, qui est coiffé par la suite d'un b-D-glucose. La base J est donc une b-D-glucosyl-hydroxy-méthyluracyle. Chez le parasite *Leishmania*, elle remplace 1% des thymidines du génome.

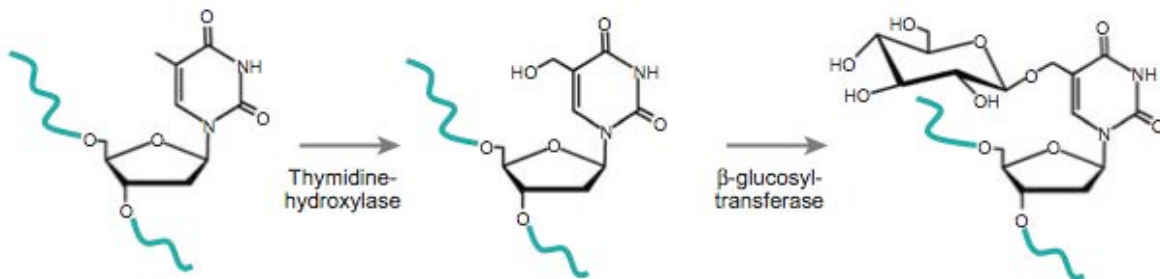


Figure 1 La synthèse de la base J (Extrait de Borst & Sabatini, 2008)

Pour *L. major*, la base J se retrouve à 99% au niveau des télomères (Genest et al, 2007), sur la séquence GGGTTA que l'on retrouve aussi bien aux extrémités des chromosomes de *Trypanosomatidae*, que sur ceux de vertébrés. Chez le parasite *Leishmania*, les bases J sont présents aussi bien dans l'insecte que chez l'hôte (Borst & Sabatini, 2008).

De manière intéressante, les régions sous-télomériques (à proximité des télomères) du parasite *L. major* sont très petites avec peu de répétitions, contrairement aux autres *trypanosomatidés* séquencés. Cependant, les différents *trypanosomatidés* présentent une grande synténie dans leurs séquences génomiques et des motifs télomériques identiques. Les régions non synténiques se trouvent essentiellement dans les régions sous-télomériques et intra-chromosomiques. (El-Sayed et al, Science, 2005).

La fonction de ces thymidines modifiées dans le génome n'est pas précisément connue. Mais des travaux démontrent son implication dans l'inhibition de l'expression des gènes (Van Leeuwen, Genes Dev, 1997) et la régulation d'enzymes impliquées dans la transcription (Van Luenen et al, Cell, 2012).

2. Kinétoplaste

Comme les autres *Trypanosomatidae*, les parasites *Leishmania* présentent un organe particulier : le kinétoplaste. Il est apparenté aux mitochondries, car il contient un ADN qui

code pour les ARN ribosomiaux (ARNr) et les éléments du complexe de la chaîne respiratoire (Simpson et al, 2006).

L'ADN kinétoplastidique est constitué par un réseau d'ADN circulaires, reliés les uns aux autres. Deux types d'ADN circulaire le composent, leur longueur variant selon l'espèce parasitaire (Jensen & Englund, 2012):

- les maxicercles de 20 à 40 kb, que l'on retrouve en un faible nombre de copies, sur lesquels se trouvent des séquences codant pour la machinerie énergétique et les ARNr.
- les minicercles de 0.5 à 2.5 kb, que l'on retrouve en des milliers de copies, avec une longueur hétérogène mais de séquence très variable. Ils codent surtout pour des ARN régulant la transcription des gènes des maxicercles.

Ainsi, chez *T. brucei*, les minicercles font environ 1 kb et les maxicercles 23 kb. Chez *L. tarentolae*, une souche du parasite *Leishmania* infectant les reptiles, les minicercles ne font que 0.8 kb (Marini et al, 1982). L'ADN kinétoplastidique a sa propre machinerie de réplication et de ségrégation d'ADN (Simpson et al, 2006 ; Jensen & Englund, 2012).

3. Molécules de surface

Différents composants du parasite *Leishmania* peuvent influencer le processus infectieux, à commencer par les molécules présentes à la surface. Parmi elles se trouvent

- des molécules membranaires avec un noyau phosphoglycan et une ancre GPI (glycosyl-phosphatidyl-inositol), comme les glycosyl-inositol phospholipides (GIPLs). Certaines sont des molécules glycoconjuguées plus élaborées avec des résidus de galactose et de mannose comme le lipophosphoglycan (LPG) ou avec une extrémité protéique comme la gp63.
- des molécules sécrétées correspondant à des molécules glycoconjuguées de galactose et de mannose liées à des protéines, comme les enzymes acides phosphatases sécrétées (SAPs).

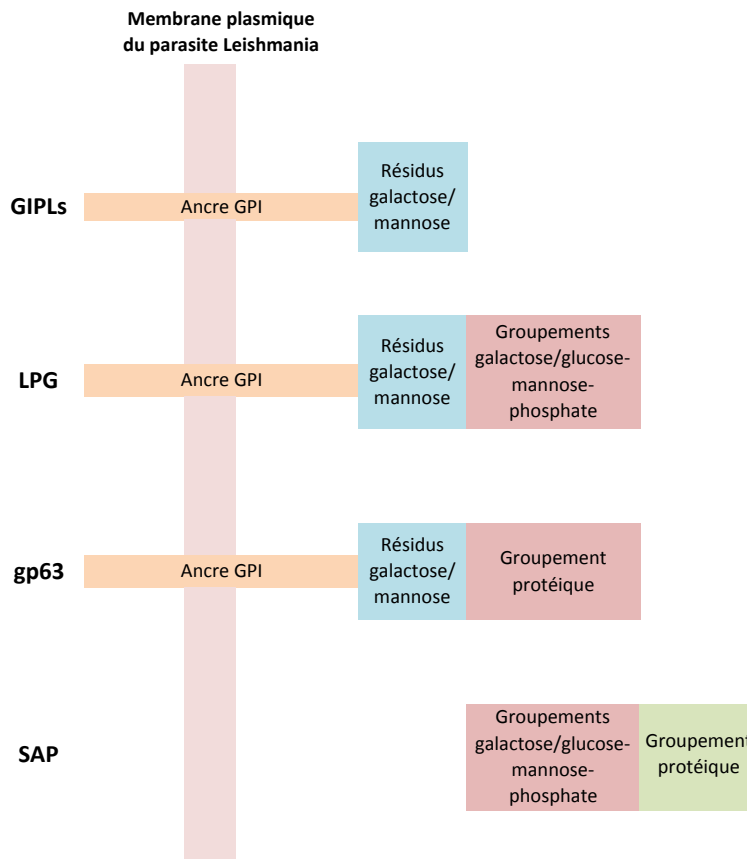


Figure 2 Les molécules de surface du parasite *Leishmania*
(Adapté de Descoteaux et al, 1999)

Comme cela sera discuté pour ces différentes molécules de surface, leur effet est différent : i) selon le stade considéré pour un parasite donné, ii) selon la souche considérée pour une espèce donnée de parasite, iii) selon les différentes espèces du parasite *Leishmania*. De plus, la virulence d'un même parasite peut être différente en fonction de l'hôte. Ainsi, la même souche de *L. major* peut avoir une virulence différente chez l'homme ou chez la souris (Späth et al, 2003).

i. LPG

Le LPG est très abondant à la surface du parasite *Leishmania*. Il peut jouer un rôle dans la virulence du parasite.

Pour *Leishmania donovani*, la présence du LPG est essentielle lors du processus infectieux. En effet, il inhibe la fusion entre le phagosome et l'endosome (Desjardins & Descoteaux, 1997) en retenant les molécules permettant l'assemblage de l'actine, telle une barrière physique, à proximité (Lodge et al, 2005) et en empêchant la formation du complexe NADPH oxydase à la membrane du phagosome, responsable de la synthèse de ROS (espèces

oxygénées réactives) (Lodge et al, 2006). De plus, il inhibe l'acidification du phagosome en empêchant son association à la synaptotagmin V, responsable du recrutement de la pompe à protons v-ATPase (vacuolar ATPase) dans les phagosomes (Vinet et al, 2009). Cela laisse le temps nécessaire au parasite pour se transformer de promastigote en amastigote, ce dernier étant plus résistant au pH acide et portant moins de LPG (Olivier et al, 2012). Pour le parasite *Leishmania major* aussi, le LPG semble être un facteur de virulence. Des parasites mutants pour la galactofuranosyl transférase, enzyme déficients pour la synthèse que du LPG (n'affectant la synthèse ni de la gp63, ni des GIPLs), sont en effet moins virulents pour l'infection des souris BALB/c. Bien que leur internalisation dans les macrophages péritonéaux ne soit pas modifiée, les parasites mutants n'arrivent plus à survivre dans ces cellules (Späth et al, 2000 et 2003). A l'opposé, pour *Leishmania mexicana*, l'infectivité des parasites déficients en LPG n'est pas modifiée (Ilg et al, 2001). Ainsi le LPG de différents parasites peut présenter une virulence différente. Ceci peut être dû aux différences dans la composition et la structure du LPG. Ainsi, *L. major* a un LPG avec du poly- β -galactose que celui de *L. donovani* ne présente pas de sucres substitués (Turco & Descoteaux, 1992).

ii. gp63

La gp63 est une métalloprotéase dépendante du zinc, aussi appelée leishmanolysine ou MSP (Major Surface Protein) ou PSP (Promastigote Surface Protein), que l'on retrouve dans le cytoplasme et à la surface du parasite. Elle est synthétisée sous une forme inactive et devient mature et active après clivage de son extrémité N-terminale. C'est une molécule très glycosylée, avec des résidus glucosamine et galactosamine N-acétylés. Comme le LPG, elle est abondamment exprimée dans les promastigotes et a une expression réduite dans les amastigotes (Olivier et al, 2012).

La gp63 permet au parasite :

- d'éviter la réponse par le système du complément, en convertissant la molécule du complément C3b en une forme inactive iC3b (Brittingham et al, 1995).
- d'être internalisé par opsonisation en faisant intervenir les récepteurs des molécules de complément, CR1 et CR3, et le récepteur de la fibronectine (Brittingham et al, 1999).
- de résister à l'environnement phago-lysosomal. Des parasites *L. amazonensis* dont l'expression de gp63 a été diminuée avec des ARN anti-sens ont une survie intracellulaire réduite (Chen et al, 2000).
- d'inhiber la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, TNF α , IFN γ), d'IFN α/β . La gp63 est capable en effet de cliver et d'activer des Protein Tyrosine Phosphatase (PTP) de

l'hôte telles que la SHP-1. Cette dernière peut se lier et inactiver : i) JAK2 (Blanchette, Olivier, 1999), ii) IRAK-1 suite à l'infection par *L. donovani*, (Abu-Dayyeh, Olivier, 2008), nécessaire à la signalisation des TLRs (Toll-Like Receptors), iii) les kinases ERK1/2 et SAPK/JNK, nécessaires à la signalisation MAPK.. Les trois voies citées aboutissent au recrutement de différents facteurs de transcription que sont notamment STAT1a, NF-kB et AP-1, qui régulent l'expression de gènes des différentes cytokines citées (Olivier et al, 2012).

- d'inhiber la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). En effet, la présence de gp63 induit une baisse de la signalisation de la protéinase kinase C (PKC), conduisant à une baisse de l'activité de la NADPH oxydase qui participe à la synthèse de ROS (Corradin, Vergeres, 1999).
- d'inhiber la synthèse d'oxyde nitrique (NO) (Gomez, Olivier, 2009). En effet, le NO est nécessaire pour l'élimination du parasite (Liew et al, 1990) et est synthétisé à partir de la L-arginine par l'enzyme NOS-2 ou iNOS (inducible Nitric Oxyde Synthase), exprimé en cas d'activation cellulaire.

Ainsi, la gp63 a un rôle important dans la survie du parasite dans le milieu extracellulaire et à l'intérieur des macrophages, en interférant avec réponse de l'hôte pour permettre son évation du système immunitaire.

iii. GIPLs

A l'opposé des autres protéines avec une ancre GPI (LPG, gp63), l'expression des GIPLs ne diminue pas lors de la transformation du stade promastigote en stade amastigote, ce qui en fait les molécules de surface les plus exprimées au stade amastigote (Ilgoutz & McConville, 2001). Cela a conduit à penser que les GIPLs ont un rôle essentiel pour la survie du parasite en forme amastigote. Là encore, en fonction des souches du parasite, leur importance est différente. Chez le *L. major* amastigote, en absence de production des GIPLs, la viabilité des parasites est peu modifiée (Zufferey et al, 2003). Pour les parasites *Leishmania braziliensis* et *Leishmania infantum*, la pré-incubation de macrophages péritonéaux de souris BALB/c avec les GIPLs de ces deux parasites inhibe certaines voies de signalisations cellulaires et la réponse aux parasites, en réduisant les productions de NO et d'IL-12, en réponse à l'IFN γ . Ceci suggère que les GIPLs de ces parasites peuvent favoriser le processus infectieux (Assis et al, 2012).

4. Phosphatases et Kinases du Parasite *Leishmania*

Les phosphatases acides (SAPs) sont des enzymes qui sont soit liées à la membrane soit sécrétées par les parasites *Leishmania* et qui ont été notamment retrouvées dans le sécrétome du parasite *Leishmania braziliensis* (Cuervo et al, 2009). Elles ont la capacité de déphosphoryler sur un résidu sérine ou tyrosine des phosphoprotéines, telle que la pyruvate kinase, la phosphorylase kinase ou les histones, d'où un rôle pour le métabolisme de survie pour le parasite (Das et al, 1986). Leur rôle sur les protéines de l'hôte n'est pas bien connu. Mais ils pourraient avoir une importance relative du fait que certaines phosphatases acides sont très conservées parmi les parasites *Leishmania* (Shakarian et al, 2003). De plus, chez *Leishmania donovani*, leur activité est plus de deux fois plus élevée chez les souches virulentes qu'avirulentes (Katakura & Kobayashi, 1988) et des souches de parasites résistants à l'antimoine présentent une amplification des régions génomiques contenant des gènes des phosphatases acides (Downing et al, 2011). Par ailleurs, lors du processus infectieux, elles pourraient aussi avoir des capacités d'inhibition de la réponse cellulaire. En effet, après extraction et incubation avec des cellules neutrophiles, ces enzymes inhibent la réponse des neutrophiles humains en inhibant la production d'anions superoxyde (Remaley et al, 1984).

Comme les phosphatases, des kinases pourraient aussi interférer dans la réponse de l'hôte. Par exemple, les MAPK (mitogen-activated protein kinase) interviennent dans différentes voies de signalisation cellulaire dont les réponses immunitaires chez les eucaryotes et dans la prolifération et la différenciation chez les parasites *Leishmania*. La délétion d'une MAPK dans le génome de *Leishmania mexicana* rend le parasite non virulent et les BALB/c infectées avec un tel parasite ne présentent plus de lésions (Wiese, 1998). Les parasites conservaient leur capacité à infecter des macrophages péritonéaux et à se transformer de forme promastigote en forme amastigote. Après la transformation, le parasite ne survit plus, suggérant l'importance de cette kinase au stade amastigote. Plus récemment, dans le génome de parasites *Leishmania donovani* résistantes à l'antimoine, une augmentation des locus codant pour la MAPK a été observée (Downing et al, 2011).

5. Cystéines Protéases

Les cystéines protéases sont essentielles au parasite *Leishmania* et interviennent dans son métabolisme et sa survie. Des parasites *Leishmania mexicana* déficients pour les cystéines protéases (CPs) CP-A, CP-C et surtout CP-B ont ainsi une infectivité atténuée lors de

l'infection de souris BALB/c. Ces dernières ne sont plus sensibles à l'infection par le parasite et font une réponse Th1 et non Th2. Cela a conduit à l'hypothèse que ces protéases CP-A, CP-B et CP-C (respectivement analogues à la Cathepsine L des mammifères pour les deux premières et à la cathepsine B pour la dernière) pouvaient être des facteurs de virulence (Alexander et al, 1998). Par la suite, différents travaux ont montré que les protéases CP-A et CP-B du parasite *Leishmania mexicana* induisent dans les macrophages la dégradation de NF- κ B, de ses inhibiteurs I κ B et celle de facteurs de transcription comme STAT1 et AP-1, qui permettent une réponse NO via la production d'IFN γ (Olivier et al, 2012).

Le parasite *Leishmania* possède un inhibiteur endogène de cystéines protéases, désigné ICP. Le rôle de cet inhibiteur n'est pas encore défini. Chez le parasite *Leishmania mexicana*, bien qu'une petite partie de l'ICP colocalise avec les protéases dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi chez le parasite, elle n'a pas de rôle dans la régulation de leur expression ou de leur activité (Bryson et al, 2009).

Les cystéines protéases des mammifères ont un rôle essentiel pour la mise en place de la réponse immunitaire. En effet, des traitements cliniques à la cystatine, inhibiteur de cystéine protéase, de souris BALB/c assurent une protection contre l'infection par le *Leishmania* en réorientant la réponse de Th2 vers Th1 et en augmentant la production de NO par les macrophages péritonéaux infectés (Maekawa et al, 1998 ; Das et al, 2001). Parallèlement, il a été décrit que les inhibiteurs de cystéine protéases peuvent aussi inhiber l'activation du TGF β , qui est un régulateur de l'expression des cytokines. Il réduit l'expression d'iNOS et d'IFN γ et la réponse Th1 au profit de la réponse Th2. L'implication des cathepsines dans l'activation du TGF β a été démontrée dans la réponse au *L. chagasi*. En effet, l'activation du TGF β peut être bloquée par Ca-074, l'inhibiteur de la cathepsine B (Gantt et al, 2003).

On ne retrouve pas d'inhibiteur de cystéine protéase endogène chez les mammifères mais en plus d'inhiber les CP-A, CP-B du parasite, l'ICP du parasite peut aussi inhiber la cathepsine L et, dans une moindre mesure, la cathepsine B parmi les protéases de l'hôte (Sanderson et al, 2003). Il avait notamment été décrit dans le macrophage que le parasite *Leishmania amazonensis* induit l'internalisation des CMH de classe II dans les vacuoles parasitophores pour leur dégradation et pour inhiber la présentation antigénique (de Souza Leao et al, 1995). Avec des inhibiteurs de CPs, cette capacité est perdue. Ces cystéines protéases peuvent donc

avoir un rôle direct pour la réponse immunitaire du macrophage contre le parasite *Leishmania* et ce dernier pourrait la contourner avec son inhibiteur endogène de cystéines protéases, l'ICP.

6. Exosomes

Le parasite *Leishmania* peut sécréter des facteurs de virulence tels que la gp63 par la formation d'exosomes, qui peuvent fusionner avec la paroi des phagolysosomes dans les macrophages et se retrouver dans leur cytoplasme ou qui peuvent être libérés dans le milieu extracellulaire par un parasite et être internalisés par des macrophages qui ne sont pas encore infectés (Silverman, Reiner, 2010 ; Hassani, Olivier, 2011). Ces exosomes sont des vésicules de 40-100 nm de diamètre qui contiennent surtout des protéines de surface et des protéines transmembranaires, mais aussi des protéines nécessaires au routage de protéines ou à la signalisation et des ARN messagers et micro-ARNs (Olivier et al, 2012). Cette sécrétion est augmentée dans les 4h qui suivent une augmentation de la température à 37°C (comme lors de l'internalisation du parasite dans la cellule de l'hôte) (Silverman, Reiner, 2010). Les protéines présentes dans les vésicules de sécrétion sont suffisantes pour induire l'activation des PTP (Protein Tyrosine Phosphatase) des macrophages et d'inhiber la translocation de facteurs de transcription tels que NF-kB, STAT1 et AP-1 dans le noyau (Hassani, Olivier, 2011).

7. Antigènes Peptidiques

La réponse immunitaire au parasite a été classiquement étudiée au départ avec des antigènes issus de la lyse de parasites *Leishmania*. Il s'agit d'un cocktail d'antigènes, les SLAs pour Soluble *Leishmania* Antigens, qui induisent une réponse cytokinique modérée.

Un antigène particulier dérivé de parasites *Leishmania major* a été mis en évidence en 1985 par les travaux de Glaichenhaus (Mougneau et al, 1995), en partant d'une banque d'expression de peptides antigéniques. Ils ont isolé un peptide de 24 kDa induisant l'activation de lymphocytes T. L'injection concomitante de ce peptide de 24 kDa et de l'IL-12 rend les souris BALB/c résistantes à l'infection avec une réorientation de la réponse Th2 en Th1. On observe ainsi une diminution des cellules exprimant l'IL-4, une réduction de la production d'IgE et une augmentation de l'expression d'IFN γ . Le cDNA à l'origine de ce peptide a été isolé et le gène identifié. Il code en réalité pour une protéine de 36kDa (Afonso et al, 1994 ; Mougneau et al, 1995).

La séquence en acides aminés de cette protéine présente une grande homologie avec celle des récepteurs intracellulaires de la protéine kinase C (RACKs ou Receptor for Activated Protein Kinase C) chez les mammifères, de la famille des protéines contenant des motifs Trp-Asp (WD). Par analogie, cette protéine de 36 kDa a été nommée l'antigène LACK (*Leishmania* homolog of receptors for activated C kinase). L'antigène LACK a été retrouvé dans les parasites au stade promastigote et amastigote.

Chez les eucaryotes, la protéine RACK est impliquée dans différents processus comme le cycle cellulaire, les synthèses d'ADN et d'ARN, etc. Le rôle de la protéine LACK pour le parasite *Leishmania* est encore peu connu. Cependant, les parasites *Leishmania major* déficients pour cette protéine ne sont pas viables (Kelly, 2003).

La production de cette protéine est sous la dépendance de deux gènes *lack1* et *lack2*, issus d'une duplication et placés en tandem (Gonzalez-Aseguinolaza, 1999). Il pourrait exister une régulation coordonnée entre ces deux gènes pour assurer la synthèse de la protéine LACK au niveau nécessaire pour le parasite. Les parasites avec une seule copie de chacun des gènes ne sont pas différents des parasites sauvages. En revanche, l'absence de l'un de ces gènes diminue le pouvoir infectieux du parasite.

Chez *Leishmania*, la protéine LACK est cytoplasmique, disposée autour de l'ADN du kinétoplaste (Gonzalez-Aseguinolaza, 1999). Elle peut interagir avec des séquences peptidiques présentes dans les protéines impliquées dans la réplication de l'ADN ou la synthèse d'ARN, ainsi qu'avec un peptide constituant la chaîne b du CMH de classe II.

La protéine LACK est retrouvée parmi les protéines sécrétées par le parasite *Leishmania braziliensis* (Cuervo et al, 2009). La protéine LACK du *Leishmania mexicana* aussi pourrait être sécrétée car *in vitro*, elle peut se lier au plasminogène, un précurseur non actif de la plasmine, capable de dégrader la matrice extracellulaire (Gomez-Arreaza et al, 2011). En favorisant la conversion du plasminogène en plasmine, elle pourrait contribuer à la synthèse de la plasmine dans l'environnement du parasite juste après l'infection pour dégrader la matrice extracellulaire et faciliter la rencontre entre le parasite et les cellules phagocytaires.

Comme LACK chez *Leishmania*, des homologues à la protéine RACK ont été décrits chez *T. brucei*, sous le nom de protéines TRACK, ou chez le parasite *Crithidia fasciculata* sous le nom de CACK, avec une séquence très conservée par rapport à celle des mammifères.

	Est un facteur de virulence	N'est pas un facteur de virulence
LPG	<i>L. major, L. donovani</i>	<i>L. mexicana</i>
	Activités contre la cellule-hôte inhibition de la fusion des phagosomes et lysosomes inhibition de la production de la formation de NADPH oxydase (synthèse ROS) inhibition de l'acidification de endosomes	
gp63	<i>L. donovani, L. amazonensis</i>	
	Activités contre la cellule-hôte détournement des molécules du complément pour favoriser son internalisation capacité de résistance au pH acide inhibition de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, de ROS et de NO	
GIPLs	<i>L. braziliensis, L. infantum</i>	<i>L. major</i>
	Activités contre la cellule-hôte inhibition de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, de ROS et de NO	
Phosphatases et Kinas	<i>L. donovani, L. mexicana</i>	
	Activités contre la cellule-hôte inhibition de la réponse des neutrophiles et leur synthèse de ROS	
Cystéines protéases	<i>L. mexicana, L. amazonensis</i>	
	Activités contre la cellule-hôte dégradation de facteurs de transcription (NF-kB) dégradation de molécules de CMH de classe II	
Exosomes	<i>L. mexicana</i>	
	Activités contre la cellule-hôte transport de protéases (gp63, phosphatases, kinases, avant ou pendant l'infection inhibition de la translocation de facteurs de transcription (NF-kB, STAT1, AP-1)	
LACK	<i>L. infantum, L. mexicana</i>	
	Activités potentielles sur la cellule-hôte interaction avec des protéines de la synthèse d'ADN ou d'ARN interaction avec le plasminogène pour favoriser le cheminement du parasite pendant l'infection	

Tableau 2 Les facteurs de virulence du parasite Leishmania

E. COMPARAISON AU NIVEAU GENOMIQUE AVEC *T. CRUZI* ET *BRUCEI*

Les parasites *Leishmania* et les parasites *Trypanosoma* font tous les deux partie des *Kinéoplastidae Trypanosomatidae*. Le séquençage du génome des parasites *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* et *Trypanosoma brucei* a été publié en même temps (Ivens et al, 2005 ; El-Sayed et al, 2005a ; Berriman et al, 2005). Ces trois parasites présentent des caractéristiques morphologiques similaires, avec notamment un flagelle et un kinéoplaste. Cependant, ils sont très différents par leur cycle, leur vecteurs et leur pathogénèse. En effet, *Trypanosoma cruzi* est l'agent de la maladie de Chagas et transmis par l'intermédiaire de punaises. Le parasite *Trypanosoma brucei* est l'agent de la maladie du sommeil, transmis par des piqûres de la mouche tsé-tsé.

L'étude comparative de leur génome a révélé que ces trois parasites présentent de nombreux gènes orthologues. Entre les génomes de *Leishmania* et *Trypanosoma brucei*, il existe environ 70% de synténie entre leurs gènes, qui conservent ainsi le même ordre et un même environnement génomique. Ce fait illustre aussi le partage d'un ancêtre commun (El-Sayed et al, 2005b). En effet, l'analyse de leur protéome et l'alignement en acides aminés des protéines orthologues révèle 57% d'identité entre *T. cruzi* et *T. brucei*. Entre *L. major* et les deux trypanosomes cependant, l'identité n'est que de 44%. Au cours de l'évolution, le parasite *Leishmania* a en fait rapidement divergé de ce groupe de parasites. Les protéines spécifiques pour le parasite *L. major* ne représentent ainsi que 12% du protéome total alors qu'elles s'élèvent à 26% et 32% pour *T. brucei* pour *T. cruzi* respectivement, montrant leur spéciation plus tardive.

A l'instar du *L. major*, les génomes des parasites *T. cruzi* et *brucei* portent aussi des bases J. Elles sont retrouvées dans les télomères pour 50% d'entre eux pour *T. brucei* (van Leeuwen et al, 1996) et 75% pour *T. cruzi* (Ekanayake et al, 2007). Le pourcentage de base J dépendant du parasite et du stade du parasite, l'ADN de *T. brucei* ne présente des bases J que dans l'insecte (Borst & Sabatini, 2008), alors que les parasites *T. cruzi* et *Leishmania* en présentent aussi bien dans l'insecte que chez l'hôte.

Les génomes de *Trypanosoma cruzi* et *brucei* ont aussi un contenu important en GC (respectivement de 51% et 47%) et des séquences de rétro-transposons. Ces séquences, telles que les VIPER, sont relatives à d'autres rétro-transposons, désignés *ingi* et L1Tc, et sont différentes de celles retrouvées chez les parasites *Leishmania* (Lorenzi et al, 2006). Contrairement à *Leishmania*, chez *Trypanosoma cruzi*, les composants actifs des éléments mobiles ont été conservés (Heras et al, 2007). De plus, il a été décrit que le génome de *T. cruzi* est constitué à 50% de séquences répétées (codantes ou non codantes) (El-Sayed et al, 2005). Cependant, aussi bien les parasites *Leishmania* que les parasites *T. cruzi* peuvent présenter des variations du nombre de gènes ou de ploïdie des chromosomes (Rogers et al, 2011 ; Minning et al, 2011).

II- ETUDE DE L'INFECTION PAR LE PARASITE *LEISHMANIA*

A. DIFFERENCES INTER-SPECIFIQUES ET INTRA-SPECIFIQUES DU PARASITE

La réponse immunitaire à l'infection par un parasite *Leishmania* varie selon le parasite étudié. Parmi les parasites *L. donovani*, *L. infantum* et *L. major*, les deux premiers causent la leishmaniose viscérale et le dernier, la leishmaniose cutanée. Le parasite *L. viannia* peut causer aussi bien des leishmanioses cutanées que muco-cutanées surtout en Amérique Centrale et Amérique du Sud. Peu d'études ont pu être menées à son sujet (McMahon-Pratt & Alexander, 2004).

Différentes souches d'une même espèce de parasite (ex. souche Friedlin ou souche Neal LV39 pour le *L. major*) peuvent provoquer des réponses immunitaires différentes chez des souris de même souche. En effet, les souris C57BL/6 sont résistantes aux souches LV39 et Friedlin de *L. major* mais sensibles à la souche Seidman du *L. major* (Anderson et al, 2005). Ceci pourrait être dû à une expression/composition différente des facteurs de virulence (tels que le LPG, l'antigène LACK...) (Hondowicz & Scott, 1999).

Outre le facteur génétique du parasite, il a été récemment démontré pour des parasites *Leishmania viannia* que d'autres facteurs pouvaient jouer sur son infectivité et l'inflammation qu'il induit. En effet, la présence d'un virus chez un *Leishmania vianna* a été rapportée pour la première fois en 1988 par Tarr et al. Il s'agit d'un virus à ARN double brin d'environ 6000 nucléotides, protégé par une particule icosaédrique de 30-40 nm de diamètre et nécessitant l'activité d'une ARN polymérase ARN-dépendante. Ces caractéristiques sont partagées avec d'autres virus à ARN double brin d'organismes eucaryotes et cela les classifie chez les *Totiviridae*, dans la taxonomie des virus. Depuis leur découverte, différentes souches virales ont été isolées, et certaines ont été séquencées. Récemment, Ives et al (Ives et al, 2011) ont étudié des parasites *Leishmania vianna* causant des lésions cutanées dans un premier temps, et pouvant parfois conduire à des complications et causer des lésions muco-cutanées quelques mois plus tard. Ils ont découvert que les parasites qui sont à l'origine de ces complications sont infectés par des LRV1 (*Leishmania RNA Virus 1*). Les parasites infectés par le LRV1 et les parasites non infectés modulent différemment la réponse des macrophages. En effet, les parasites infectés induisent les macrophages à produire plus de cytokines IL-6 et TNF α que les parasites non infectés. Par ailleurs, les parasites infectés survivent mieux dans les phagolysosomes des macrophages et sont moins sensibles aux ROS et au NO. Ils sont aussi capables d'induire une signalisation TLR3 et une production d'IFN β en raison de la présence

d'ARN viral, contrairement aux parasites non infectés. En conclusion, l'infection virale du parasite peut donc augmenter la gravité de l'infection qu'il pourra causer.

B. MODELES EXPERIMENTAUX

Un des modèles pour étudier l'infection par *Leishmania major* est l'injection sous-cutanée d'un nombre élevé de parasites promastigotes métacycliques (10^5 à 10^7) dans les pattes, conduisant au gonflement des coussinets plantaires et des ganglions poplités. Cette lésion est corrélée à l'augmentation de la charge parasitaire au site d'injection. Au cours de l'infection chez les souris C57BL/6, on observe un pic de l'inflammation dans les 3 à 4 premières semaines, avant une réduction progressive de la taille des coussinets plantaires, associé à une diminution de la charge parasitaire et de la guérison de la souris. On peut ainsi suivre l'infection pendant 5-7 semaines. Un autre modèle a été mis en place pour mimer la transmission naturelle du parasite *Leishmania* par son vecteur, en faisant chez la souris une injection sous-cutanée intradermale au niveau de l'oreille et avec un nombre réduit de parasites infectieux (100 promastigotes métacycliques) (Belkaid et al, 2000). La réduction de la dose infectante a permis de discerner différentes phases d'infection, avec un décalage de la réponse. En effet, dans la 1^e phase durant les 4-5 premières semaines, il n'y a pas de lésion. Les lésions sont observées dans la 2^e phase et corrélées avec le recrutement de cellules immunitaires (neutrophiles, macrophages,...) sur le site des lésions, ainsi qu'une production d'IL-12 et d'IFN γ .

Outre les voies sous-cutanées et intradermique, d'autres voies d'inoculation sont possibles : intraveineuse, intrapéritonéale ou par une voie d'infection plus naturelle par le vecteur lui-même, la mouche des sables.

La réponse immunitaire à l'infection par un parasite *Leishmania* varie selon le modèle animal étudié. Ainsi, dans le modèle murin infecté par *L. major*, une réponse immunitaire dichotomique a été décrite. Chez les souris C57BL/6, C3H et CBA résistantes à l'infection, il y a la mise en place d'une réponse Th1 et la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ sécrétrices d'IFN γ . Ces souris peuvent développer des lésions mais elles guérissent en quelques semaines. Au contraire, les souris BALB/c et DBA/2, sensibles, élaborent une réponse de type Th2 et meurent de la leishmaniose, avec une multiplication des parasites et une amplification de l'inflammation aussi bien dans la peau que dans les ganglions.

En comparant des souris C57BL/6 et des souris BALB/C infectées dans les pattes, il s'avère que les souris C57BL/6 présentent une surexpression d'IFN γ dans la rate dès la 3^e semaine d'infection jusqu'à la 8^e semaine alors que chez les BALB/c, cette surexpression n'a lieu qu'entre la 4^e et 6^e semaine post-infection (Heinzel et al, 1989). Dans le même temps, de la 4^e à la 8^e semaine, les souris BALB/c expriment de l'IL-4 et ont un fort taux d'IgE dans le sérum, contrairement aux souris C57BL/6 chez qui les taux sont faibles. Un traitement avec des anticorps anti-IL4 ralentit de manière significative le cours de l'infection.

Par la suite, un rôle pivot de l'IFN γ a été démontré en augmentant la sensibilité de souris résistantes C3H/HeN par des anticorps anti-IFN γ ou en augmentant la résistance des souris BALB/c sensibles par une injection d'IFN γ (Scott, 1991). Or, la sécrétion d'IFN γ et la mise en place d'une réponse de type Th1 nécessitent un rôle majeur de l'IL-12 (Sypek et al, 1993). En effet, chez des souris BALB/c traitées avec des injections régulières d'IL-12, le cours de l'infection par le *Leishmania major* est retardée et la sécrétion d'IFN γ par les cellules isolées des ganglions lymphatiques est augmentée, alors que celle d'IL-4 réduite.

Dans des souris C57BL/6 infectées dans l'oreille, l'IL-12 n'est produite qu'à partir de la 4^e semaine post-infection, avec un pic en 6^e semaine, alors que l'IL-4 est produit de manière importante dès la première semaine (Belkaid et al, 2000). Durant les 4 premières semaines post-infection, ni les souris déficientes pour l'IL-12, ni celles pour l'IFN γ ou l'IL-4 ne présentent de lésions importantes au niveau des oreilles. Cependant, seules celles déficientes pour l'IL-12 ou pour l'IFN γ ne réussissent pas à guérir leurs lésions. Cela suggère que les 4 premières semaines post-infection, les réponses IL-12 et IFN γ sont inhibées par le parasite *Leishmania* (Reiner et al, 1994 ; Belkaid et al, 1998). En outre, si les souris déficientes pour l'IL-12 sont traitées dès le début de l'infection avec des injections d'IL-12, la résistance des souris est restaurée. A l'opposé, la production d'IL-4 en réponse au parasite *Leishmania major* est induite dès le départ, aussi bien dans les souris C57BL/6 que BALB/c (Reiner et al, 1994). Cela suggère donc l'existence d'une réponse IL-4 précoce dans ces deux types de souris, mais qui est transitoire chez C57BL/6 alors qu'elle persiste chez BALB/c. L'existence de ces deux modèles expérimentaux a ainsi permis d'étudier les mécanismes de résistance ou de sensibilité de la souris à *Leishmania major*.

Chez l'homme, la polarisation Th en réponse au *L. major* n'est pas observée, contrairement à ce qui est décrit chez les souris, suggérant que les conclusions obtenues avec les souris

BALB/c et C57BL/6 doivent être considérées avec prudence avant de les extrapoler à l'Homme. En effet, la réponse au parasite *Leishmania* chez l'homme se caractérise par la production simultanée de cytokines Th1 et Th2, aussi bien chez les patients atteints de leishmaniose viscérale que cutanée.

En utilisant plusieurs types de souris consanguines, issues de souris sauvages d'origines géographiques différentes, l'équipe de Cazenave a mis en évidence la lignée de souris PWK (Babay et al, 2004), qui présente des caractéristiques d'infection semblables à l'infection chez l'homme. En effet, cette espèce infectée par le *L. major*, qui présente des lésions cutanées de nombre et de sévérité variables, développe une réponse intermédiaire Th1/Th2, entre celles des souris BALB/C et C57BL/6.

D'autres modèles animaux peuvent contribuer à l'étude du parasite *Leishmania*, notamment le hamster doré de Syrie et le chien qui sont d'excellents modèles d'étude pour la leishmaniose viscérale. Il existe aussi des études sur les singes, en particulier pour l'élaboration d'un vaccin.

C. ROLE DE L'ENVIRONNEMENT AU MOMENT DE L'INFECTION

Outre l'importance du parasite et de l'hôte lui-même dans l'infection par le *Leishmania*, une autre publication rapporte aussi le rôle de la flore microbienne de la peau sur l'immunité locale (Naik et al, 2012). Les auteurs ont ainsi comparé des souris SPF (sans pathogène spécifique) ou des souris GF (sans pathogène) et observé qu'après infection par le *Leishmania major*, les souris GF présentaient des lésions de taille moins importante et une production réduite d'IFN γ et de TNF α par les lymphocytes T CD4⁺ cutanés, par rapport aux souris SPF. Or, en permettant aux souris GF de retrouver une flore bactérienne constituée d'un type unique de bactéries (*Staphylococcus epidermis*), les lésions étaient de nouveau importantes et la protection immunitaire restaurée, avec une réponse IFN γ , l'activation de la signalisation IL-1 et la production d'IL-17A. Cela démontre l'implication de la présence bactérienne dans la pathogenèse de l'infection par le *Leishmania*.

III- ELEMENTS DE LA REPOSE IMMUNITAIRE AU PARASITE *LEISHMANIA MAJOR*

Des éléments du parasite *Leishmania* peuvent être reconnus

- soit par l'intermédiaire de molécules qui se fixent sur le parasite et sont ensuite reconnues par un récepteur de l'hôte.
- soit directement par un récepteur de l'hôte.

Le terme PRR (Pattern Recognition Receptor) regroupe ces deux types de senseurs. Ce sont des molécules de l'immunité innée, responsables de la reconnaissance par des cellules présentatrices d'antigènes, de motifs PAMP (Pathogen Associated Microbial Pattern) retrouvés sur les corps étrangers à l'hôte (Janeway & Medzhitov, 2002 ; Gordon, 2002). Les motifs PAMPs reconnus sont des caractéristiques des pathogènes, permettant ainsi une réponse spécifique contre les pathogènes. Les PRR peuvent reconnaître toute une variété de ligands (protéines, glucides, lipides, acides nucléiques) aussi bien de corps étrangers que de l'hôte. En effet, ces ligands peuvent provenir de pathogènes ou correspondre à des résidus issus de cellules sénescents, apoptotiques ou nécrotiques. Il existe aussi des mécanismes pour éviter les réponses inflammatoires contre les molécules du soi et auto-immunitaires.

Parmi les PRR reconnaissant le parasite *Leishmania*, on distingue :

A. les molécules du complément

B. les récepteurs impliqués dans l'internalisation du parasite dans les macrophages:

- de manière indirecte avec 1) les récepteurs CR1 et CR3 liant des molécules du complément ou 2) les récepteurs Fcγ liant des anticorps fixés au parasite.
- ou de manière directe avec 3) les récepteurs du mannose-fucose (C-lectine) ou 4) les récepteurs de fibronectine qui reconnaissent le LPG ou la gp63 à la surface du parasite.

C. des récepteurs sur la membrane cellulaire ou intracellulaire, les TLR.

D. les récepteurs dont l'implication a été décrite mais faiblement étudiée comme la C-lectine DC-SIGN ou les scavenger récepteurs tels que MARCO, SR-A et CD36.

A. RENCONTRE AVEC LE COMPLEMENT

Lorsque les *Leishmania* promastigotes sont injectés par le vecteur dans l'organisme de l'hôte, ils sont en contact avec des molécules du sérum, sensibles à la chaleur, qui appartiennent au système du complément.

Deux voies du complément ont été décrites comme impliquées dans la réponse au parasite *Leishmania* : la voie classique et la voie alternative. La voie classique fait suite à la liaison du pathogène par des anticorps et fait intervenir les molécules C1, C2 et C4 et les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} pour leur stabilité et leur activité. Ces éléments ne participent pas à la voie alternative. Mais les deux voies se rejoignent lors de l'activation de la molécule C3, dont la lyse par la C3-convertase aboutit à la production de la molécule C3b. Celle-ci provoque le clivage de C5 et la production de la molécule C5b, ce dernier participant à l'assemblage du complexe d'attaque membranaire (MAC), d'activité lytique. D'autres peptides issus du clivage de C3 et C5, les molécules C3a et C5a, ont des propriétés chemo-attractantes pour des cellules immunitaires comme les macrophages (Mosser & Brittingham, 1997).

En effet, dans la réponse au parasite *Leishmania*, il a été démontré que le parasite *L. major* est sensible à la lyse par des sérums sans les facteurs C2 ou C4, suggérant l'implication de la voie alterne du complément (Mosser & Edelson, 1984). Cette observation a été par la suite étendue par les mêmes auteurs à d'autres parasites *L. mexicana*, *L. amazonensis* et *L. braziliensis*. D'autres travaux ont montré en revanche que les parasites *L. major* et *L. donovani* nécessitent la présence de la molécule C2 et des ions Mg^{2+} , suggérant l'implication de la voie classique du complément. Mais le stade du parasite pourrait jouer un rôle (Pearson & Steigbigel, 1980 ; Puentes et al, 1988).

Le parasite *Leishmania* n'induit donc pas une voie du complément définie. D'autres protéines peuvent se lier aux parasites *Leishmania* promastigotes (Mosser & Brittingham, 1997):

- la C-reactive protein (CRP), très élevée lors de l'inflammation, est capable d'interagir avec des fragments de la molécule C1 de la voie classique.
- les mannan-binding protein (MBP), qui interagissent avec les mannoses et les N-acétylglucosamines et qui sont à l'origine d'une 3^e voie du complément : la voie des lectines. Celle-ci rejoint les deux autres voies du complément par l'activation de la molécule C3.

Ces molécules du complément ont la capacité de se lier sur les deux protéines les plus abondantes de la surface du parasite *Leishmania*, le gp63 et le lipophosphoglycan LPG. Les formes métacycliques infectieuses du parasite sont plus résistantes au complément que les formes procycliques. Cette résistance tiendrait du fait que la longueur du LPG est plus importante dans la forme métacyclique que dans la forme procyclique, ce qui empêche la formation du complexe MAC de lyse cellulaire (Puentes et al, 1990). Quant à la gp63, elle permet la résistance au complément par son activité de clivage de la molécule C3b en sa forme inactive l'iC3b (Brittingham et al, 1995). En effet, la molécule iC3b peut se lier au MAC et inhiber son activité de lyse. Le parasite possède aussi des protéines kinases capables de phosphoryler les protéines du système du complément, ce qui inhiberait la cascade du complément (Hermoso et al, 1991).

B. LES RECEPTEURS IMPLIQUES DANS L'INTERNALISATION DU *LEISHMANIA*

1. Les récepteurs du complément (CR1 et CR3)

Les récepteurs du complément CR1 et CR3 (ou Mac-1), présents à la surface des neutrophiles et des cellules phagocytaires comme les macrophages, peuvent contribuer à l'internalisation du parasite *Leishmania*. Ils se lient respectivement aux composants du complément C3b et iC3b. Ces derniers sont eux-mêmes capables de fixer les molécules de surface LPG et gp63, présents à la surface des parasites procycliques ou métacycliques, pour leur opsonisation (DaSilva et al, 1989). En effet, pour la gp63, il a été démontré qu'elle interagit avec le C3b et réalise sa conversion en iC3b, ligand du récepteur CR3 (Mosser et al, 1985).

Le CR3 est un hétérodimère constitué de CD11b et CD18. Il semble que ce soit le récepteur CR3 qui permette l'interaction la plus ferme entre le macrophage et le parasite, la liaison avec le CR1 étant plus transitoire de part le clivage du C3b.

L'implication du CR3 a été démontrée dans l'entrée de nombreux pathogènes. Son activation permet une production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) par les macrophages (DaSilva et al, JEM, 1989) mais aussi une diminution de la signalisation par l'IFN γ et une baisse de production d'IL-12 dans les monocytes (Marth & Kelsall, 1997).

Le récepteur CR3 seul ne semble pas induire la phagocytose du parasite, puisque iC3b seule ne conduit ni à l'internalisation du parasite ni à la synthèse de ROS. Elle doit être

accompagnée de la fixation d'IgG ou de fibronectine et requiert la coopération avec d'autres récepteurs (Wright & Silverstein, 1983).

De même, CR1 contribue aussi à l'activation du CR3 en permettant la synthèse du ligand de CR3 (Rosenthal et al, 1996). En effet, lorsque le CR1 se lie à son ligand le C3b, il lie aussi un facteur du complément (le facteur I) qui est capable de convertir C3b en iC3b. La présence des éléments du complément et la coopération entre CR1 et CR3 sont essentielles pour la liaison du parasite sur les cellules phagocytaires.

2. Le récepteur Fc γ (Fc γ R)

Le rôle d'un autre type de récepteurs, les Fc γ R (Fc γ receptor), a aussi été décrit dans l'infection par des promastigotes et amastigotes de *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania mexicana*, notamment pour les cellules dendritiques. Ce sont des récepteurs situés sur les cellules phagocytaires qui peuvent lier la portion Fc des anticorps et permettre l'opsonisation d'antigènes.

En absence du Fc γ R, des souris infectées par *L. amazonensis* ou *L. mexicana* présentent peu, voire pas de lésions, et produisent plus d'IFN γ (Kima et al, 2000). Ainsi ces récepteurs Fc γ R auraient un rôle négatif rendant les souris sensibles à l'infection par des parasites *Leishmania*. D'un autre côté, la liaison via le récepteur Fc γ R conduit aussi à l'expression d'IL-10, ce qui réduit la production d'IL-12, rend les macrophages infectés insensibles à l'activation par l'IFN γ et permet la survie et la réplication du parasite (Kane & Mosser, 2001 ; Thomas et Buxbaum, 2008).

Dans les cellules dendritiques, l'infection par *L. major* nécessite des IgG contre le parasite et les récepteurs Fc γ RI et Fc γ RIII (Woelbing et al, 2006). Les souris déficientes en lymphocytes B ou en récepteurs Fc γ R présentent une plus grande sensibilité en taille des lésions et charges parasitaires, une diminution de cellules dendritiques infectées, un recrutement altéré des lymphocytes T et une réduction de la production d'IFN γ . Le recrutement de DCs sur le site de l'infection coïncide de plus avec l'apparition des anticorps dans le sérum des souris C57BL/6 infectées. Pour l'infection par *L. major*, ce récepteur aurait donc un rôle protecteur.

Ainsi, selon l'espèce concernée du parasite *Leishmania* et la cellule-hôte, la contribution de ce récepteur reste controversée. D'autres récepteurs pourraient intervenir dans les cellules dendritiques, car même en l'absence d'anticorps, les parasites *L. amazonensis* peuvent être internalisés (Prina et al, 2004).

3. Le récepteur du mannose-fucose (MFR)

D'autres récepteurs, comme le MFR (Mannose-Fucose Receptor), peuvent aussi être impliqués (Blackwell et al, 1985). Les résidus glycoconjugués sont présents de manière importante sur les molécules de surface des parasites *Leishmania*. Le récepteur MFR est une lectine de type C que l'on retrouve sur des cellules phagocytaires comme les macrophages ou les cellules dendritiques myéloïdes. Des données contradictoires ont été publiées à son sujet. En effet, aucun effet additif ou de coopération n'a été observé entre CR3 et MFR sur les macrophages murins (Blackwell et al, 1985) alors qu'une coopération entre ces deux récepteurs a été observée dans des macrophages humains (Wilson and Pearson, 1988). Par ailleurs, des souris C57BL/6 déficientes pour le récepteur MFR infectées par le parasite *Leishmania donovani* ont des tailles de lésion, des charges parasitaires et une réponse cytokine analogue aux souris non mutées (Akilov et al, 2007), suggérant finalement un rôle secondaire du MFR. L'importance du récepteur MFR pourrait être liée à des stades différents du parasite. En effet, alors que des parasites de stades différents (mélange de parasites isolés dans la phase de croissance exponentielle et dans la phase stationnaire) co-localisent avec le récepteur CR3, seuls les parasites non métacycliques (isolés dans la phase de croissance exponentielle) co-localisent avec le récepteur MFR (Ueno et al, 2009).

4. Le récepteur de la fibronectine (FnR)

Comme le MFR, le rôle des Fibronectin Receptor (FnR) a aussi été démontré mais peu étudié. Les FnR les plus abondants sont des membres de la famille des intégrines et sont exprimés par un grand nombre de types cellulaires dont les macrophages et les lymphocytes (Brittingham et al, 1999). Les premiers travaux ont montré que la fibronectine peut se lier aux promastigotes *Leishmania amazonensis* et cette association augmente l'attachement du parasite à des monocytes humains (Wyler et al, 1985). De plus, cette interaction n'est pas essentielle vu que l'infectivité des parasites n'est pas modifiée en absence de fibronectine. Cependant, FnR peut coopérer avec les récepteurs CR1 et CR3 et faciliter l'internalisation d'érythrocytes liées à C3b et C3bi (Wright et al, 1983). Par la suite, il a été démontré que la molécule à la surface du parasite pouvant directement lier le FnR humain a4/b1 est le gp63 (Brittingham et al, 1999).

5. Autres récepteurs

L'implication du récepteur DC-SIGN, une lectine de surface de type C reconnaissant des résidus de sucres, a surtout été étudiée par l'équipe de Rivas qui a tour à tour montré que les parasites *L. mexicana pifanoi*, *L. infantum* et *L. donovani* amastigotes, ainsi que le parasite *L. major* dans une moindre mesure, peuvent se lier aux cellules dendritiques par l'intermédiaire du DC-SIGN, vu qu'un anticorps anti-DC-SIGN réduit leur fixation (Colmenares et al, 2002 ; Colmenares et al, 2004). Par des parasites *L. donovani* n'exprimant pas le LPG, riche en résidus mannose, ils ont aussi démontré que le LPG n'est pas l'élément du parasite se liant au DC-SIGN. D'autres molécules de surface qui deviennent accessibles pour les parasites amastigotes, telles que la gp63, pourraient se fixer au DC-SIGN. Des études complémentaires doivent être réalisées pour mieux définir l'interaction *Leishmania*-DC-SIGN et la réponse cellulaire qui suit.

Par ailleurs, l'implication de récepteurs scavenger a aussi été rapportée dans l'infection par le parasite *Leishmania*. Ces récepteurs sont des glycoprotéines transmembranaires exprimés de manière constitutive par les macrophages. Dans les souris CBA/J, l'infection par *L. major* induit l'augmentation de l'expression du récepteur MARCO *in vitro* dans les macrophages péritonéaux et *in vivo* dans la rate et les ganglions lymphatiques (Gomes et al, 2009). Cependant, l'implication de ce récepteur dépend de la souche du parasite, puisqu'il intervient en réponse au *Leishmania major* mais non au *Leishmania amazonensis* (Gomes et al, 2009).

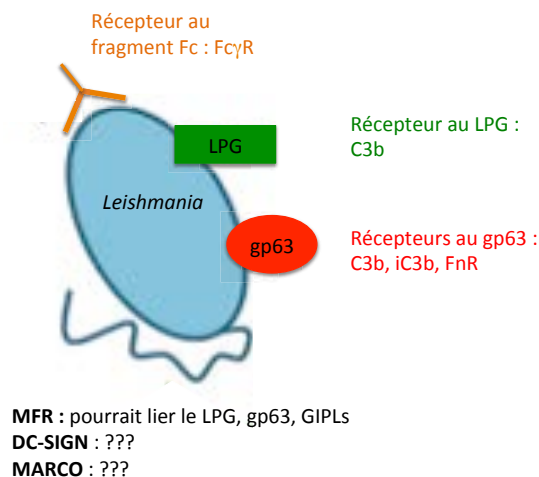


Figure 3 Les récepteurs impliqués dans l'internalisation du parasite *Leishmania*

C. LES TOLL-LIKE RECEPTORS (TLRs)

1. Généralités sur les TLRs

Les TLR sont des récepteurs de l'immunité innée qui sont exprimés par les cellules immunitaires telles que les neutrophiles, monocytes, macrophages, cellules dendritiques, cellules NK, lymphocytes B et T, mais aussi par les cellules endothéliales, épithéliales, pancréatiques (O'Neill et al, 2013). Certains TLRs sont impliqués dans l'infection par *Leishmania*.

On compte 10 TLRs fonctionnels (TLR 1 au TLR10) chez l'homme et 12 chez la souris (TLR 1 à TLR9, puis les TLR 11, 12 et 13). Les TLR 1 à 9 ont une fonction conservée entre les souris et les hommes. Le TLR 10 n'est fonctionnel que chez l'homme et seule la souris possède les TLR 11, 12 et 13. En réalité, il existe un gène putatif pour le TLR 11 chez l'homme mais la présence de plusieurs codons stop dans la séquence codante corrèle avec son absence d'expression (Zhang et al, 2004). On distingue les TLRs

- situés dans la membrane plasmique : TLR 1, 2, 4, 5, 6.
- intracellulaires : TLR 3, 7, 8, 9 et plus récemment les TLR 11, 12, 13, qui font tous intervenir la protéine UNC93B1 pour leur transport du réticulum aux endosomes/lysosomes, où ils sont localisés. Le TLR4 a aussi été décrit au niveau intracellulaire.

La localisation du TLR 10 n'est pas encore clairement définie.

Les TLR reconnaissent des motifs associés à des pathogènes, les PAMPs (Pathogen Associated-Microbial Patterns) qui peuvent correspondre à des molécules de surface (peptides, lipides, glucides) ou à des acides nucléiques.

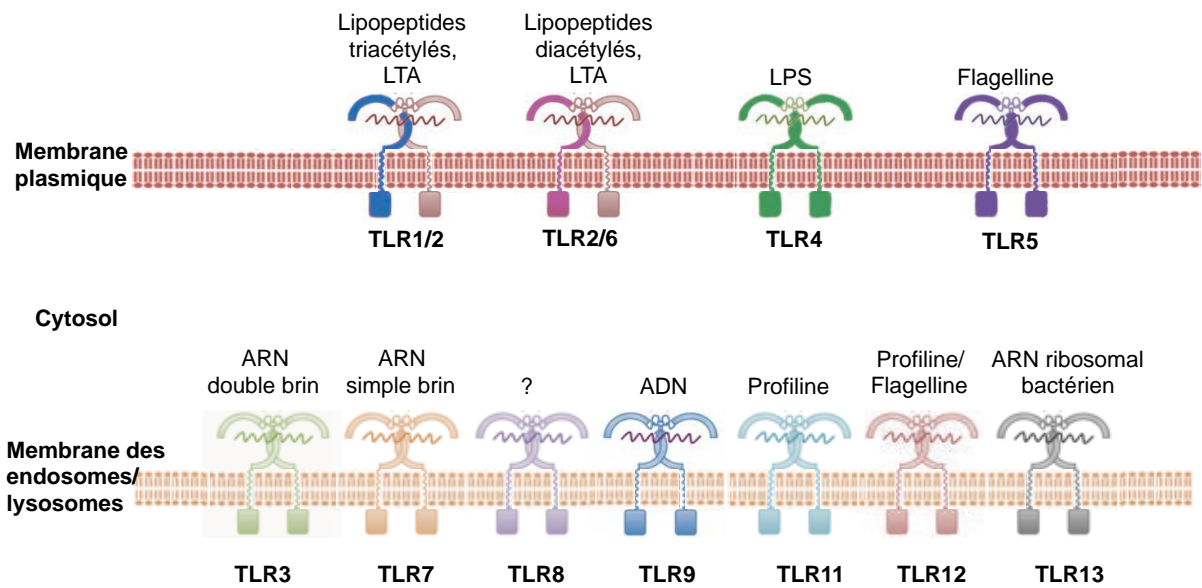


Figure 4 Les TLR murins, leur localisation et leurs ligands

Les TLRs sont des protéines transmembranaires qui ont une partie N-terminale et C-terminale extracellulaire ou luminale, avec des régions riches en répétitions de leucines (LRR, Leucine Rich Repeat), impliquées dans la reconnaissance du ligand (Park et al, 2008 ; Onji et al, 2013), et une partie cytoplasmique avec un domaine TIR (Toll/IL-1R), conservé entre les récepteurs TLR et le récepteur de l'IL-1 (IL-1R). Le domaine TIR permet au TLR d'interagir avec différentes protéines adaptatrices pour induire l'expression d'interféron de type 1 (IFN α et IFN β) par la voie des IRF (Interferon-Regulatory Factor) et de cytokines pro-inflammatoires par la voie de NF-kB, MAPK et AP-1 (IL-12, IL-6, TNF α).

Milieu extracellulaire ou intra-endosomale

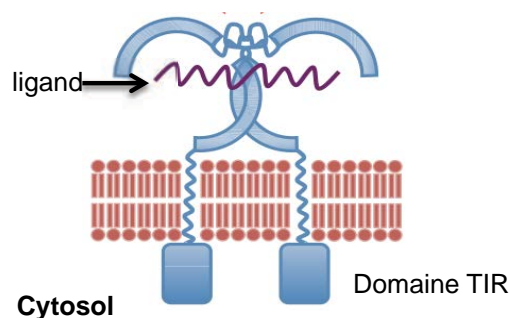


Figure 5 Structure d'un TLR (Adapté de Descamps et Manoury, 2013)

En outre, ce domaine TIR contient aussi un site permettant au TLR de former des homo- ou des hétéro- dimères. La majorité des TLR s'homo-dimérise mais il existe les dimères TLR

2/TLR 1 ou TLR2/TLR 6 (Ozinsky et al, 2000) ou chez la souris, le TLR 11 peut s'associer avec le TLR 12 (Andrade et al, 2013).

2. Signalisation des TLRs

Après reconnaissance de son ligand, le TLR change de conformation et recrute, via son domaine TIR, des protéines adaptatrices différentes, MyD88 ou TRIF, selon le TLR engagé. Tous les TLR signalent via la protéine adaptatrice MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88), à l'exception du TLR3 qui signale exclusivement avec la protéine adaptatrice TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β). Le TLR4 peut utiliser les deux protéines adaptatrices pour sa signalisation.

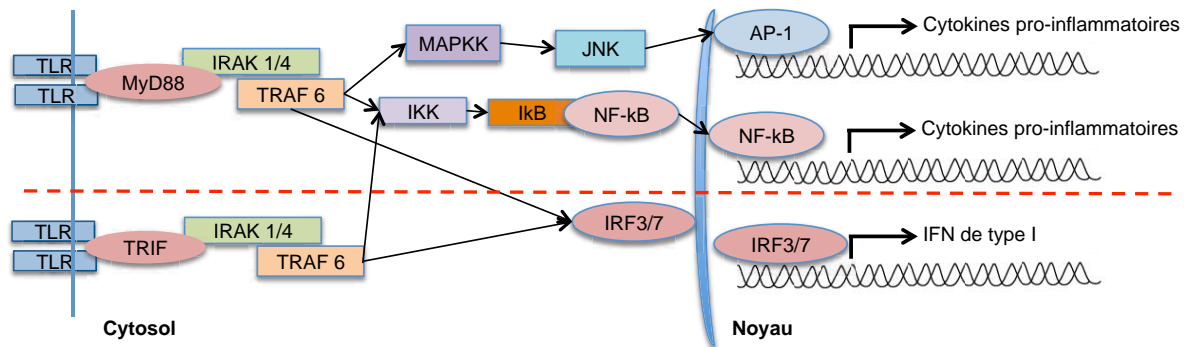


Figure 6 Signalisation des TLR selon la voie MyD88 ou la voie TRIF

i. Signalisation via MYD88

La liaison TLR-MyD88 permet l'interaction du MyD88 avec IRAK4 et le recrutement du complexe (IRAK1, IRAK4, IRAK2 et TRAF6).

IRAK1 peut alors interagir avec MyD88 et est phosphorylé par IRAK4. IRAK1 phosphorylé peut interagir avec TRAF6 ou TRAF3 et le complexe formé se dissocie du TLR.

L'interaction avec TRAF6 conduit à l'activation du complexe (TAK1, TAB2 et TAB3). TAK1 activé, phosphoryle le complexe (IKK α , IKK β et NEMO/IKK γ) ou des MAP kinases comme JNK. L'activation du complexe IKK permet la dissociation de I κ B et de NF- κ B alors que JNK induit l'activation de AP-1. Les facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B peuvent alors induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires.

L'interaction avec TRAF3 conduit à l'activation et la translocation des facteurs de transcription IRF3 ou IRF7, respectivement par l'intermédiaire du complexe (TBK1 et IKK ϵ) et d'IKK α . IRF3 et IRF7 permettront la synthèse d'interférons de type 1 (IFN α et IFN β).

ii. Signalisation via TRIF

La signalisation via TRIF ne concerne que les TLR 3 et TLR4. L'interaction entre le TLR et TRIF permet l'interaction de TRIF avec un complexe comprenant notamment TRAF6 et TBK1. L'activation de TRAF6 aboutit à l'induction de la voie NF- κ B et celle de TBK1 à l'induction d'IRF3. Comme la signalisation via MyD88, ces deux voies conduisent à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons de type 1.

3. TLR et *Leishmania*

L'étude du rôle des TLR dans l'infection par le *Leishmania* a débuté par l'observation de l'implication de la signalisation MyD88 en réponse au parasite. En effet, le parasite *Leishmania major* active les macrophages péritonéaux d'une manière MyD88-dépendante, en induisant l'expression d'IL-1 α et la voie NF- κ B (Hawn et al, 2002). Cependant, malgré l'activation de l'expression d'IL-1 α , les auteurs n'ont observé aucune forme sécrétée de cette cytokine, suggérant que le parasite *Leishmania* pourrait donc bloquer la sécrétion d'IL-1 pour minimiser la réponse à son encounter.

Les souris C57BL/6 déficientes pour MyD88 présentent de plus des lésions plus importantes, perdent leur résistance à l'infection par le *Leishmania major* et ne peuvent plus développer une réponse Th1 médiée par la cytokine IL-12. Elles font au contraire une réponse Th2 comme les souris BALB/c, avec des niveaux importants d'IL-4 dans leur plasma (Muraille et al, 2003). L'infection de souris C57BL/6 et BALB/c par les parasites *L. donovani*, *L. braziliensis* et *L. major* induisent aussi, de manière MyD88-dépendante, la maturation des DCs, en augmentant leur expression de CD40, CD80, CD86 et de CMH de classe II, alors que la capacité de migration des DCs reste indépendante de MyD88 (De Trez, 2004). La voie MyD88 étant utilisée par le récepteur à l'IL-1 et par tous les TLRs en général, à l'exception du TLR3, les chercheurs ont donc cherché l'implication d'un TLR.

Le premier TLR identifié dans la réponse au *Leishmania* a alors été le TLR2. *In vitro* le LPG purifié peut induire la voie NF- κ B et la synthèse de TNF α par l'activation du TLR2 dans les macrophages de souris C57BL/6 et dans des lignées cellulaires transfectées de macrophages RAW (de Veer et al, 2003). Cette réponse cellulaire est dépendante du constituant lipidique du LPG (de Veer et al, 2003). L'incubation de LPG purifié avec des cellules NK humaines

augmente aussi l'expression du TLR2, induit la translocation du NF- κ B dans le noyau et leur production de TNF α et d'IFN γ (Becker et al, 2003). De même, l'incubation de LPG purifié avec des PBMCs induit la production de ROS et de NO par ces derniers (Kavoosi et al, 2009 ; Kavoosi et al, 2010). Plus tard, un autre ligand a été décrit pour le TLR2 : la protéine SIR2RP1. Purifiée du *L. major* et *L. infantum*, elle a des capacités d'activation cellulaire TLR2-dépendante. Cette protéine est une déacétylase et compte des protéines homologues dans de nombreux organismes eucaryotes (comme l'homme) et procaryotes (comme les bactéries). Ainsi, la protéine SIR2RP1 induit une augmentation de l'expression des TLR2, TLR6, MyD88 et NF- κ B dans les lymphocytes B, ainsi que la maturation et l'activation des lymphocytes B et des DCs (Silvestre et al, 2009).

De plus, le rôle du TLR2 n'est pas forcément protecteur contre le parasite *Leishmania*, notamment pour les parasites du Nouveau Monde. Dans l'infection par les parasites *L. braziliensis*, les souris déficientes pour MyD88 restent plus sensibles à l'infection mais celles déficientes pour le TLR2 sont plus résistantes. Les DCs de souris déficientes pour le TLR2 sont en effet plus activées, produisent plus d'IL-12 et recrutent plus de lymphocytes T produisant de l'IFN γ (Vargas-Inchaustegui et al, 2009). De même, les souris déficientes pour le TLR2 sont aussi plus résistantes au parasite *L. amazonensis*. L'activation du TLR2 induit en effet l'activation de la protéine kinase R (PKR) et la production d'IFN de type 1, tous les deux induisant la superoxyde dismutase – 1 (SOD-1). Cette dernière a pour substrat les produits dérivés de l'oxygène (ROS), un des facteurs contribuant à la lutte contre le parasite *Leishmania*, et contribue à leur élimination. Ainsi, l'activation du TLR2 favorise l'établissement de l'infection par le parasite *L. amazonensis* (Carvalho Vivarini et al, 2011).

D'autres TLRs, autres que le TLR2, sont impliqués dans l'infection par le *L. major*. En effet, l'infection de souris C57BL/6 et BALB/c par le parasite *L. major* induit une augmentation de l'expression des TLR2, TLR7 et TLR9 dans les neutrophiles murins (Charmoy et al, 2007). La présence de *L. panamensis* induit aussi une augmentation des TLR1, TLR2, TLR3 et TLR4 et requiert l'implication de UNC93B1 (nécessaires pour la maturation des TLRs endosomaux 3, 7, 8 et 9) dans une lignée de macrophages humains ou murins (Gallego et al, 2011).

L'utilisation d'ARN interférents a démontré l'implication simultanée du TLR2 et du TLR3 dans la réponse aux macrophages au parasite *L. donovani* (Flandin et al, 2006), qui permettent

la sécrétion de NO et de TNF α en réponse au parasite. L'étude avec des parasites mutants pour des protéines de surface a démontré qu'au contraire du TLR2, la signalisation TLR3 ne dépend pas des molécules de surface (Flandin et al, 2006). Le TLR3 est un TLR endosomal reconnaissant l'ARN double-brin, que l'on ne retrouve pas chez le parasite. Cependant, il existe des virus à ARN double-brin qui infectent les parasites *Leishmania* du Nouveau Monde (Amérique Centrale, Amérique du Sud) (Ogg et al, 2003). Le parasite pourrait donc induire la signalisation TLR3 selon s'il est infecté ou non par ce virus. De plus, l'état infecté de ces parasites pourrait exacerber la sévérité de la pathologie qu'il cause (Ives et al, 2011).

Des souris C57BL/10, mutantes pour le TLR4 (TLR4^{0/0}) et avec une production d'IL-12 altérée (TLR4/IL-12^{0/0}), ont aussi une guérison retardée suite à l'infection par *L. major*. Dans ces souris, l'implication du TLR4 est nécessaire pour le contrôle de la charge parasitaire et l'infection, ainsi que pour la synthèse de NO et la mort des parasites *Leishmania* en empêchant sa réplication (Kropf et al, 2004). En revanche, les souris C57BL/6 déficientes pour le TLR4 (TLR4^{-/-}) se comportent comme les souris normales (Abou Fakher et al, 2009). Dans les neutrophiles de souris C3H/HeJ, la réponse au *L. major* conduit à la libération de la NE (neutrophil elastase), une sérine protéase sécrétée de manière constitutive par les neutrophiles activés et qui peut, après sécrétion, se retrouver à la surface de cellules immunitaires. La NE ainsi sécrétée induit l'activité leishmanicide des macrophages via la signalisation TLR4 et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Ribeiro-Gomes et al, 2007). Le TLR4 intervient aussi dans l'internalisation du parasite (Faria et al, 2011).

Le TLR4 permet aussi la réponse aux parasites *Leishmania* amastigotes, en réponse à l'antigène P8 PGLC. Cet antigène est un complexe constitué d'une protéase à sérine et à cystéine, de glycolipides et de lipoprotéines, et est exprimé à la surface des parasites amastigotes. Il permet la protection des souris BALB/c contre l'infection par *L. pifanoi* et *L. amazonensis*. En effet, avec des souris déficientes pour TLR4 sur un fond BALB/c (C.C3-TLR4Lps-d/J), il a été montré que l'antigène P8 PGLC du *L. pifanoi* peut interagir avec le TLR4 à la surface des macrophages et causer une production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, TNF α), en nécessitant le MyD88, le TLR4, ainsi que CD14 et MD-2 (2 cofacteurs du TLR4) (Whitaker et al, 2008).

L'implication du TLR9 a d'abord été démontrée avec le *Leishmania major* dans l'infection des souris BALB/c, par l'utilisation du CpG (le ligand du TLR9) pour stimuler le système immunitaire. En effet, un traitement avec des oligonucléotides CpG rendait ces souris

résistantes au parasite en redirigeant sa réponse immunitaire vers une réponse Th1 (Zimmermann et al, 1998). De plus, la présence du TLR9 est nécessaire pour une production d'IL-12 par les DCs et d'IFN γ par les cellules NK de souris C57BL/6 en réponse au parasite *L. major*. Mais les souris C57BL/6 déficientes pour le TLR9 réussissent quand même à élaborer une réponse Th1 retardée avec une production élevée d'IL-4 et d'IL-13 transitoires et une réduction d'iNOS. Ces résultats suggèrent la nécessité de la présence du TLR9 dans les DCs pour l'activation des cellules NK mais non pour la polarisation de la réponse T (Liese et al, 2007). Ces souris finissent par guérir à l'infection. La même équipe a de plus démontré le rôle du TLR9 dans la contribution des mDCs et des pDCs de souris C57BL/6 à la réponse contre le parasite *L. infantum*. Les mDCs et pDCs produisent ainsi tous les deux de l'IL-12 contre le parasite de manière TLR9-dépendante, mais seuls les pDCs peuvent produire des IFN de type 1 et seuls les mDCs ont la capacité d'internaliser le parasite et d'induire la cytotoxicité des cellules NK (Schleicher et al, 2007). Par la suite, notre équipe a montré que les souris C57BL/6 déficientes pour le TLR9 étaient plus sensibles à l'infection par le *L. major* que les souris contrôles, en raison de leur incapacité à mettre en place une réponse de type Th1 (Abou Fakher et al, 2008). De plus, les DCs issues des souris TLR9^{-/-} ne produisent plus de cytokines pro-inflammatoires *in vitro* et ne répondent plus à l'ADN du parasite *L. major*, contrairement aux souris contrôles, suggérant que la réponse TLR9 est dirigée contre l'ADN du parasite (Abou Fakher et al, 2008). De même, les souris TLR9^{-/-} sont aussi plus sensibles aux parasites *L. braziliensis* mais dans ce cas, elles produisent plus d'IFN γ que les souris contrôles. Alors que le parasite *L. major* est rapidement éliminé par des macrophages activés par l'IFN γ , les parasites *L. braziliensis* sont moins sensibles (Weinkopff et al, 2013).

Souches de souris	Taille des lésions (TL) ou Charge Parasitaire (CP) par rapport aux souris WT		Phénotype	Type cellulaire	Effets	Parasite/Antigène	Référence
	ETUDE IN VIVO	ETUDE IN VITRO					
TLR2	TL inférieure	Résistante	BMDc	Lymphocytes T	Augmentation: activation, IL-12 (prot) Augmentation: prolifération, IFN γ (prot)	L. braziliensis (SC)	Vargas-Inchaustegui et al, 2009
	Macrophages péritonéaux	Diminution: activation PKR Diminution: IFN γ (prot), SOD-1 (prot)	L. amazonensis	Carvalho Vivarini et al, 2011			
					Macrophages	Pas d'effet	L. (vianna) panamensis
TL identique	Normal						

Souches de souris	Taille des lésions (TL) ou Charge Parasitaire (CP) par rapport aux souris WT		Phénotype	Type cellulaire	Effets	Parasite/Antigène	Référence
	ETUDE IN VIVO	ETUDE IN VITRO					
TLR4	TL et CP supérieures	Sensible	Macrophages	Macrophages	Diminution: production de NO	L. major	Kropf et al, 2004
	TL identique	Normal	Diminution: internalisation/élimination du parasite	L. major	Faria et al, 2011		
						TLR4ko (C57BL/6)	Normal
C.C3-TLR4ps-c/j (TLR4ko sur fond BALB/c)	Sensible	Macrophages	Macrophages	Diminution: TNFa (prot) Diminution: internalisation/synthèse de ROS	L. (vianna) panamensis		
						C.C3-TLR4ps-c/j (TLR4ko sur fond BALB/c)	Sensible
C.C3-TLR4ps-c/j (TLR4ko sur fond BALB/c)	Sensible	Macrophages	Macrophages	Diminution: TNFa (prot) Diminution: IFN γ , IL-10 (prot)	L. pifanoi amastigote		

Tableau 3 TLR2 et TLR4 dans la réponse contre le *Leishmania*

Souches de souris	Paramètre étudié	Par rapport aux souris WT ETUDE IN VIVO	Phénotype	Type cellulaire	Effets	Parasite/Antigène	Référence
TLR endosomaux et UNC93B1							
TLR3							
TLR3ko (C57BL/6)	Taille des lésions et charge parasitaire	Identique	Normal			<i>L. major</i>	Schamber-Reis et al, 2013
TLR7							
TLR7ko (C57BL/6)	Taille des lésions et charge parasitaire	Identique	Normal			<i>L. major</i>	Schamber-Reis et al, 2013
TLR9							
TLR9ko (C57BL/6)	Taille des lésions et charge parasitaire	Supérieures		BMDC	Diminution: IL-12 (prot)		
	Expression des cytokines dans les ganglions drainants et les pattes	Diminution: IFN γ (prot) Diminution: IL-4 et IL-13 (ARNm)	Sensible	Cellules NK	Diminution: iFN γ (prot), activité cytotoxique	<i>L. major</i>	Liese et al, 2007
	Expression des cytokines dans les ganglions	Diminution: INOS (prot)		BM-pDC	Diminution: iFNab (prot)	<i>L. major, L. infantum, L. braziliensis</i>	Schleicher et al, 2007
				BM-mDC et BM-pDC	Diminution: IL-12 (prot)	<i>L. infantum</i>	
UNC93B1 et TLR3/7/9 triple KO							
	Expression des cytokines dans les ganglions	Diminution: IFN γ ; IL-4 (ARNm)		BMDC	Diminution: maturation Diminution: IL-12, IL-6, iFNb (ARNm) Diminution: induction de la réponse T	<i>L. major</i>	Abou Fakher et al, 2008
	Expression des cytokines dans les DC isolés des ganglions et dans les cellules de la rate	Diminution: maturation, IL-12, IL-6, iFNb (prot)	Sensible				
	Taille des lésions et charge parasitaire	Supérieures		BMDC	Diminution: IL-12 (prot)	<i>L. braziliensis</i>	Weinkopf et al, 2013
UNC93B1ko							
	Expression des cytokines dans les ganglions drainants et les pattes	Augmentation: IFN γ (ARNm et prot)	Sensible				
	Taille des lésions et charge parasitaire	Supérieures		Macrophages	Diminution: activation, TNFs (prot)	<i>L. (viannia) panamensis</i>	Gallego et al, 2011
	Expression des cytokines dans la rate et les ganglions	Diminution: iFN γ (ARNm et prot) Augmentation: IL-10 (ARNm et prot)	Sensible				
TLR3/7/9ko							
	Taille des lésions et charge parasitaire	Supérieures					
	Expression des cytokines dans la rate et les ganglions	Diminution: iFN γ (prot) Augmentation: IL-10 (prot)	Sensible				
	Expression des cytokines dans les DCs isolés de la rate	Diminution: IL-12 (prot)				<i>L. major</i>	Schamber-Reis et al, 2013

Tableau 4 Les TLR endosomaux dans la réponse contre le *Leishmania*

4. Détournement de la réponse TLR par le parasite *Leishmania*

Le parasite a cependant élaboré des stratégies pour résister à la réponse cellulaire et notamment à l'activation des TLR. Le parasite *L. major* agit ainsi par l'intermédiaire de ses propres molécules, dont des inhibiteurs de sérines protéases (ISP), dont la présence lui permettent d'inhiber la production de ROS par les macrophages et de l'activation du TLR4 via la NE (Faria et al, 2011).

Mais le parasite *Leishmania* peut aussi détourner les molécules de l'hôte.

L'activation du TLR2 n'induit pas seulement une réponse pro-inflammatoire. La stimulation du TLR2 via le LPG conduit aussi à l'expression d'inhibiteurs de la synthèse de cytokines (SOCS-1 et -3) qui interviennent pour réguler négativement l'expression d'autres TLRs (de Veer et al, 2003). L'activation du TLR2 pourrait donc induire une baisse de réponse des autres TLRs et, de manière plus générale, il pourrait exister une régulation d'expression entre les différents TLR.

Ainsi, le parasite *Leishmania* a la capacité de résister contre l'activation du TLR2 et du TLR4 en inhibant la production d'IL-12 et en augmentant celle d'IL-10 (Chandra & Naik, 2008). Dans la même intention de réduire l'expression d'IL-12, le parasite peut induire la voie TLR4. Le parasite *L. mexicana* permet en effet l'expression soutenue d'iNOS et de COX-2, prolongeant la production respective de NO et de PGE₂, et une augmentation de l'expression d'arginase-1, qui contribuent tous à la diminution d'expression d'IL-12 (Shweash et al, 2011). Il module aussi l'activité des TLR en général en modulant l'activité de la kinase IRAK-1 et en détournant l'activité d'une protéase de l'hôte, la phosphatase SHP-1. En effet, la présence du parasite conduit à une plus grande interaction entre SHP-1 et IRAK-1, d'où l'inactivation d'IRAK-1 qui ne peut plus se détacher de MyD88 pour aller se lier à TRAF6 (Abu-Dayyeh et al, 2008). Il peut aussi induire l'activation de l'enzyme de dé-ubiquitination A20 qui agit sur TRAF6, intervenant aussi bien dans la signalisation des TLR via MyD88 que via TRIF (Srivastav et al, 2012).

D. REPONSE DES CELLULES IMMUNITAIRES AU PARASITE *LEISHMANIA*

1. NEUTROPHILES

Les neutrophiles sont des cellules phagocytaires à noyau polylobé qui circulent dans le sang en conditions physiologiques et qui s'infiltrent dans les tissus en cas de lésion. Ce sont des

cellules d'une grande mobilité qui se déplacent par chimiotactisme. En cas d'activation, elles ont la capacité de sécréter différentes cytokines, notamment l'IL-12, le TNF α et l'IL-10. Elles répondent aussi par un « burst oxydatif » qui leur permet de produire une quantité élevée d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) pour éliminer le pathogène phagocyté. De plus, ces cellules présentent différents types de granules avec des molécules anti-microbiennes et des enzymes telles que la myéloperoxydase. En cas d'activation, ces granules peuvent fusionner avec les phagosomes contenant le parasite, contribuant à la mise en place d'un environnement acide et à la génération de ROS. Les cellules peuvent aussi libérer le contenu de leurs granules pour éliminer un pathogène.

i. Rôle différent selon le fond génétique de la souris

Selon l'hôte considéré (C57BL/6 ou BALB/c), l'implication des neutrophiles peut être différente, avec un effet protecteur chez les souris C57BL/6 et non protecteur chez les souris BALB/c. Cependant, dans ces deux types de souris, les neutrophiles migrent rapidement sur le site d'infection ou d'injection, indépendamment de la présence de parasites. Elles sont les premières cellules à phagocyter les parasites *Leishmania major*. En effet, 30 min après injection, les neutrophiles contiennent déjà des parasites *Leishmania* phagocytés (Beil et al, 1992; Peters et al, 2008).

Par l'apoptose des neutrophiles infectés, des parasites vivants sont alors libérés aux abords de cellules présentatrices d'antigènes (dont les macrophages et les cellules dendritiques). Les résidus cellulaires apoptotiques peuvent être phagocytés par ces cellules sans induire de réponse immunitaire. Un rôle de "cheval de Troie" a ainsi été décrit pour les neutrophiles qui, par apoptose, contribueraient au développement silencieux de la leishmaniose dans les étapes précoces (Laskay et al, 2003). Mais cette hypothèse n'est pas encore couramment établie.

Dans les souris C57BL/6, la déplétion des neutrophiles réduit le nombre de parasites *L. major* vivants dans le site de l'infection mais n'altère pas le recrutement des macrophages ou des cellules dendritiques (Peters et al, 2008). Les neutrophiles peuvent donc servir de niches dans lesquels le parasite peut survivre, durant les premières 24h de l'infection (Peters et al, 2008). A côté, les neutrophiles peuvent aussi présenter des parasites difformes ou des parasites tués (Beil et al, 1992). En réponse au *L. major*, les neutrophiles des souris C57BL/6 produisent de l'IL-12, de l'oxyde nitrique (NO) et des ROS, contribuant à l'élimination du parasite. Cette

production se fait en plus grande quantité dans les souris C57BL/6 que les souris BALB/c (Blos et al, 2003 ; Charmoy et al, JLeukBiol, 2007).

A l'inverse des C57BL/6, on estime que dans les souris BALB/c, les neutrophiles n'ont pas de rôle protecteur dans l'infection par *L. major*. En effet, dans l'infection de souris BALB/c par *L. major*, les neutrophiles contribuent à la mise en place de la réponse Th2 et la déplétion en neutrophiles réduit l'expression d'IL-4, par un mécanisme IL-12 dépendant (Tacchini-Cottier et al, 2000). Dans les souris BALB/c contrôles, les neutrophiles produisent une forme d'IL-12 pouvant s'homo-dimériser et conduisant à sa propre inhibition (Charmoy et al, 2007). De plus, la déplétion en neutrophiles réduit la charge parasitaire dans les macrophages infectés (Ribeiro-Gomes et al, 2004). De manière remarquable, alors que les neutrophiles induisent les macrophages à sécréter du TNF α et non du TGF β chez les souris C57BL/6, les neutrophiles ont l'action inverse chez les BALB/c.

Dans le cas d'autres parasites que le *L. major*, tels que *Leishmania braziliensis* et *amazonensis*, parasites du Nouveau Monde à l'origine de lésions cutanées ou muco-cutanées, ou *Leishmania donovani*, parasite de l'Ancien Monde à l'origine de la leishmaniose viscérale, les neutrophiles des souris BALB/c ont un rôle protecteur (Novais et al, 2009 ; Mc Farlane et al, 2008). Les parasites *L. braziliensis* et *L. amazonensis* peuvent être éliminés par les neutrophiles, en coopération avec des macrophages infectés qui sécrètent du TNF α et produisent des espèces oxygénées réactives (ROS) (Novais et al, 2009). Dans le cas de l'infection par *L. donovani* aussi, l'absence des neutrophiles conduit à une charge parasitaire plus élevée et la réponse immunitaire est orientée vers une réponse Th2, suggérant ici l'importance des neutrophiles pour la mise en place d'une réponse Th1, à l'opposé de l'infection de souris BALB/c par *L. major* (Mc Farlane et al, 2008).

ii. Recrutement des neutrophiles

Le recrutement de neutrophiles varie aussi en nombre entre les souris C57BL/6 et les souris BALB/c. Contrairement aux souris C57BL/6 où les neutrophiles ne représentent que 60% des cellules infiltrées sur le site de l'infection, elles montent à 90% dans les souris BALB/c. De plus, chez les BALB/c, ces cellules sont retrouvées plus longtemps sur le site de l'infection et contiennent plus de parasites viables que ceux des C57BL/6 (Beil et al, 1992). Il a donc été proposé que cette accumulation excessive de neutrophiles pourrait contribuer à la sensibilité des souris BALB/c au *L. major*.

Dans des cellules humaines, le parasite *Leishmania* lui-même peut libérer la chimiokine Leishmania Chemokine Factor (LCF) qui a des propriétés attractives seulement pour les neutrophiles (van Zandbergen et al, 2002). Par ailleurs, le recrutement des neutrophiles implique les chimiokines MIP-2 et KC (Laskay et al, 2003). Dans les souris BALB/c, une des raisons pouvant expliquer la migration excessive des neutrophiles serait l'implication d'IL-17, produite par les lymphocytes CD4⁺ Th17. En absence d'IL-17, les souris BALB/c deviennent résistantes à l'infection par *L. major* et présentent de très faibles lésions. Cependant, aussi bien les souris BALB/c contrôles que celles déficientes pour l'IL-17 élaborent une réponse Th2, avec des niveaux similaires d'IL-4, d'IL-10 et d'IFN γ . Seulement, les souris BALB/c IL-17^{-/-} expriment moins de molécules CXCL1 et CXCL2 au niveau de la peau, qui sont des chimiokines dont la production est induite par l'IL-17 et sont à l'origine de la migration des neutrophiles. La déficience en IL-17 et la réduction de ces chimiokines empêche l'accumulation des neutrophiles au niveau des lésions (Lopez Kostka et al, 2009). Dans les souris C57BL/6 aussi, l'implication de l'IL-17 a été démontrée. L'IL-17 est elle-même régulée par l'IL-10 et l'IFN γ , respectivement pour l'augmentation ou la réduction de son expression. En absence de ces derniers, il serait responsable d'une augmentation du recrutement de neutrophiles et d'une pathologie exacerbée (Gonzalez-Lombana, 2013). Cependant, dans les souris C57BL/6, selon la souche de *L. major* utilisée, elle pourrait contribuer à un phénotype de résistance ou de sensibilité.

iii. Influence sur la réponse T

Les neutrophiles influencent donc la mise en place de la réponse des lymphocytes T CD4⁺ et la polarisation vers une réponse Th1 ou Th2 en fonction du parasite et de l'hôte. Les coopérations entre neutrophiles et cellules dendritiques ou entre neutrophiles et macrophages sont donc essentielles, dans le but d'installer le microenvironnement nécessaire pour la mise en place d'une réponse spécifique. Il a notamment été décrit lors de l'infection de souris C57BL/6 par le parasite *L. major*, que les neutrophiles peuvent attirer par chimiotactisme les cellules dendritiques immatures, les cellules dendritiques dermales résidentes et les cellules de Langerhans en sécrétant la chimiokine CCL3, l'absence de CCL3 conduisant à la mise en place d'une réponse Th1 retardée (Charmoy et al, 2010).

iv. NETose

Une autre propriété des neutrophiles est impliquée dans la réponse anti-*Leishmania*. Il s'agit de leur capacité à mourir par NETose en formant des NETs (Neutrophil Extracellular Trap),

réseaux constitués d'ADN cellulaire lié à des peptides antimicrobiens. Les neutrophiles humains ont la capacité de tuer les parasites *L. amazonensis* par la formation de NETs, et l'élastase et les histones contenues dans ces NETs sont notamment impliquées. Cette élimination de parasites est dépendante de la concentration de LPG (Guimaraes-Costa et al, 2009). Les parasites *L. donovani* induisent aussi une formation de NETs par des neutrophiles humains, mais elle n'est dépendante ni de la présence de LPG ou de gp63 ni de la production de ROS. En revanche, la présence de LPG permet une meilleure survie du parasite contre l'activité lytique des neutrophiles (Gabriel et al, 2010), en permettant d'une part l'inhibition de la fusion des phagosomes avec les lysosomes dans les neutrophiles et d'autre part, en retardant l'apoptose des neutrophiles (Gueirard et al, 2008).

Ainsi, selon l'espèce considérée du parasite *Leishmania* et selon l'hôte, la contribution des neutrophiles dans l'infection est différente. Récemment, il a aussi été montré que le stade du parasite influence la réponse des neutrophiles. Dans des souris C57BL/6, les deux formes, promastigote et amastigote, du parasite *L. amazonensis* sont phagocytées par les neutrophiles et activent ces cellules, d'où leur production de cytokines et de ROS. Cependant, alors que la forme promastigote induit la synthèse de TNF α et est en grande partie éliminée, la forme amastigote induit la production d'IL-10 et résiste (Carlsen et al, 2013).

2. MONOCYTES

Les monocytes sont des cellules circulantes dans le sang, que l'on retrouve aussi dans la moelle ou la rate. Ce sont des cellules mobiles pouvant se déplacer à un site d'inflammation et pouvant elles-même médier la migration d'autres cellules en sécrétant des chimiokines. Elles peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires (Geissmann et al, 2010).

L'implication des monocytes dans l'infection par le *L. major* a été suggérée rapidement du fait du faible nombre de macrophages et de cellules dendritiques présents à un site donné. Après l'infection par le *L. major*, les monocytes recrutés sur le site de l'infection deux jours plus tard peuvent rapidement se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques (Muller et al, 2001 ; Leon et al, 2007).

3. MACROPHAGES

Les macrophages sont des cellules phagocytaires contribuant à l'élimination de résidus cellulaires apoptotiques d'une part et d'autre part, exprimant de nombreux récepteurs de pathogènes (PRR) pour phagocyter des corps étrangers. Par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, ils peuvent activer d'autres cellules immunitaires et contribuer à la mise en place de la réponse adaptative.

Après les neutrophiles, les macrophages sont parmi les premières cellules à entrer en contact avec le parasite. Ils sont décrits comme les cellules-hôtes pour le *Leishmania*, dans lesquels le parasite peut persister et se répliquer.

L'internalisation du parasite par le macrophage a été décrite par phagocytose, avec l'implication de différents récepteurs (CR1, CR3, récepteur de la fibronectine, récepteur du mannose) et des molécules de surface LPG et gp63. L'infection des macrophages peut se faire aussi par phagocytose de neutrophiles infectés apoptotique, permettant une survie plus longue des parasites, le temps qu'ils deviennent plus adaptés à la phagocytose et la survie dans les macrophages (Laskay et al, 2003).

Les macrophages internalisent donc les parasites dans des phagosomes, qu'on appelle des vacuoles parasitophores (Desjardins et Descoteaux, 1997), et qui peuvent contenir un ou plusieurs parasites. La membrane du phagosome est issue de la membrane plasmique, acquise durant l'entrée du parasite. Petit à petit, ils perdent les marqueurs de surface membranaire et fusionnent avec les compartiments endo-lysosomaux. Ces phagosomes partagent des caractéristiques et des marqueurs d'endo-lysosomes, un pH interne acide, des peptides anti-microbiens, des enzymes hydrolytiques. Par la suite, dans les compartiments acides, la forme amastigote du parasite peut survivre et se répliquer.

En réponse au parasite *Leishmania*, les macrophages sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IL-1, des cytokines pour la polarisation vers une réponse Th1 comme l'IL-12.

Par ailleurs, des signaux de co-stimulation exprimés par les macrophages sont nécessaires pour la polarisation de la réponse T, avec la participation des récepteurs CD40 et des ligands

CD80/CD86 sur les macrophages et respectivement du ligand CD40L et des récepteurs CD28 et CTLA-4 sur les cellules T (Campbell et al, 1996). Or, les macrophages infectés par le parasite *Leishmania* ont une expression diminuée du marqueur de maturation CD40 (Awasthi et al, 2003).

L'iNOS ou NOS-2 est l'enzyme intervenant pour la synthèse d'oxyde nitrique (NO). En réponse au parasite *Leishmania* et à l'IFN γ produit par les lymphocytes Th1 CD4⁺, les macrophages génèrent du NO (Chakour et al, 2003), mais aussi des ROS (espèces réactives d'oxygène) par l'implication de la NADPH oxydase (Blos et al, 2003). Au contraire des ROS, la production de NO est essentielle à l'élimination du parasite *L. major* (Wei et al, 1995).

Le parasite n'a cependant pas un rôle passif pendant ces différentes étapes puisqu'il peut résister aux événements de fusion (Desjardins & Descoteaux, 1997 ; Lodge et al, 2005), inhibe la synthèse de ROS (Lodge et al, 2006), le changement de pH et l'acidification (Vinet et al, 2009), par l'action des molécules de LPG et de gp63. Le parasite intervient aussi pour inhiber la synthèse des cytokines telles que l'IL-12 (Belkaid et al, 1998), le TNF α , l'IL-1, l'IFN α/β , mais aussi la synthèse d'oxyde nitrique (NO) et d'IFN γ et les voies de signalisation JAK/STAT, TLR et NF-kB (Gomez et al, 2009 ; Olivier et al, 2012).

L'inhibition des cytokines (IL-12 et TNF α) et du NO pourrait aussi se faire par la production de l'IL-10 (Kane & Mosser, 2001) et du TGF β (Bogdan & Rollinghoff, 1998) par les macrophages, induite par la présence du parasite *Leishmania*. Une des raisons conduisant le macrophage à augmenter l'expression de ces deux cytokines est la capacité du parasite *Leishmania* à mimer l'apoptose en exposant ses résidus phosphatidyl-sérine à l'extérieur, habituellement retrouvés à la surface des cellules apoptotiques. En effet, la présence de ces PS contribue à une meilleure internalisation du parasite amastigote *Leishmania amazonensis* dans les macrophages, sachant que les parasites sont bien vivants d'après un test MTT (au sel de tétrazolium) ou avec de l'iodure de propidium et que le traitement par l'annexine V, pouvant se lier aux résidus PS, réduit l'infection de macrophages péritonéaux de BALB/c (de Freitas Balanco et al, 2001 ; Wanderley et al, 2006). De plus, les macrophages ainsi infectés sécrètent plus d'IL-10 et de TGF β et présentent une inhibition plus grande de la production de NO, en fonction de la quantité de PS exposée à leur surface (Wanderley et al, 2006). Les parasites *Leishmania* ont donc la capacité de mimer une caractéristique de cellules apoptotiques, dans le but d'augmenter leur installation dans la cellule-hôte mais aussi de moduler sa réponse inflammatoire.

Lors de l'infection par le *Leishmania*, une autre fonction surtout décrite pour les cellules dendritiques est aussi partagée par les macrophages, mais dans une moindre mesure. Ces cellules sont capables de présentation antigénique via le CMH de classe I ou II. La présence de parasites *L. donovani* inhibe ainsi l'expression des CMH de classe I et II dans les macrophages (Reiner et al, 1988). La présence du parasite *L. amazonensis* n'altère pas l'expression des CMH de classe II, cependant il empêche l'apprêtement des antigènes sur le CMH (Prina et al, 1993). Par ailleurs, les formes amastigotes du parasite *L. amazonensis* sont aussi capables de détourner le routage des molécules de CMH de classe II et d'induire leur internalisation dans les vacuoles parasitophores où il induit leur dégradation par les protéases du macrophage et du parasite (de Souza et al, 1995), en même temps que les antigènes d'amastigotes sont séquestrés hors de portée des molécules de CMH (Kima et al, 1996). Ainsi, les parasites *Leishmania* peuvent inhiber l'expression des CMH et la présentation antigénique par les macrophages.

La réponse des macrophages est amplifiée par le recrutement de macrophages non infectés, par la synthèse de cytokines telles que l'IFN γ , produite par les cellules de type Th1, ou l'IL-4 produite par les lymphocytes CD4⁺ Th2.

4. CELLULES DENDRITIQUES

i. Caractéristiques

Les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules caractérisées par leur morphologie, présentant des dendrites à leurs extrémités, et leur capacité à faire de la présentation antigénique pour orienter la réponse des lymphocytes T. Chez la souris, tous les DCs sont marqués par CD11c⁺ mais le niveau d'expression varie.

On distingue classiquement : les DCs conventionnelles (cDCs), marqués fortement CD11c⁺CMHII⁺ et soit CD11b⁺ soit CD8⁺/CD103⁺, et les DCs plasmacytoïdes (pDCs), marqués faiblement CD11c⁺, qui sont aussi B220⁺Ly6C⁺ et qui répondent par une production d'IFN de type 1 en cas d'activation.

Différents types de cellules dendritiques peuvent se retrouver être au contact du parasite *Leishmania* au niveau de la peau : les DCs de l'épiderme et les DCs du derme. Parmi les DCs dermales, on retrouve des DCs Langerin⁺ (Langerin⁺CD103⁺ ou Langerin⁺CD103⁻) et des

DCs Langerin⁻ (Langerin⁻CD11b⁺ ou Langerin⁻CD11b⁺) (Henri et al, 2010). Les DCs Langerin⁺ ne constituent que 3% des DCs alors que les DCs Langerin⁻ CD11b⁻ sont à 16% et les DCs Langerin⁻ CD11b⁺ à 66%. A fortiori, les DCs exprimant la Langerin (CD207), une lectine de type C, sont appelées les cellules de Langerhans. Il existe d'autres DCs, les CD8⁺ DC, qui sont définies par leur expression de CD8a et qui sont aussi impliquées dans l'infection par le parasite (Henri et al, 2002). Ces DCs sont impliquées dans la présentation antigénique aux lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. Les DCs dermales (dDC) circulent dans l'espace interstitiel de la peau telles des sentinelles. Ainsi, alors que les cellules de Langerhans sont peu mobiles (<2µm/min), les DCs dermales sont très actives (3.7µm/min), menées par des structures lamellipodes et soumises à des signaux chimio-attractants (Ng et al, 2008).

Ces deux types de DCs cutanées, DC dermales et cellules de Langerhans, ont été décrites comme pouvant être infectés par le parasite promastigote ou amastigote, avant de migrer vers les ganglions lymphatiques (Moll et al, 1993, 1995 ; Blank et al, 1993 ; von Stebut et al, JEM, 1998). Par la suite cependant, l'implication des cellules de Langerhans dans l'infection par le *Leishmania* a été remise en cause. En effet, aucune des DCs infectées retrouvées dans les ganglions lymphatiques n'expriment la Langerin mais expriment essentiellement des marqueurs de DCs (Ritter et al, 2004) et les cellules de Langerhans ne participent pas à la présentation antigénique (Lemos et al, 2004). Ces dernières pourraient même avoir un rôle négatif. Les souris déficientes en cellules de Langerhans augmentent leur réponse Th1 et diminuent la production d'IL-10 et le recrutement de lymphocytes T régulateurs (Kautz-Neu et al, 2011). Par ailleurs, d'autres types de DCs, dérivées de monocytes (moDC) présents à la base sur le lieu de l'infection, peuvent aussi intervenir (Leon et al, 2007). Ainsi, 20 min après injection intra-dermale de promastigotes *L. major* marqués par du DsRed, les DC dermales présentent déjà des vacuoles parasitophores. A 2-3h post-infection, 70% des dDC contiennent des parasites marqués (Ng et al, 2008).

ii. Devenir des DCs après stimulation par un pathogène

Le récepteur FcγR pourrait être impliqué dans l'internalisation par les cellules dendritiques du parasite *Leishmania*, qui doit alors préalablement être lié par des anticorps. En effet, chez les souris déficientes pour ce récepteur, les DCs sont moins infectées par le *L. major* et la réponse

T n'est pas activée (Woelbing et al, 2006). Cependant, en absence d'anticorps aussi, les parasites *L. amazonensis* peuvent aussi être internalisés par les cellules dendritiques, avec une internalisation plus importante des promastigotes que des amastigotes, montrant que le rôle de ces récepteurs n'est pas exclusif dans les cellules dendritiques (Prina et al, 2004).

Après rencontre avec un pathogène ou sous l'action de cytokines pro-inflammatoires, les DCs immatures se différencient en DCs mûres. Leur capacité de phagocytose est alors réduite, mais elles augmentent leur capacité de présentation antigénique et expriment des molécules de co-stimulation (Banchereau & Steinman, 1998). En effet, l'infection de souris C57BL/6 et BALB/c par les parasites *L. donovani*, *L. braziliensis* et *L. major* induisent la maturation des DCs, en augmentant leur expression de CD40, CD80, CD86 et de CMH de classe II, ainsi que la migration des DCs (De Trez, 2004). De même, les dDCs infectées par le parasite *Leishmania* peuvent migrer du lieu d'infection cutanée vers les ganglions lymphatiques (Ritter et al, 2004 ; Leon et al, 2007 ; Ng et al, 2008). Cette migration est possible par l'expression de récepteurs de chimiokines (notamment CCR7), essentielles pour diriger leur migration.

Dans les ganglions lymphatiques aussi, des DCs peuvent être infectées par le parasite. Au niveau des ganglions, les DCs ont un rôle majeur dans la présentation antigénique auprès des lymphocytes T, déterminant l'orientation de la réponse immunitaire vers un type Th1 via la production d'IL-12 ou Th2 via la production d'IL-4. Alors que le macrophage est la cellule-hôte du parasite *Leishmania*, phagocytant de nombreux promastigotes qui peuvent s'y transformer en formes amastigotes, les cellules dendritiques internalisent peu de promastigotes. Dans les ganglions, au contraire des macrophages, les parasites sont pour la plupart dégradés dans les cellules dendritiques et permettent une meilleure présentation antigénique (Konecny et al, Eur J Imm, 1999).

iii. Importance de la production d'IL-12 par les cellules dendritiques

Pour que les souris C57BL/6 soient résistantes à l'infection par le *L. major*, l'élaboration d'une réponse Th1 est nécessaire et requiert la sécrétion d'IL-12 (von Stebut et al, 1998 ; Konecny et al, 1999). Des souris BALB/c, habituellement sensibles à l'infection par le *L. major*, deviennent résistantes au parasite lorsqu'elles sont traitées avec de l'IL-12 recombinante alors que les souris C57BL/6, habituellement résistantes, deviennent sensibles

en cas de déficience pour l'IL-12 (Sypek et al, 1993 ; Mattner et al, 1997). La production d'IL-12 par les macrophages infectés est très faible, en raison d'un rôle inhibiteur du parasite promastigote (Reiner et al, 1994 ; Belkaid et al, 1998), alors que la production d'IL-12 par les cellules dendritiques infectées, bien qu'inhibée aussi par le parasite, augmente significativement (Konecny et al, 1999). Par ailleurs, l'utilisation de souris C57BL/6 déficientes pour l'IL-12, infectées par *L. major* au niveau des pattes et traitées transitoirement les 2 premières semaines avec de l'IL-12 recombinante, permet le contrôle du parasite les 8 premières semaines. Mais lors d'une réinfection immédiate de ces souris IL-12^{-/-}, elles perdent leur résistance au parasite, suggérant ainsi le rôle d'une production continue de l'IL-12 tout au long de l'infection pour le maintien des lymphocytes Th1 (Park et al, 2002). De manière intéressante, il existe une relation inverse entre l'infection de DCs et leur production d'IL-12. Ainsi, les DCs CD8a⁻, qui contiennent moins de parasites que les DCs CD8a⁺, produisent plus d'IL-12 que ces dernières (Henri et al, 2002). Comme chez les macrophages, dans les DCs aussi, le parasite *Leishmania* peut moduler la production d'IL-12. En effet, après infection par le *L. major*, les cellules de Langerhans de BALB/c surexpriment la production d'IL-4 alors qu'elles réduisent l'expression d'IL-12 (Moll et al, 2002).

iv. Réponse du parasite *Leishmania* aux cellules dendritiques

Le parasite *Leishmania* a élaboré plusieurs stratégies pour contrer la réponse des cellules dendritiques, en inhibant aussi bien sa maturation, sa migration et sa réponse contre le parasite. En effet, suite à l'infection par le *L. major*, les DCs réduisent leur expression de récepteurs de chimiokines, tels que CCR2, CCR5 et CCR7, qui ont alors une mobilité réduite vers leur ligand respectif (Ato et al, 2002 ; Steigerwald & Moll, 2005). Cet effet est dépendant de la production de TNF α et d'IL-10, provoquée par le parasite *Leishmania*. Le parasite influence donc l'expression des récepteurs de chimiokines et de chimiokines, et altère la mobilité des DCs du site de l'infection vers les ganglions lymphatiques, où elles participent à l'initiation de la réponse T. Ainsi le parasite *Leishmania* peut survivre durant quelques jours après l'infection dans les cellules dendritiques, suggérant que ces dernières peuvent aussi servir de cellules-réservoirs où les parasites peuvent s'amplifier avant d'induire la réponse immunitaire (Prina et al, 2004). Par ailleurs, les parasites *Leishmania amazonensis* amastigotes peuvent inhiber la voie JAK/STAT dans les cellules dendritiques, qui est essentielle pour la maturation des DCs (Jackson et al, 2004 ; Xin et al, 2008). Les DCs

infectées expriment alors moins les marqueurs CD40 et CD86 et sont de moins bonnes cellules présentatrices d'antigènes. Alors que les DCs infectées produisent de l'IL-12 au début de l'infection, elle est par la suite inhibée et la production d'IL-10 à la place est augmentée par les parasites *Leishmania* amastigotes (Xin et al, 2008).

5. REPONSE NK

Un rôle protecteur des cellules Natural Killers (NK) a été décrit, suite à l'observation que des souris déficientes en cellules NK avaient une infection aggravée par des parasites *Leishmania*. Les cellules NK produisent de l'IFN γ dès le 1^e jour dans des souris C3H infectées résistantes, alors que les souris déplétées en cellules NK présentent plus de production d'IL-4 et moins d'IFN γ (Scharton et al, 1993). Cette production d'IFN γ nécessitait l'implication de cellules T CD4⁺ et leur production d'IL-2. Les cellules NK contribuent ainsi à la mise en place de la réponse de type Th1.

D'autres cytokines comme l'IL-12, produite par les cellules dendritiques et les macrophages, et l'interféron de type 1 (IFN α et β) peuvent activer les cellules NK. En effet, dans l'infection par le parasite *Leishmania infantum*, les cellules NK peuvent aussi être activés par des DCs stimulés via le TLR9 et produire de l'IFN γ (Schleicher et al, 2007). Cependant, l'activation des cellules NK nécessite ici les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) et leur production d'IL-12 mais non les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (Schleicher et al, 2007). La production de chimiokines pouvant conduire au recrutement de cellules NK, telles que RANTES, MCP-1 et IP-10, sont aussi produites dans les ganglions lymphatiques périphériques lors de l'infection de souris C57BL/6 par le parasite *L. major* (Vester et al, 1999). En réponse à ces chimiokines, les cellules NK sont recrutées et leur activité cytotoxique est augmentée.

Dans le cas de l'infection par *Leishmania amazonensis*, il a été montré que la présence de cellules NK peut augmenter l'activation des cellules dendritiques par le parasite *in vitro* (Sanabria et al, 2008). Le pourcentage de DCs CD11c⁺CD40⁺ passe alors de <8% à 20% lors de l'activation par le parasite, et à 50% en présence de cellules NK et s'accompagne de la production d'IL-12p40 par les DCs et d'IFN γ par les cellules NK. Il en est de même pour les cellules NK. Il existe ainsi une coopération entre cellule dendritique et cellule NK qui permet leur sur-activation mutuelle, par contact cellulaire et par l'intervention de cytokines.

Une activation directe des cellules NK par des parasites *Leishmania major* est démontrée par Becker et al en réponse au LPG, par sa reconnaissance via le récepteur Toll-Like Receptor 2 (TLR2) (Becker et al, 2003). En effet, après avoir isolé du LPG à partir de parasites métacycliques et procycliques, la quantité de NF- κ B augmente dans le noyau, dénotant sa translocation depuis le noyau et l'activation des cellules NK. Cette activation conduit à la production d'IFN γ et de TNF α et à une sur-expression du gène du TLR2 et du récepteur TLR2 à la surface. Cependant, *in vitro*, les cellules NK, préalablement activés par IL-12 et IL-18, n'ont pas d'activité lytique directe sur des macrophages infectés par *Leishmania infantum*, mais elles sont capables d'induire l'activité lytique des macrophages en sécrétant de l'IFN γ et du TNF α (Prajeeth, 2011). Les macrophages infectés produisent alors de l'iNOS et détruisent les parasites *L. infantum*.

6. FIBROBLASTES ET KERATINOCYTES DE LA PEAU

En plus des macrophages et des cellules dendritiques, les parasites *Leishmania* peuvent aussi infecter les fibroblastes de la peau, ainsi que des fibroblastes des ganglions lymphatiques, dans lesquels les formes promastigotes et amastigotes du parasite ont été observées (Bogdan et al, 2000). L'internalisation du parasite dans ces cellules pourrait être médiée par les récepteurs de la fibronectine (FnR) ou des récepteurs au mannose (MR) (Hespanhol et al, 2005; Ueno et al, 2012), qui sont aussi retrouvés à la surface des macrophages. Il existe de plus une voie phagocytaire dans les fibroblastes pour l'entretien de la matrice extracellulaire (par exemple pour la dégradation du collagène). Les fibroblastes auraient donc aussi la capacité de phagocyter les parasites *Leishmania* (Bogdan et al, 2000). Après infection, ces mêmes cellules peuvent sécréter des chimiokines pour attirer les DCs et influencer leur différenciation, tout en servant de niches pour les parasites et permettre leur survie (Svensson et al, 2004).

D'autres cellules retrouvées dans la peau, les kératinocytes, auraient aussi un rôle essentiel dans la mise en place de la réponse à l'infection par le *Leishmania major* (Ehrchen et al, 2010). *In vitro*, les kératinocytes n'internalisent pas le parasite. Cependant, dans les premières heures suivant l'infection sous-cutanée par *L. major*, l'expression d'IL-12 et d'IL-1b est augmentée dans les kératinocytes, avec une expression transitoire d'IL-4 et d'IL-6. De plus, la production d'IL-6 spécifiquement par les kératinocytes et la production d'IL-4 au niveau du

site de l'infection sont nécessaires pour la mise en place de la réponse Th1 (Ehrchen et al, 2010).

Les kératinocytes produisent aussi des peptides antimicrobiens. Ces peptides sont des protéines cationiques intervenant dans la réponse immunitaire innée. Ils sont retrouvés notamment chez les mammifères, les amphibiens, les insectes ou les plantes. On distingue notamment les défensines et les cathélicidines, aussi exprimés par les neutrophiles. Ces peptides peuvent s'attaquer à la membrane des *Trypanosomatidae* et causer sa rupture, induisant l'apoptose des parasites. Selon leur stade de développement, les parasites sont plus ou moins sensibles aux peptides antimicrobiens et les molécules à leur surface (comme la gp63) pourraient jouer un rôle, étant capables de cliver ces peptides *in vitro* (Kulkarni et al, 2006).

7. REPOSE T

i. Le rôle des molécules de co-stimulation

L'activation des cellules T résulte de deux signaux : un signal spécifique par présentation antigénique sur des molécules de CMH et un signal de co-stimulation, les deux étant fournis par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Dans le cas de pathogènes intracellulaires, comme c'est le cas pour le parasite *Leishmania*, ce sont les molécules CMH de classe II qui présentent les antigènes du parasite et recrutent de manière spécifique les cellules CD4 principalement. Dans le même temps, des signaux de co-stimulation nécessitent la participation i) sur les CPA, des marqueurs CD40 et des ligands CD80 et CD86, ii) sur les cellules T, du ligand CD40L et des récepteurs CD28 et CTLA-4, respectivement stimulateur et inhibiteur de l'activation des lymphocytes T.

Le rôle des molécules CD40 et CD40-L semble être important dans la résistance des souris C57BL/6 aux parasites *Leishmania major* et *Leishmania amazonensis*. Ils sont impliqués dans la production d'IL-12 et de NO par les macrophages, d'IFN γ et de TNF α par les lymphocytes T et la mise en place d'une réponse Th1 (Campbell et al, 1996 ; Soong et al, 1996).

Le rôle des molécules CD80 et CD86 est plus controversé. La neutralisation par un anticorps de leur récepteur CTLA-4 rend les souris BALB/c résistantes, alors qu'elle n'a aucun effet

dans les souris C57BL/6 (Corry et al, 1994). De plus, la molécule CD86, et non CD80, a été démontrée comme nécessaire pour la production d'IL-4 par les cellules des ganglions et la mise en place d'une réponse Th2 chez les souris BALB/c infectées par *L. major* (Brown et al, 1996). Par la suite, une autre étude a souligné l'importance de CD86 dans les phases précoces d'une réponse Th2 mais aussi Th1, dans des souris C3H résistantes ou BALB/c sensibles infectées par *L. major* (Elloso & Scott, 1999). L'ensemble de ces résultats suggèrent que seule la molécule CD86 a un rôle important, aussi bien dans la polarisation Th1 que Th2. En revanche, les mêmes auteurs démontrent que dans les souris BALB/c CD28^{-/-}, une réponse Th2 indépendante de CTLA-4 et des ligands CD80 et CD86, peut être mise en place. De manière identique, d'autres études montrent que la déficience du récepteur CD28 chez des souris C57BL/6 et des souris BALB/c n'entraîne aucun effet sur le cours de l'infection par *L. major* (Brown et al, 1996), suggérant finalement un rôle mineur de ces molécules. A ce jour, l'implication de ces deux molécules dans l'infection par le parasite *Leishmania* n'est pas encore clairement définie.

ii. Les lymphocytes T CD4⁺

Dans l'infection par le *Leishmania major*, certaines souches sont résistantes : elles développent des lésions cutanées qui guérissent rapidement. C'est le cas des souches C57BL/6, C3H ou CBA, qui répondent au parasite par une réponse Th1 et la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ sécrétrices d'IFN γ . D'autres souches dont DBA/2 ou BALB/c répondent par une réponse Th2 et sont sensibles à l'infection. Il existe ainsi des différences de réponse au parasite *L. major* selon l'hôte considérée. Cependant, la réponse d'un même hôte peut être différente au *L. major*, en fonction de la souche de *L. major* considérée. En effet, les souris C57BL/6 sont résistantes aux souches LV39 et Friedlin de *L. major* mais sensibles à la souche Seidman du *L. major* (Anderson et al, 2005).

Pour le contrôle de l'infection des souris C57BL/6 par les parasites *Leishmania*, le rôle des lymphocytes Th1 CD4⁺ et leur production d'IFN γ sont essentielles. Le développement de lymphocytes CD4⁺ Th1 en réponse au parasite requiert l'activité de l'IL-12, pour lequel les cellules dendritiques sont considérées comme la source principale dans l'infection par le parasite *Leishmania* (von Stebut et al, 1998 ; Konecny et al, 1999). D'autres cytokines, telles que l'IL-18 et l'IL-27, pourraient aussi être impliquées. L'IL-27 appartient à la même famille de cytokines qu'IL-12 et serait impliquée dans l'inhibition de la production précoce d'IL-4

pour permettre la mise en place d'une réponse Th1 (Artis et al, 2004). Les données sont plus contradictoires pour l'IL-18, dont l'implication pour la mise en place d'une réponse Th1 dépend de l'espèce *Leishmania* étudiée. Cependant, elle intervient dans la régulation de la production d'IFN γ . La production d'IFN γ par les lymphocytes CD4⁺ Th1 est essentielle pour induire les macrophages infectés à synthétiser des ROS et du NO pour tuer le parasite. Ainsi, des souris déficientes pour la cytokine IFN γ ou pour son récepteur IFN γ R infectées par *L. major* développent des lésions qui ne se guérissent pas (Scott, 1991 ; Swihart et al, 1995). La synthèse d'IFN γ est dépendante du facteur de transcription T-bet, dont la déficience rend aussi des souris C57BL/6 sensibles à l'infection par le *L. major* (Szabo et al, 2002).

Les souris BALB/c sensibles à l'infection par le *L. major* mettent en place une réponse Th2, initiée par l'IL-4 (Sadick et al, 1990). Par la suite, il a été démontré que durant les 4 premiers jours suivant l'infection sous-cutanée par des parasites *L. major* dans les pattes, les souris sensibles (BALB/c) et les souris résistantes (C57BL/6, C3H/HeN) ont en fait une réponse cytokine similaire dans les ganglions lymphatiques, avec notamment la production d'IFN γ , d'IL-4 et d'IL-10. Ce n'est que par la suite, à partir du 5^e jour, que l'expression d'IL-4 et d'IL-10 reste importante dans les souris sensibles, alors qu'elle est significativement réduite dans les souris résistantes (Reiner et al, 1994). De plus, la synthèse d'IL-12 par les macrophages des souris résistantes n'apparaît qu'une semaine après l'infection, due aux formes amastigotes du parasite, qui a eu le temps de se transformer (Reiner et al, 1994). Cependant, alors que dans les souris C57BL/6, l'IL-12 a un rôle pivot permettant l'établissement d'une réponse Th1, dans les souris BALB/c l'expression concomitante d'IL-4, d'IL-10 et de TGF β bloquerait l'effet d'IL-12, conduisant à une réponse Th2 (Scharton-Kersten et al, 1995). Par ailleurs, des souris BALB/c invalidées pour le gène de l'IL-4 élaborent une réponse Th2 et restent sensibles à l'infection par le *L. major*, suggérant que les autres cytokines retrouvées lors de la réponse Th2, comme l'IL-10 ou le TGF β pourraient aussi avoir un rôle pour sa mise en place (Noben-Trauth, 1996 ; Kane & Mosser, 2001 ; Noben-Trauth, 2003). Parmi les cellules T CD4⁺, les lymphocytes T régulatrices CD4⁺ Foxp3⁺ sont des sources d'IL-10 et de TGF β .

Récemment l'implication d'une autre cytokine a été mise en évidence dans l'infection par le *Leishmania major*, l'IL-17. En effet, dans l'infection par *Leishmania major*, les souris BALB/c produisent plus d'IL-17 dans les ganglions que les souris C57BL/6 et les souris

BALB/c déficientes pour l'IL-17 sont moins sensibles au parasite (Lopez Kotska et al, 2009). Ces dernières n'avaient pas une réponse Th2 modifiée mais le recrutement de neutrophiles était modifié. Or nous avons déjà vu que l'accumulation de neutrophiles peut être délétère dans l'infection par *L. major*.

Or les cellules CD4⁺ Th17 sont les producteurs principaux de l'IL-17 et du TNF α , l'expression de l'IL-17 impliquant les facteurs de transcription ROR γ t et ROR α (Korn et al, 2009). De plus, le développement de ces cellules nécessite l'IL-23, le TGF β et l'IL-6 mais est inhibée par l'IL-4 et l'IFN γ (Lopez Kotska et al, 2009 ; Korn et al, 2009). Mais l'implication directe de ces cellules n'a pas encore été directement démontrée.

iii. Les lymphocytes T CD8⁺

Dans un premier temps, dans les souris BALB/c, le rôle des lymphocytes T CD8⁺ a été montré tour à tour comme

- secondaire, en présence de lymphocytes T CD4⁺, lors d'une réinfection par le parasite *L. major* (Muller et al, 1992)

- non essentiel, vu que les souris invalidées pour le gène de la β 2-globuline, qui permet l'activation des lymphocytes T CD8⁺ via la présentation antigénique par le CMH de classe I, guérissent de l'infection par le *L. major* et que l'expression d'ARNm d'IFN γ reste comparable entre les souris +/- et les souris -/- (Wang et al, 1993).

Par la suite, il a été démontré qu'aussi bien les lymphocytes T CD4⁺ que T CD8⁺ sont recrutés sur le site de l'infection et que les souris C57BL/6 déficientes ou déplétées en lymphocytes T CD8⁺ ne réussissent plus à contrôler l'infection par *L. major* (Belkaid, 2002). L'activité des lymphocytes T CD8⁺ est nécessaire pour le maintien de l'activité CD4⁺ et de la réponse Th1, et inversement. En effet, des souris RAG^{-/-} reconstituées avec l'une ou l'autre des types cellulaires ne confèrent aucune résistance à ces souris au parasite *Leishmania*, suggérant leur activité complémentaire (Belkaid, 2002). L'activité complémentaire des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ a aussi été observée lors de la comparaison de l'infection de souris C57BL/6 par une dose faible (10³) ou élevée (10⁶) de parasites *L. major* au niveau de l'oreille (Uzonna et al, 2004). Au bout de 3 semaines, les souris infectées avec une forte dose de parasites produisent beaucoup d'IFN γ et pas d'IL-4, mettant en place une réponse Th1. Au contraire, les souris infectées avec une dose faible de parasites, les lymphocytes T CD4⁺ activés produisent une grande quantité d'IL-4 et peu d'IFN γ , favorisant la mise en place d'une

réponse Th2. Cependant, dans les deux cas, les souris guérissent à l'infection. En réalité, la réponse Th2 observée dans les souris infectée par une faible dose est transitoire. Mais en absence de lymphocytes T CD8⁺, la réponse Th2 est maintenue. Ainsi, lors de l'infection par *L. major*, l'activation des lymphocytes T CD4⁺ et celle des T CD8⁺ sont nécessaires toutes les deux et la production d'IFN γ par les lymphocytes T CD8⁺ contribue à la réorientation de la réponse Th2 vers une réponse Th1 (Uzonna et al, 2004).

Par ailleurs, le transfert seul de lymphocytes T CD8⁺ naïves chez des souris C57BL/6 RAG^{-/-} induit des lésions plus précoces et une pathologie plus sévère encore par l'infection par *L. major* que les souris contrôles (Belkaid, 2002). Dans l'infection de souris BALB/c infectées par le parasite *Leishmania braziliensis*, il a aussi été montré que les cellules T CD8⁺ induisent une pathologie et des lésions plus sévères. Elle est associée à la molécule cytotoxique de la perforine (Novais et al, 2013). En effet, alors que le transfert de lymphocytes T CD8⁺ dans des souris RAG^{-/-} induit une pathologie plus sévère, les souris BALB/c ayant eu un transfert de lymphocytes T CD8⁺ déficients pour la perforine ne développent plus de lésions.

La présentation antigénique par le CMH de classe I par les cellules dendritiques est nécessaire à l'activation de la fonction effectrice des lymphocytes T CD8⁺ et de leur sécrétion d'IFN γ . Elle fait intervenir le complexe hétérodimérique TAP. Dans le cas d'une phagocytose de pathogènes ou de cellules tumorales, ce dernier conduit les peptides processés vers le réticulum endoplasmique, qui fusionne rapidement avec les phagosomes (Guermontprez et al, 2003). Par la suite, les complexes peptide-CMH classe I sont transportés vers la membrane plasmique. Cependant, il a été montré dans le cas de l'infection par *L. major* que la présentation antigénique via le CMH de classe I se faisait de manière TAP-indépendante (Bertholet et al, 2006). En effet, la phagocytose du parasite *Leishmania* internalisé conduit à la synthèse d'antigènes peptidiques qui peuvent être chargés directement dans les phagolysosomes des cellules dendritiques de souris TAP^{-/-} *in vitro*. *In vivo*, la prolifération des cellules T et la réponse T CD8⁺ persiste toujours contre des antigènes de parasites *Leishmania* et est identique entre les souris TAP^{-/-} et les souris WT. De plus, cette activité est perdue lorsque le pH est neutralisé et que les protéases des phagosomes ne sont plus activées (Bertholet et al, 2006).

Dans le cadre de l'infection par les parasites *Leishmania*, les lymphocytes T CD8⁺ peuvent donc avoir un rôle protecteur et un rôle pathogénique, selon la présence des lymphocytes T CD4⁺.

iv. La réponse cytokine des cellules T

Chez les souris C57BL/6, la balance de sécrétion des cytokines IL-4/IL-13 et IFN- γ /iNOS est inversée jusqu'à 2 semaines post-infection, passant d'une réponse Th2 à une réponse Th1. Ce switch implique aussi bien les lymphocytes T CD4⁺ que CD8⁺ (Leon et al, 2007). D'autres cytokines comme l'IL-13 ou l'IL-10 sont aussi impliquées. L'IL-10 induit la baisse de réponse d'IFN γ et une réponse modérée d'IL-12, elle est souvent décrite comme favorisant la réponse Th2. Or, la réponse IL-12 des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B) est essentielle pour la production d'IFN γ par les lymphocytes T de type Th1 (Rogers et al, 2002), elle-même nécessaire à la production de NO par les CPAs et la destruction du parasite. D'autres cytokines ont aussi été décrites pour la résistance des CPAs au *L. major* et la réponse Th1 comme le TNF α et l'IFN de type I (a/b) ou pour leur sensibilité comme le TGF β . Quant à l'IL-6, il a été proposé qu'elle intervienne aussi bien pour la réponse Th1 que Th2 (Titus et al, 2001).

La réponse IL-10 a rapidement été décrite comme étant induite par le parasite, au détriment de la cellule, dans l'infection par *Leishmania*. En étudiant l'infection par le parasite *L. amazonensis*, il est apparu que les macrophages infectés produisent de l'IL-10, ce qui induit une diminution de la production d'IFN γ , d'IL-12 et de TNF α (Kane & Mosser, 2000) et de l'expression des chimiokines CCL3 et MIP-2 (Ji et al, 2003). Le parasite *L. donovani* aussi induit la sécrétion d'IL-10 par les macrophages, réduisant l'activité de la PKC (Proteine Kinase C) et de la NADPH oxydase à l'origine d'anions superoxyde et de la production de ROS (Bhattacharyya et al, 2001). De plus, la déficience en IL-10 ou le traitement par des anticorps anti-IL-10 conduisent les souris C57BL/6 infectées par *L. major* à développer des lésions qui sont moins importantes et leurs charges parasitaires sont plus faibles (Kane & Mosser, 2000). En absence d'IL-10, les parasites ne persistent plus après guérison (Belkaid et al, 2001). Tous ces résultats montrent donc dans l'ensemble que l'IL-10 contribue à limiter la réponse Th1. En revanche, dans les souris BALB/c, habituellement sensibles à l'infection, la déficience en IL-10 rend les souris moins sensibles, suggérant que dans ces souris l'IL-10 contribue à la réponse Th2 (Suffia et al, 2005).

La production de TGF β est aussi impliquée dans la régulation négative de la réponse immunitaire contre le *Leishmania* (Bogdan et Rölinghoff, 1998). Sa production est dépendante de la prostaglandine E₂ (PGE₂), elle-même dépendante de la cyclooxygénase (Ribeiro et al, 2004). L'expression de PGE₂ et de la COX sont elle-mêmes augmentées suite à l'infection par *L. major* et *L. donovani* (Gregory et al, 2008). Le TGF β peut être produit par les cellules T régulatrices ou agir sur ces mêmes cellules, permettant la mise en place de leurs fonctions suppressives (Marie et al, 2005). Le TGF β peut être produit par d'autres cellules immunitaires et inhibe notamment la production d'IFN γ et la production de TNF α et de ROS dans les cellules NK, les macrophages et les cellules dendritiques.

8. REponse B

i. Rôle négatif de la réponse B

Dans les souris BALB/c, les lymphocytes B contribuent à la sensibilité à l'infection par le *L. major*. En effet, des souris BALB/c sans IgG présentent des lésions et une charge parasitaire moindres, contrairement aux BALB/c normales (Miles et al, 2005). L'addition d'IL-7 (permettant d'amplifier les lymphocytes B) ou le transfert de cellules B conduit à une exacerbation de l'infection. De plus, des souris BALB/c déficientes en lymphocytes B présentent moins de lésions, résistent au parasite et développent une réponse Th1 (Ronet et al, 2008). Ainsi, dans ce modèle, les cellules B contribuent activement à la mise en place d'une réponse Th2 et à la sensibilité des souris BALB/c à l'infection.

De plus, dans les souris BALB/c, en absence du récepteur Fc γ R, liant la portion Fc des anticorps produits lors de l'infection des souris par *L. amazonensis* ou *L. mexicana*, il y a peu de lésions et plus de production d'IFN γ , soulignant un rôle négatif de la réponse anticorps contre le parasite (Kima et al, 2000 ; Thomas et Buxbaum, 2008).

ii. Rôle protecteur de la réponse B

Malgré ce premier rôle favorisant une pathogenèse exacerbée induite par le parasite, d'autres publications décrivent un rôle protecteur des lymphocytes B et des anticorps produits. Après une infection de souris C3H par le parasite *L. major*, l'utilisation d'anticorps anti- μ , qui

bloque la production de lymphocytes B, ne médie plus d'activation de la réponse cellulaire T et les souris normalement résistantes deviennent sensibles (Scott et al, 1986). Les anticorps produits par les lymphocytes B contribuant aussi à l'internalisation du parasite par les cellules dendritiques, il a été observé qu'en absence d'anticorps, les souris infectées présentent des lésions et une charge parasitaire plus élevées ainsi qu'une réponse T et une production d'IFN γ diminuées (Woelbing et al, 2006).

Les réponses cellulaires T et B interviennent toutes les deux pour la résolution de l'infection par *L. amazonensis* (Mukbel, 2006). On peut supposer que la réponse B contribue à la polarisation de la réponse T par la sécrétion de cytokines telles l'IL-6 et l'IL-12.

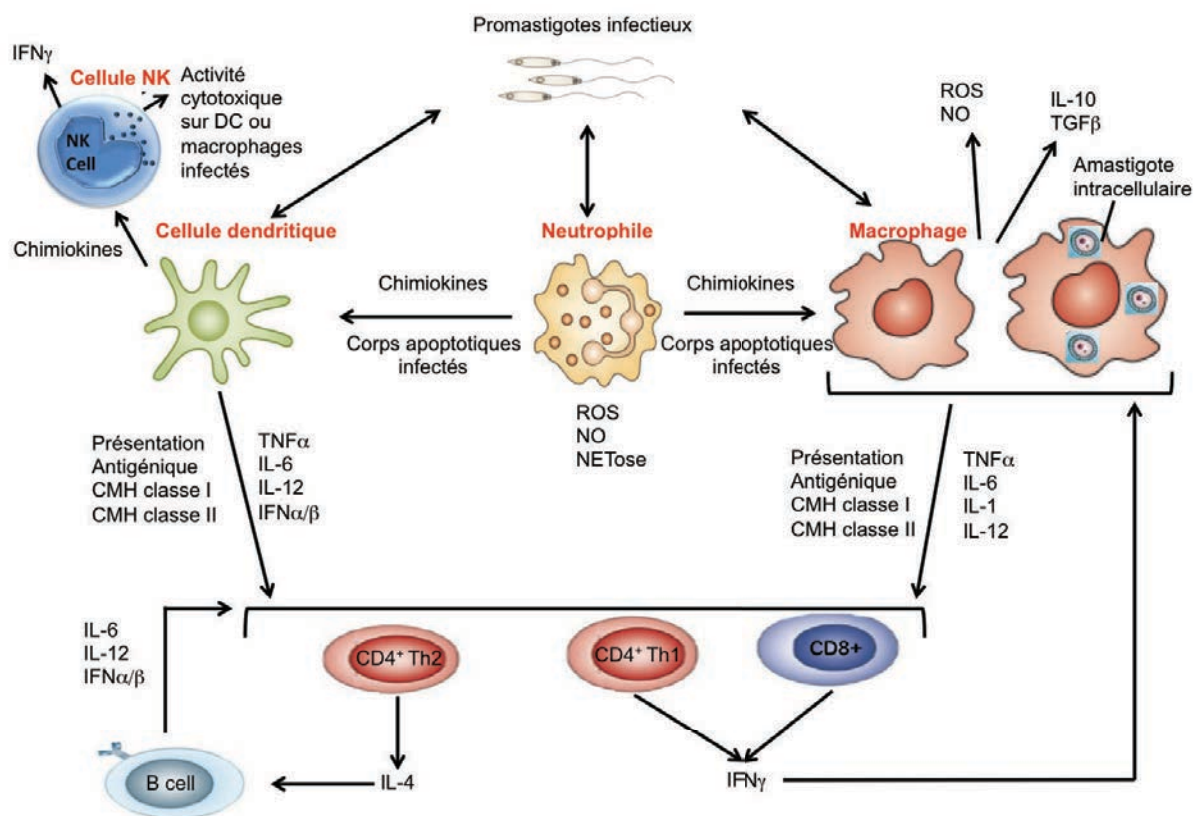


Figure 7

Eléments de la réponse immunitaire des souris C57BL/6 au parasite *Leishmania major*

9. CELLULES SUPPRESSIVES T F $oxp3^+$ CD4 $^+$ CD25 $^+$

Après infection par le *Leishmania major*, les lésions des souris C57BL/6 guérissent spontanément. Alors que la quasi-totalité des parasites est éliminée, de rares parasites survivent cependant au niveau des sites de lésions ou dans les ganglions lymphatiques

(Belkaid et al, 2002). La persistance du parasite *Leishmania major* dans les souris C57BL/6 a impliqué le rôle actif de cellules régulatrices T Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ (Belkaid et al, 2002). CD4 et CD25 sont des protéines membranaires du lymphocyte T alors que Foxp3 est un facteur de transcription spécifique des cellules T régulatrices et dont le maintien de l'expression nécessite le TGFβ (Marie et al, 2005).

Dans les souris C57BL/6, les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ interviennent pour inhiber la réponse des lymphocytes effecteurs CD4⁺ Th1 (Belkaid et al, 2002). En effet, ces cellules régulatrices s'accumulent au niveau du site de l'infection et inhibent la production d'IFNγ par les cellules CD4⁺ Th1, en produisant de l'IL-10 et du TGFβ (Belkaid et al, 2002). Par ailleurs, dans les souris BALB/c sensibles au *L. major*, il a été décrit que les cellules CD4⁺CD25⁺ permettent une régulation négative de l'expression d'IL-4, réduisant la réponse Th2 (Aseffa et al, 2002). D'autres travaux ont de même montré que les souris BALB/c deviennent résistantes à l'infection par *L. major* lorsqu'elles sont déficientes pour CD103, marqueur de surface des cellules T régulatrices CD4⁺ CD25⁺ (Suffia et al, 2005). CD103 est responsable de l'accumulation de ces cellules au niveau du site de l'infection et son expression est régulée par TGFβ et IL-10 (Suffia et al, 2005). Ainsi, les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ peuvent réprimer aussi bien la réponse Th1 que Th2 suite à l'infection par *L. major*, mais selon le fond génétique de l'hôte, leur rôle est différent (Xu et al, 2003).

10. CELLULES B REGULATRICES

Les cellules B régulatrices sont aussi capables de moduler négativement l'expression des cytokines pro-inflammatoires en réponse au parasite *Leishmania major* et contribuent à la mise en place d'une réponse de type Th2 dans ces souris (Ronet et al, 2010).

En réponse au *L. major*, les lymphocytes B produisent de l'IL-10 et sont caractérisés par l'expression de CD5⁺CD1d⁺ alors qu'en réponse au CpG, ils sont plutôt CD5⁺CD1d⁻. Les auteurs soulignent ainsi un phénotype différent de ces cellules en fonction de l'activateur (Ronet et al, 2010).

Cette production d'IL-10 par les lymphocytes B en réponse au *L. major* se fait aussi bien *in vitro* que *in vivo*. *In vitro*, leur production d'IL-10 conduit à la répression de la production d'IL-12 par les DCs (Ronet et al, 2010).

11. CONCLUSION SUR LE ROLE DES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES IMMUNITAIRES DANS LA REPONSE AU PARASITE *LEISHMANIA*

Les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques sont les premières cellules à internaliser le parasite *Leishmania* après infection. Pour les parasites *Leishmania major* et *Leishmania amazonensis* par exemple, les deux formes (pro- et amastigote) du parasite sont capables d'infecter les cellules dendritiques (DCs), les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles (von Stebut et al, 1998 ; Zufferey et al, 2003 ; Carlsen et al, 2013), mais cela n'est pas le cas pour d'autres souches de parasite. Cependant, la transformation du parasite promastigote en la forme amastigote n'a été observée que dans les macrophages (Desjardins et Descoteaux, 1997). Après son internalisation par la cellule, le parasite promastigote peut persister les premières 24 heures dans les neutrophiles (Peters et al, 2008) ou quelques jours dans les cellules dendritiques (Prina et al, 2004). Les neutrophiles pourraient contribuer à une meilleure infection des macrophages et des cellules dendritiques en permettant une entrée silencieuse du parasite par la phagocytose de corps apoptotiques (Laskay et al, 2003) mais cela reste encore discuté. Les neutrophiles, les macrophages et les DCs présentent donc des profils variés quant à la survie du parasite dans le compartiment intracellulaire mais ces cellules contribuent toutes à l'élimination du parasite par la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, TNF α , IL-6) ainsi que de ROS et de NO (Tacchini-Cottier et al, 2000 ; Charmoy et al, 2007 ; Olivier et al, 2012 ; Abou-Fakher et al, 2008). Les macrophages et les DCs interviennent aussi pour amplifier la réponse immune en recrutant d'autres cellules non infectées, par la production de chimiokines (Bhattacharyya et al, 2001 ; Ato et al, 2002). Par leur production d'IL-12, les cellules dendritiques quant à elles sont essentielles à l'activation des cellules NK et leur activité cytotoxique et ont une importante fonction de présentation antigénique pour l'orientation de la réponse des lymphocytes T (Scharton-Kersten et al, 1995 ; Mattner et al, 1997). Cette fonction de présentation antigénique est partagée dans une moindre mesure avec les macrophages.

Dans un second temps, les macrophages et les DCs permettent donc le recrutement des cellules NK et des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (von Stebut et al, 1998 ; Belkaid et al, 2002). L'implication des lymphocytes B reste plus controversée. Ils interviennent dans la bonne orientation de la réponse T (Ronet et al, 2008), la réponse anticorps au parasite *Leishmania* est peu documentée mais semble avoir une part mineure. En effet, dans le cas d'une résistance au parasite, l'activité cytotoxique et la production d'IFN γ par les cellules NK d'une part et l'établissement d'une réponse Th1 par les lymphocytes T d'autre part permet l'élimination du

parasite. L'élimination n'est cependant pas complète puisque l'implication des cellules T régulatrices $CD4^+CD25^+$ et leur production d'IL-10 et de $TGF\beta$ permet une certaine persistance intracellulaire du parasite (Belkaid et al, 2002). Il existe aussi des lymphocytes B régulateurs $CD5^+ CD1d^+$ qui sont impliqués dans la réponse au parasite et qui produisent aussi de l'IL-10, ce dernier permettant l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires (Ronet et al, 2010).

IV- ROLE DE L'ADN ET DE SON RECEPTEUR TLR9 DANS L'INFECTION PAR UN PATHOGENE

A. DECOUVERTE DE SEQUENCES ACTIVATRICES ET INHIBITRICES

Avant même d'avoir découvert l'existence de son récepteur, on a mis en évidence un rôle de l'ADN dans la stimulation de la réponse inflammatoire. En effet, il a été initialement observé que l'ADN bactérien du BCG (*Bacillus Calmette Guérin*), agent de la tuberculose, et des oligonucléotides ADN (oligo-déoxy-nucléotides ou ODN) pouvaient activer les cellules NK (Yamamoto et al, 1992).

Cela a conduit à la mise en évidence de motifs CpG non méthylés dans l'ADN bactérien, stimulateurs des lymphocytes B (Krieg et al, 1995). Différents ODN contenant des motifs CpG (ODN CpG) activaient aussi les lymphocytes B. Mais l'activation n'avait plus lieu lorsque le motif était inversé en GpC ou s'il était méthylé (Krieg et al, 1995). Cette même étude a montré que les séquences CpG les plus stimulatrices étaient entourées en 5' par deux purines (bases A ou G, rassemblées sous la lettre R en code IUPAC) et en 3' par deux pyrimidines (bases C ou T, rassemblées sous la lettre Y en code IUPAC) (Krieg et al, 1995). Ils établissaient ainsi le potentiel immuno-stimulateur du motif RRCGY, le motif optimal pour l'activation de cellules murines étant le GACGTT. Par la suite, un motif optimal a aussi été décrit pour l'activation de cellules humaines, le GTCGTT (Hartmann et al, 2000 ; Bauer et al, 2001).

Par ailleurs, en même temps que la découverte d'ODN CpG stimulateurs, des séquences inhibitrices ont été mises en évidence. L'étude de différents sérotypes d'un même adénovirus, ayant une distribution similaire de dinucléotides CpG, a montré l'existence de sérotypes activateurs et d'autres non-activateurs. Dans le génome de ces adénovirus non-activateurs, l'hexamère stimulateur précédemment décrit (RRCGY) est sous-représenté. Les auteurs ont alors mis en évidence les hexamères les plus représentés dans le sérotype non-activateur et les ont co-incubés en présence d'ADN bactérien ou d'ODN CpG activateurs. Ils ont alors observé une réduction de l'activation *in vitro* et *in vivo*, ainsi qu'une réduction de la réponse Th1. Bien qu'ils contiennent des motifs CpG, les sérotypes de l'adénovirus étaient donc non-activateurs et capables d'inhiber l'activation d'ADN activateur (Krieg et al, 1998).

B. INTERNALISATION ET ACTIVATION CELLULAIRE PAR LE CpG

L'activation par les ODN CpG nécessite leur internalisation dans les cellules. En effet, des ODN immobilisés n'activent plus les lymphocytes B (Krieg et al, 1995) et la lipofection d'ODN stimulateurs, qui sert à augmenter leur internalisation et leur translocation endosomale, augmente l'activation des cellules NK (Yamamoto et al, 1992). Par ailleurs, les ODN non-CpG ou inversés CpG sont aussi internalisés, suggérant que l'internalisation des oligonucléotides par la cellule se fait de manière non spécifique par rapport à la séquence (Häcker et al, 1998 ; Ahmad-Nejad et al, 2002).

Les premiers travaux avec les motifs CpG ont porté sur les lymphocytes B et les cellules NK. En plus de ces cellules, les ODN CpG peuvent aussi activer les lymphocytes T, ainsi que les monocytes, les macrophages et les DCs. Ils conduisent alors à l'activation des voies MAPK et NF-kB, l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-12, IL-6), d'IFN de type 1, d'IFN γ et de ROS (Yamamoto et al, 1992; Halpern et al, 1996 ; Klinman et al, PNAS, 1996 ; Häcker et al, 1998 ; Yi et al, 1998). De plus, l'injection d'ODN CpG dans des souris stimule la mise en place d'une réponse de type Th1 par les DC (Jakob et al, 1998 ; Zimmermann et al, 1998).

C. MISE EN EVIDENCE DE L'IMPLICATION DU TLR9 EN REPOSE AU CpG

Jusqu'en 2000, les observations sur l'activation par l'ADN se font indépendamment de la découverte de son récepteur. Mais on observe alors que l'induction de l'expression de l'IL-12 en réponse au CpG requiert la présence de MyD88 et TRAF6. Ces résultats suggéraient l'implication d'un TLR, différent des TLR2 ou TLR4, qui devait être intracellulaire du fait de la nécessité d'une internalisation du ligand CpG (Häcker et al, 2000). La découverte du rôle du TLR9 dans la réponse au CpG s'est faite la même année grâce à l'obtention de souris déficientes pour le TLR9 (Hemmi et al, 2000). En réponse au CpG, les souris TLR9^{-/-} présentent en effet une perte de prolifération des lymphocytes B et une abolition de la réponse NF-kB par les macrophages et les DCs. Par la suite, avec la technique du BIAcore, il a été montré que le TLR9 peut directement lier un plasmide ADN non méthylé et des ODN CpG (Cornélie et al, 2004 ; Rutz et al, 2004 ; Latz et al, 2007).

D. ETUDE DES PROPRIETES DU TLR9

1. Synthèse et Localisation du TLR9

Le TLR9 est un récepteur qui n'est pas retrouvé à la surface cellulaire mais un récepteur intracellulaire (Ahmad-Nejad et al, 2002 ; Leifer et al, 2004). Il est localisé dans le réticulum endoplasmique avant stimulation (Leifer et al, 2004). Le TLR9 est synthétisé dans le réticulum endoplasmique avec la participation de différentes protéines chaperonnes, dont Grp94 et Prt4A. Ces dernières interagissent avec le TLR9 et lui permettent d'adopter une conformation initiale correcte (Takahashi et al, 2007 ; Liu et al, 2010). Sans conformation correcte, le TLR9 ne sera pas transféré dans les endosomes/lysosomes, où il doit être clivé pour devenir fonctionnel (Park et al, 2008 ; Liu et al, 2010).

La Grp94 (Glucose-Regulated Protein de 94 kDa, ou endoplasmine ou gp96) est un paralogue de la protéine chaperonne Hsp90. Elle est exprimée de manière ubiquitaire et se retrouve comme un homodimère relié par le domaine C-terminal, alors que le domaine N-terminal de la Grp94 peut se lier à l'ATP (Liu et al, 2010). La PRAT4A (ou CNPY3) est aussi une protéine ubiquitaire fortement conservée qui est retrouvée dans le réticulum endoplasmique. La suppression de l'expression de PRAT4A à l'aide de sh-RNA perturbe le trafic du TLR9 du réticulum endoplasmique vers les endolysosomes, car le TLR9 ne réussit pas à adopter une conformation correcte. Ces deux protéines, PRAT4A et Grp94, interagissent ensemble et la présence de chacune d'elle est nécessaire pour la fonction de l'autre et une conformation correcte du TLR9 (Liu et al, 2010).

L'état de glycosylation du TLR9 et son passage par l'appareil de Golgi restent des sujets controversés. Des études soutiennent que le TLR9 ne trafique pas via le Golgi et qu'il reste sensible à la digestion par l'EndoH (Leifer et al, 2004 ; Latz et al, 2004 ; Kim et al, 2008). Mais cette idée est remise en cause par des travaux plus récents montrent le contraire, que le TLR9 est glycosylé par un passage dans l'appareil de Golgi (Ewald et al, 2008 ; Park et al, 2008 ; Chockalingam et al, 2008 ; Avalos et al, 2012).

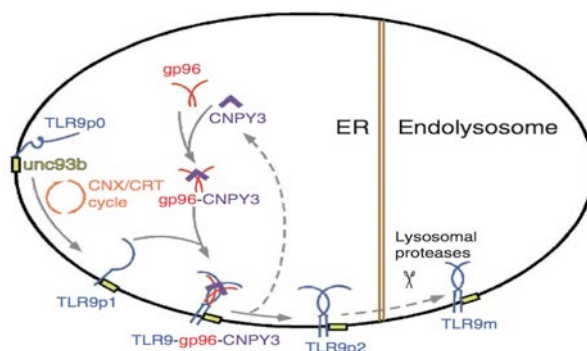


Figure 8 Maturation et translocation du TLR9

(Liu et al, 2010)

Le TLR9 est ensuite essentiellement retrouvé dans le compartiment endosomal (marqué par Rab5) ou lysosomal (marqué par LAMP1), observé par microscopie confocale, et son expression en cytométrie en flux est augmentée par un traitement à l'IFN γ (Ahmad-Nejad et al, 2002). Dans les lysosomes, on retrouve aussi la protéine adaptatrice MyD88 dont le recrutement est observé après activation par le CpG.

Le moment de la relocalisation du TLR9 du RE vers les endosomes/lysosomes est un sujet à controverse. Certains travaux décrivent une relocalisation induite par l'activation par le CpG (Leifer et al, 2004 ; Latz et al, 2004 ; Kim et al, 2008) alors que d'autres décrivent la présence du TLR9 dans les endosomes/lysosomes avant toute activation dans les macrophages et les lymphocytes B (Avalos et al, 2012).

La relocalisation du TLR9 du RE aux endosomes/lysosomes nécessite une région spécifique de son domaine TIR et de son domaine transmembranaire et son interaction avec la protéine UNC93B1 (Brinkmann et al, 2007 ; Kim et al, 2008). Ainsi, des souris mutées pour UNC93B1 sont très sensibles à l'infection par *Trypanosoma cruzi* ou *Leishmania major* (Caetano et al, 2011 ; Schamber-Reis et al, 2013). UNC93B1 est une protéine à 12 domaines transmembranaires que l'on retrouve dans réticulum endoplasmique, très exprimée dans les cellules présentatrices d'antigènes notamment dans les lymphocytes B et les DCs. Dans les DCs et les macrophages, une mutation touchant UNC93B1 (H412R), et appelée la mutation 3d, ne permet plus l'interaction entre UNC93B1 avec le TLR9, mais aussi avec les TLR 3, 7, 11, 12 et 13, qui ne peuvent plus être relocalisés du RE vers les endolysosomes ni induire de signalisation (Brinkmann et al, 2007 ; Kim et al, 2008 ; Lee et al, 2013). UNC93B1 aurait aussi un rôle de régulation de l'accès des différents TLR à leurs ligands dans les

endolysosomes. En effet, les TLR9 et TLR7 peuvent être en compétition pour se lier à UNC93B1, ce dernier se liant plus favorablement au TLR9 (Fukui et al, 2009). Cet effet peut être perdu par la mutation d'un seul acide aminé (D34 : aspartate en position 34), qui est impliqué dans l'interaction entre le TLR et UNC93B1. Les souris qui possèdent cette mutation font une réponse inflammatoire trop importante via le TLR7 et réduite via le TLR9, qui corrèle avec une augmentation ou une réduction de l'association TLR-UNC93B1. En conditions physiologiques, UNC93B1 favorise donc la réponse via le TLR9, au détriment du TLR7 (Fukui et al, 2009).

Plus récemment, dans le TLR9, des résidus acides proches du domaine transmembranaire et localisés dans une région d'environ 35 acides aminés (entre les acides aminés 811 et 839) ont été décrits comme importants pour l'interaction avec UNC93B1 et sa signalisation, mais non pour sa dimérisation (Kim et al, 2013).

2. Maturation et Clivage du TLR9

La réponse aux ODN CpG stimulateurs, qui se traduit par l'activation du NF- κ B et la production de ROS dans les lymphocytes B, monocytes et DCs, peut être inhibée par la bafilomycine A et par la chloroquine (Häcker et al, 1998 ; Yi et al, 1998). Ce sont deux inhibiteurs de l'acidification et de la maturation endosomales : la bafilomycine A bloque les pompes à protons de la membrane endosomale alors que la chloroquine, une base forte, induit un déplacement du pH vers les pH basiques. L'ensemble de ces résultats suggèrerait donc que la signalisation TLR9 nécessitait une maturation endosomale et que la liaison du TLR9 était plus favorable à un pH acide (Ahmad-Nejad et al, 2002 ; Rutz et al, 2004). En effet, la réponse TLR9 fait intervenir des protéases actives en pH acide, telles que les cathepsines B, S et L et l'asparagine endopeptidase (Matsumoto et al, 2008 ; Asagiri et al, 2008 ; Park et al, 2008 ; Sepulveda et al, 2009).

En effet, le clivage du TLR9 a été mis en évidence, le clivage ayant lieu après sa sortie du réticulum endoplasmique et son passage par l'appareil de Golgi (Ewald et al, 2008), entre les régions riches en leucines LRR14 et LRR15, et génère une extrémité N-ter (35 kDa) et C-ter (72 kDa) (Park et al, 2008 ; Ewald et al, 2008). En présence d'un ODN activateur, le TLR9 subit un changement de conformation au niveau de son extrémité C-terminale. Ce changement de conformation lui permet un rapprochement des domaines transmembranaires de chaque monomère (Latz et al, 2007).

Par immuno-précipitation, il a été montré que seul le TLR9 clivé, et non le TLR9 entier, se lie à MyD88 (Ewald et al, 2008). Le fragment C-ter généré par le clivage du TLR9 est de plus suffisant pour induire la signalisation et a une affinité plus grande pour le CpG, que le TLR9 entier (Park et al, 2008). Cependant, par la suite, il a été montré aussi que le fragment N-ter aussi aurait un rôle essentiel dans la signalisation TLR9 et doit rester associé au fragment C-ter après le clivage pour la signalisation TLR9 (Onji et al, 2013). L'affinité du TLR9 pour le CpG dépend aussi du pH. En effet, à des pH acides (entre 4.5 et 6.5), l'affinité du domaine C-terminal du TLR9 est plus forte pour l'ODN CpG qu'au pH physiologique de 7.4 (Rutz et al, 2004).

Par ailleurs, l'étude des protéases impliquées dans la maturation du TLR9 montre qu'il existe une forme intermédiaire du TLR9, entre le TLR9 entier et le TLR9 clivé, dans les macrophages suggérant que le clivage du TLR9 a lieu en plusieurs étapes (Park et al, 2008). Cet intermédiaire n'est cependant pas retrouvé dans les lymphocytes B, suggérant que la maturation est différente dans ces cellules (Avalos et al, 2013). De plus, en l'absence de toute stimulation, le TLR9 clivé est observé plus rapidement dans les lymphocytes B que dans les macrophages (Avalos et al, 2013). Ainsi, selon les types cellulaires, la maturation du TLR9 ne suit pas la même voie ni la même cinétique de clivage.

3. Protéases impliquées dans la maturation du TLR9

i. Cathepsines

Les cathepsines sont des protéases acides parmi lesquelles on retrouve des sérines protéases (Cat A et G), des aspartiques protéases (Cat D et E) et la famille de cystéines protéases la plus grande (dont Cat B, S, L, K, H). Ces protéases diffèrent selon le résidu essentiel (sérine, acide aspartique ou cystéine) qui constitue leur site catalytique. Elles deviennent actives à pH acides, dans les endosomes et les lysosomes. Elles sont synthétisées sous une forme inactive (zymogène) puis deviennent actives par i) une auto-activation due à l'acidification du compartiment endosomal, ii) un clivage de pro-domaine(s) ou iii) un détachement de petites protéines inhibitrices (ex : la cystatine), qui bloque l'activité de la cathepsine (Honey and Rudensky, 2003).

Les cathepsines peuvent se retrouver (Colbert et al, 2009)

i) dans le milieu extracellulaire : certaines peuvent être sécrétées comme la cathepsine B

ii) dans le cytosol : la cathepsine B peut être transloquée des lysosomes vers le cytoplasme en cas d'induction de la mort cellulaire, interagir avec les caspases et intervenir dans l'inflammasome ; les cathepsines L et S ont un rôle fondamental pour l'apprêtement des antigènes peptidiques pour le CMH de classe II ainsi que pour le cheminement et la maturation des CMH de classe II

iii) dans le noyau, la cathepsine L intervient dans la régulation de gènes.

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la cathepsine B (Ca-074-Me) et de la cathepsine L (Cathepsin L inhibitor I) ont mis en évidence leur implication dans des lignées de lymphocytes B et de macrophages en réponse au CpG, dans la signalisation via le TLR9 (Matsumoto et al, 2008). De même, l'utilisation d'un inhibiteur de la cathepsine K a montré son implication dans l'activation de la voie NF- κ B, l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-6) et la maturation de BMDCs (CD40, CD80, CD86) en réponse au CpG (Asagiri et al, 2008). Cependant par la suite, l'implication de certaines cathepsines dans la signalisation via le TLR9 a été controversée.

En effet, dans les macrophages, les CatK et S peuvent cliver *in vitro* le TLR9 entier, générant un fragment d'environ 80 kDa, mais seule l'inhibition de la CatB perturbe la signalisation TLR9, et non celle de CatK ou de CatS, (Ewald et al, 2008). De plus, dans les BMDCs, seules les cellules de souris déficientes en CatL et CatS produisent légèrement moins de TNF α en réponse au CpG, alors que celles déficientes pour CatK ne présentent aucune différence par rapport aux souris contrôles (Park et al, 2008). Ces travaux suggèrent donc une implication partielle des cathepsines (B, S et L) mais des résultats contradictoires pour la CatK.

Par ailleurs, l'inhibition sélective des CatS et CatL conduit à l'apparition d'une forme différente du TLR9, intermédiaire entre le TLR9 entier (120 kDa) et le TLR9 clivé (environ 80 kDa) (Park et al, 2008). L'existence de formes intermédiaires de maturation pour le TLR9 suggère que son clivage a lieu en plusieurs étapes.

ii. Asparagine Endopeptidase

Aussi appelée légumaine, l'AEP est une cystéine protéase lysosomale ubiquitaire, notamment dans les macrophages et les cellules dendritiques. Elle est active en pH acide dans les lysosomes et spécifique des résidus asparagine Asn ou Asp (plus rarement) qu'elle clive spécifiquement au niveau C-terminal (Li et al, 2003). Contrairement aux autres cystéines protéases lysosomales, elle n'est pas inhibée par la leupeptine et l'E-64.

L'AEP est d'abord synthétisé en un précurseur inactif de 56 kDa. Elle est ensuite dirigée vers les endolysosomes où elle peut être activée en plusieurs étapes, selon un mécanisme pH-dépendant. A un pH inférieur à 5, une auto-activation se produit avec le clivage du pro-peptide de 56 kDa en des fragments N- et C-terminal, le peptide C-terminal pouvant en retour servir d'inhibiteur à l'AEP. Une forme pré-mature de l'AEP de 47 kDa est ainsi produite, qui s'autoclive rapidement en une protéine de 46 kDa. Cette dernière est transformée par une protéase encore inconnue pour donner la forme mature de 36 kDa (Manoury et al, 2003 ; Li et al, 2003). L'AEP a notamment un rôle important dans le processing d'antigènes exogènes et leur présentation via le CMH de classe II dans les lymphocytes B (Manoury et al, 2003). Dans les BMDCs, elle est impliquée dans la maturation du TLR9, permettant la production de cytokines via la voie TLR9 (Sepulveda et al, 2009). L'AEP a donc aussi un rôle dans la réponse au CpG, qui se traduit par une augmentation de son activité, en même temps qu'une acidification du milieu endosomal. Après stimulation par le CpG, la co-élution par chromatographie de l'AEP avec le TLR9 clivé et MyD88 corrèle avec la forte augmentation de l'activité AEP observée dans les extraits cellulaires totaux et les endosomes (Sepulveda et al, 2009). La leupeptine a peu d'effets sur la maturation du TLR9, appuyant le rôle de l'AEP dans le clivage du TLR9 et minimisant celui des autres protéases. De plus, l'AEP a aussi un rôle dans la régulation d'autres protéases lysosomales. En effet, des cellules AEP^{ko} présentent un défaut de maturation des cathepsines B et L, dans les BMDCs et les DCs de rate et de foie, mais une augmentation de la cathepsine L et de son activité ainsi que parfois celle de la cathepsine B (Shirahama-Noda et al, 2003). L'ensemble de ces résultats montre l'importance de l'AEP dans la maturation du TLR9 dans les BMDCs.

De manière intéressante, la maturation du TLR9 ne repose pas sur l'AEP dans les macrophages. Ceci pourrait être dû au fait que le pH est beaucoup plus acide dans les macrophages que dans les DCs (respectivement de 5.5 et 6.5) et empêche que la maturation du TLR9 soit dépendante d'une seule protéase.

4. Liaison au CpG et activation du TLR9

La liaison directe du TLR9 à un plasmide ADN non méthylé ou des ODN CpG a pu être montré avec des techniques d'études de liaison entre molécules tels que le BIAcore ou l'AlphaScreen (Cornélie et al, 2004 ; Rutz et al, 2004 ; Latz et al, 2007). De plus, la liaison par le dimère de TLR9 concerne aussi bien un ODN CpG activateur qu'inhibiteur ou un ODN inversé GpC (Latz et al, 2007). Mais seul l'ODN stimulateur conduit à l'activation du TLR9,

qui subit un changement de conformation et un clivage par des protéases (Latz et al, 2007 ; Park et al, 2008).

La capacité de l'ADN pathogène à activer de manière spécifique le TLR9 a rapidement conduit le domaine de la recherche à étudier la possibilité d'utiliser les ODN CpG comme adjuvants, initiateurs de la réponse immunitaire via le TLR9, dans le domaine de maladies infectieuses (virus de l'hépatite B, VIH, virus de la grippe, anthrax), du cancer, de l'asthme, des allergies et des maladies auto-immunes (SLE ou Lupus Erythémateux Systémique) (Krieg, 2006). Chez l'homme, seuls les pDCs et les lymphocytes B expriment le TLR9 (Iwasaki & Medzhitov, 2010). Les lymphocytes B, activés via le TLR9, deviennent plus résistantes à l'apoptose, expriment plus de récepteurs de chimiokines et peuvent sécréter des chimiokines et des cytokines favorisant la mise en place d'une réponse Th1 (Krieg et al, 2002). Chez l'homme, les ODN CpG peuvent donc agir directement sur les pDC et lymphocytes B mais indirectement sur les autres types de cellules, en induisant par exemple une coopération cellulaire. Par exemple, la sécrétion d'IFN de type 1 par des pDCs activés permet une forte production d'IFN γ par les cellules NK et les lymphocytes T (Rothenfusser, 2001). Cependant, quelques études rapportent une réponse TLR9-dépendante au CpG dans d'autres cellules humaines, immunitaires (neutrophiles, monocytes, cellules dérivées de monocytes, lymphocytes T CD4) ou non immunitaires (cellules épithéliales pulmonaires ou intestinales, kératinocytes) (Vollmer & Krieg, 2009).

D'importants travaux ont donc été réalisés pour stabiliser et étudier ces ODN CpG, notamment dans les pDCs et les lymphocytes B. Après avoir établi les séquences les plus optimales pour l'activation du TLR9, la même stratégie que pour le développement de gènes anti-sens a été adoptée pour les ODN CpG avec l'élaboration d'un squelette phosphorothioate (PS) à la place du squelette phosphodiester (PO) habituel de l'ADN. Le squelette PS est modifié au niveau de l'oxygène libre de la liaison diester, qui est remplacé par un atome de soufre.



Figure 9 Squelette phosphodiester et phosphorothioate

(Extrait de Gangloff and Gay, 2008)

Ainsi, l'internalisation des ODN par les lymphocytes B varie selon la nature du squelette, dans l'ordre suivant : ODN entièrement PS > ODN en partie PS en partie PO > ODN entièrement PO (Zhao et al, 1993). De plus, les ODN PS et PO pouvant être en compétition pour leur internalisation, les mêmes voies sont donc impliquées pour ces deux types d'ODN. Par ailleurs, les ODN PS sont plus résistants à la dégradation que les ODN PO et ont une demi-vie augmentée, corrélant avec une résistance accrue aux nucléases (Zhao et al, 1993). Par ailleurs, l'addition de plusieurs nucléotides G (poly-G) permet aussi d'augmenter la résistance aux nucléases (Bishop et al, 1996) et la translocation aux endosomes (Dalpke et al, 2002).

Par ces observations diverses, différents ODN CpG ont été synthétisés pour l'étude du TLR9, variant par leurs séquences, leur squelette et leur structure.

E. DIFFERENTS OLIGONUCLEOTIDES ACTIVATEURS POUR LE TLR9

Quatre classes d'oligonucléotides CpG activateurs ont été décrites :

- CpG de classe A (CpG-A) (Krug et al, 2001) : ces ODN présentent des régions riches en G en 5' et en 3' avec un squelette phosphorothioate sur les extrémités et un squelette phosphodiester palindromique au centre. Les régions riches en G peuvent former des structures multimériques double-brin, les tétrades de G, qui interviennent dans la capacité stimulatrice. Ils induisent une faible maturation des pDCs et une faible prolifération des lymphocytes B mais une sécrétion importante d'IFN α par les pDCs, via IRF-7 (Vollmer et al, 2004). De manière intéressante, la capacité activatrice de cellules NK murines est perdue

lorsque le squelette est entièrement phosphorothioate (Ballas et al, 1996). Dans l'ancienne classification, ces oligonucléotides sont décrits comme les ODN de type D.

- CpG de classe B (CpG-B) : ces oligonucléotides linéaires contiennent la séquence consensus d'activation du TLR9, RRCGY (Krieg et al, 1995), très activatrice des lymphocytes B, des macrophages et des DCs conventionnelles. Mais chez les pDCs, ces ODN induisent une faible activation, peut-être en raison de leur squelette entièrement phosphorothioate. Les CpG-B induisent une réponse Th1 (Jakob et al, 1998). Dans l'ancienne classification, ce sont les ODN de type K.

- CpG de classe C (CpG-C) (Vollmer et al, 2004) : ces oligonucléotides au squelette phosphorothioate sont constitués par des hexamères de CpG stimulateurs proches de l'extrémité 5', reliés à une région riche en T puis à une région palindromique en 3'. Par ces régions palindromiques, les ODN de classe C peuvent former des duplex. Ils présentent une réponse immunitaire intermédiaire entre les CpG-A et CpG-B, capables d'induire une réponse de type Th1 *in vivo* et une forte activation des lymphocytes B et une forte réponse IFN de type 1 dans les pDCs *in vitro*.

- CpG de classe P (CpG-P) (Samulowitz et al, 2010) : ces oligonucléotides présentent deux motifs palindromiques avec un squelette essentiellement phosphorothioate, avec parfois des liaisons phosphodiester seulement pour les dinucléotides CpG, pouvant former des structures multimériques de concatamères (de séquences répétées). Ils produisent beaucoup d'IFN de type 1 et une forte signalisation NF- κ B.

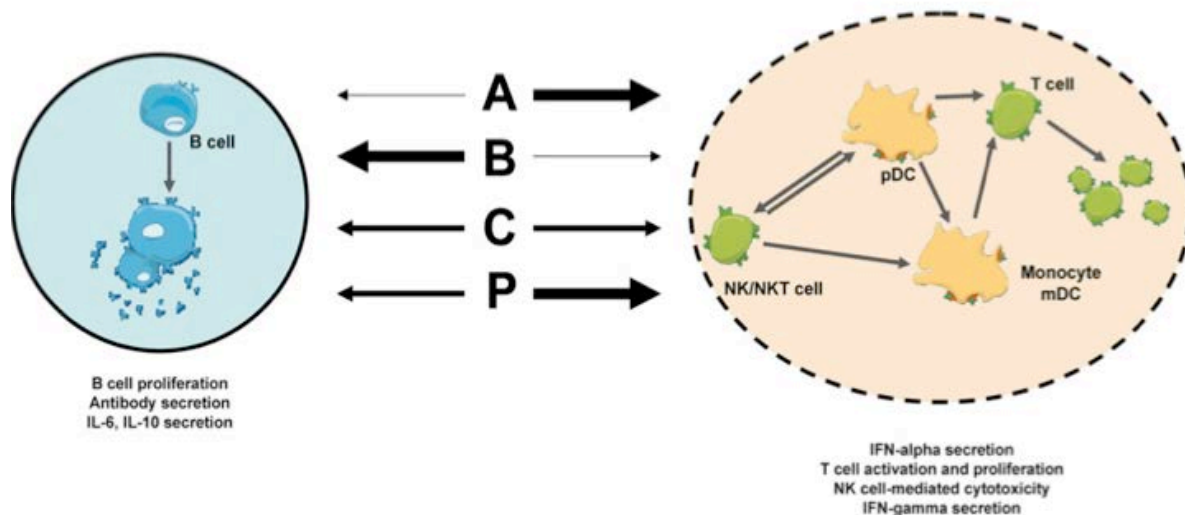


Figure 10 Activation cellulaire par les différentes classes de CpG

(Extrait de Vollmer et al, 2009)

F. ACTIVATION DIFFERENTIELLE SELON L'ODN CpG ACTIVATEUR

Dans les pDCs, la signalisation via le TLR9 est différente selon l'ODN CpG. En effet, les ODN CpG-A et CpG-B induisent des voies de signalisation et une expression d'IFN différentes. Le CpG-A induit une faible maturation des pDCs et une sécrétion soutenue d'IFN α , qui corrèle avec l'expression soutenue d'IRF7, nécessaire à son expression (Kerkmann et al, 2003 ; Honda et al, 2005). Le CpG-B induit une forte réponse de NF-kB et une faible réponse IFN α (Krieg, 2002 ; Kerkmann et al, 2003). Il a été un temps soutenu que le CpG-A est retenu plus longtemps dans les endosomes précoces, associé au complexe MyD88-IRF7, avant d'être transloqué aux lysosomes, alors que le CpG-B serait rapidement transloqué vers les lysosomes (Guiducci, 2006). Mais par la suite, les CpG-A et CpG-B ont été tous les deux retrouvés dans les lysosomes. Cette différence de signalisation entre CpG-A et CpG-B implique l'AP-3 (Adaptor Protein 3). Les protéines APs (AP-1 à AP-4) recrutent des protéines cargo qui assurent le transport vers les différents compartiments endocytaires. Parmi elles, le complexe AP-3 est retrouvé sur les membranes endosomales et peut recruter des cargos qui se déplacent entre les endosomes et les lysosomes. Suite à l'activation par le CpG-A, AP-3 serait capable d'interagir avec le TLR9 clivé, de médier sa translocation aux lysosomes tout en associant IRF7 (Sasai et al, 2010). Cette réponse spécifique du TLR9 au CpG-A pourrait impliquer un motif tyrosine (Y888). La structure de ce motif permet la phosphorylation du TLR9 dans l'extrémité C-terminale issu du clivage, est essentielle pour la production de TNF α et son transport dans les lysosomes (Chockalingam et al, 2011).

De la même manière, une réponse spécifique pour le CpG-B a aussi été décrite. La signalisation TLR9 implique en effet la PKD1 (Protein Kinase D1), qui est une sérine/thréonine protéase, recrutée en réponse à l'ADN bactérien et au CpG-B, et non au CpG-A, dans les DCs, les macrophages et les lymphocytes B (Park et al, 2008). La même équipe a par la suite montré que PKD1 est un élément essentiel de la signalisation TLR via MyD88 pour l'activation des voies MAPK, NF- κ B et l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12), mais non pour la synthèse d'IFN de type 1 (Park et al, 2009), suggérant que la PKD1 devrait être impliquée pour tous les types de CpG activateurs dont les CpG-A.

G. MOTIFS INHIBITEURS

En même temps que la découverte d'ODN CpG stimulateurs, des ODN CpG inhibiteurs ont été mis en évidence. La mise en évidence d'hexamères CpG non stimulateurs et de leur capacité à inhiber l'activation induite par l'ADN bactérien ou par des ODN stimulateurs (Krieg et al, 1998) a ouvert la voie à l'élaboration d'ODN non stimulateurs pour le TLR9. Des oligonucléotides riches en séquences poly G ou en séquences GC peuvent aussi bloquer l'activation des macrophages et la production d'IL-12, induites par l'ADN bactérien (Pisetsky et al, 2000). Par la suite, un motif général minimal, de 11-15 bases de long, a été décrit pour l'élaboration d'ODN inhibiteurs. Il s'agit d'un motif riche en pyrimidines (C ou T), notamment le triplet CCT, qui serait positionné en 5' d'un triplet de G et qui s'écrit 5'-CCNDDNNGGGN-3' (où N représente n'importe quelle base et D les bases A, G et T) (Ashman et al, 2004). Les ODN présentant des répétitions du motif télomérique TTAGGG, qui est retrouvé dans une partie du motif précédent, peuvent aussi bloquer l'activation induite par le CpG (Gursel et al, 2003). Ces oligonucléotides inhibiteurs peuvent avoir un squelette naturel phosphodiester ou phosphorothioate.

Le mode d'action des oligonucléotides inhibiteurs peut être multiple. L'inhibition par des oligonucléotides inhibiteurs conduit à une réduction de la signalisation NF- κ B via le TLR9 dans les lymphocytes B (Lenert et al, 2001). Des phénomènes de compétition ont été observés entre motifs CpG stimulateurs et motifs inhibiteurs pour l'interaction avec le TLR9. En effet, les deux types d'oligonucléotides peuvent se fixer au TLR9, mais seul l'oligonucléotide activateur induit un changement de conformation du TLR9 (Latz et al, 2007), même s'il a été

montré par la suite qu'il existe du TLR9 clivé avant même toute activation (Avalos et al, 2011).

L'ensemble des motifs inhibiteurs a été divisé en plusieurs groupes (Trieu et al, 2006) :

- classe I : elle regroupe des motifs courts riches en répétitions de G, qui inhibe la réponse TLR9 de manière séquence-spécifique et qui peuvent être en compétition pour lier le TLR9.

- classe II : elle est constituée d'oligonucléotides au squelette phosphorothioate présentant des répétitions du motif télomérique. En effet, les séquences riches en motifs TTAGGG peuvent bloquer l'activation induite par le CpG (Gursel et al, 2003).

- classe III : ces oligonucléotides inhibent l'internalisation de l'ADN en raison de séquence polyG qui forment des tétrades à 4 brins.

- classe IV : il s'agit de longs oligonucléotides au squelette phosphorothioate, qui sont des compétiteurs directs de la signalisation TLR9 de manière séquence-indépendante. En raison de leur squelette phosphorothioate, les classes II et IV ne forment parfois qu'une même classe.

H. REMISE EN CAUSE DES MOTIFS ADN CAPABLES D'ACTIVER LE TLR9

1. La méthylation

Le ligand du TLR9 a été initialement décrit comme étant des séquences CpG non méthylé. L'ADN de mammifères présente moins de séquences CpG et leur hyper-méthylation a conduit initialement à expliquer pourquoi l'ADN de mammifère n'était pas stimulateur (Yamamoto et al, 1992 ; Krieg et al, 1995 ; Stacey et al, 1996 ; Halpern et al, Cell Imm, 1996). En effet, l'ADN bactérien est hypo-méthylé alors que l'ADN de vertébré est méthylé à 70 à 80% (Ehrlich et al, 1982). Les dinucléotides CpG sont sous-représentés dans le génome des vertébrés (toutes les 50 à 60 bases), alors qu'ils sont très présents dans l'ADN bactérien (toutes les 16 bases) (mentionné dans Krieg et al, 1998). De plus, la méthylation d'un ODN CpG activateur ou d'un ADN bactérien réduit considérablement l'activité des lymphocytes B (Krieg et al, 1995).

Le concept de la méthylation a cependant été rapidement rediscuté du fait de l'observation que même un ADN hypo-méthylé de souris ne conduit toujours pas à l'activation des

lymphocytes B (Sun et al, 1997). La méthylation seule n'explique donc pas les différences d'activation entre ADN de pathogène et ADN de vertébré.

2. L'importance de la charpente de l'ADN (séquence et structure)

L'importance du squelette ADN (sucre-phosphate) a été mise en évidence dans l'interaction entre l'ADN et le TLR9. En effet, les ADNs n'ont pas les mêmes propriétés selon leur squelette. Le squelette phosphodiester ou phosphorothioate peut être reconnu par le TLR9, avec une plus grande affinité pour le squelette phosphorothioate. Cependant, le squelette phosphodiester a un rôle agoniste alors que le phosphorothioate a un rôle antagoniste (Haas et al, 2008). Par la suite, il a été montré que la restriction du motif CpG ne concerne pas les ODN phosphodiester mais seulement les ODN phosphorothioate (Roberts et al, 2005 ; Yasuda et al, 2006 ; Haas et al, 2008) et que le rajout de motifs CpG au squelette phosphorothioate augmente l'affinité des oligonucléotides pour le TLR9 et fait que l'ODN devient un agoniste activateur (Haas et al, 2008). Il a par ailleurs été observé que des séquences sont plus activatrices ou plus inhibitrices que d'autres séquences (Stacey et al, 2003).

De plus, outre les motifs CpG, d'autres motifs ont été mis en évidence dans l'activation du TLR9, notamment des motifs riches en AT (Shimosato et al, 2006). Ces derniers avaient des structures particulières en boucle et nécessitaient la présence de DOTAP pour activer le TLR9, mais pouvaient aussi activer d'autres senseurs de l'ADN dans le cytoplasme (Sharma et al, 2011).

En raison de ces résultats controversés sur les séquences requises pour l'activation du TLR9, il a été proposé que la discrimination entre l'ADN de pathogène et l'ADN de vertébré dépende de leur localisation par rapport au TLR9.

3. L'accès au TLR9

Alors que l'ADN de mammifère semblait ne pas pouvoir activer le TLR9, il a été montré que ce dernier pouvait activer un TLR9 chimérique, constitué du domaine N-terminal du TLR9 fusionné avec le domaine transmembranaire et le C-terminal du TLR4. Le TLR9 chimérique est donc localisé à la surface cellulaire. Au contraire de l'ADN de mammifère, l'ADN viral n'induit pas la signalisation via le TLR9 chimérique (Barton et al, 2006). En effet, étant encapsidé, l'ADN viral n'est libéré qu'après internalisation du virus et ne peut pas interagir

avec le TLR9 chimérique. Cependant, dans cette étude, la réponse TLR observée suite à la stimulation par l'ADN de mammifère était sûrement due à l'induction d'une signalisation TLR4 (Park et al, 2008). De plus, en forçant la translocation vers les endosomes avec de la DOTAP, les ODN phosphodiester (CpG ou non-CpG) ou l'ADN de vertébré induisent un peu l'activation de DCs et l'augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation (CD40) et de cytokines (IL-6, IFN de type 1) (Yasuda et al, 2005 ; Yasuda et al, 2006).

D'autres résultats similaires ont montré que des oligonucléotides méthylés et non méthylés sont tous les deux internalisés et mais seul l'ODN non méthylé est transporté dans les endosomes et induit la translocation du TLR9 du réticulum aux endosomes. Cependant, en cas de translocation endosomale forcée par des composés lipidiques comme la DOTAP, ces ODN méthylés et non méthylés induisent tous les deux la translocation du TLR9 vers les endosomes (de Jong et al, 2010). Ces résultats montraient l'ADN non méthylé ne pouvait pas recruter le TLR9 dans les endosomes, car il n'atteignait pas lui-même les endosomes. Là aussi, la discrimination ne se fait donc pas au niveau du recrutement du TLR9, mais plutôt au niveau de l'accès aux endosomes (de Jong et al, 2010).

Une explication possible pouvant faciliter l'accès de l'ADN aux endosomes et réduire sa sensibilité aux DNases était l'implication d'anticorps ou de facteurs protéiques.

I. IMPLICATION DE FACTEURS ASSOCIES A L'ADN POUR L'ACTIVATION DU TLR9

1. Anticorps

Aujourd'hui, nombreux sont les facteurs (protéines, peptides, etc.) qui semblent impliqués dans l'accès de l'ADN au TLR9. Le premier exemple a été démontré par l'étude de la maladie auto-immune où l'on observait une forte réaction inflammatoire contre l'ADN du soi. En effet, outre l'internalisation d'ADN seul, il existe aussi des complexes immuns d'ADN liés à des anticorps (ADN-Ac), qui peuvent activer les cellules immunitaires via le TLR9. Cela a particulièrement été décrit dans le cadre de la maladie auto-immune du lupus erythémateux systémique (SLE) où la présence de complexes immuns constitués d'ADN liés à des anticorps peut activer des pDCs à sécréter de l'IFN α en impliquant un récepteur FcR (Båve et al, 2003). De même, des complexes immuns (constitués d'anticorps liés à de la chromatine du soi) induisent la prolifération et la production d'IFN α par des lymphocytes B auto-réactifs via le récepteur des lymphocytes B (BCR) (Leadbetter et al, 2002 ; Uccellini et al, 2008) et la

réponse IL-12 et TNF α des DCs via un Fc récepteur pour les DCs (Boulé et al, 2004). Dans les deux cas, les réponses cellulaires sont dépendants des voies MyD88 et TLR9 (Uccellini et al, 2008; Boulé et al, 2004).

Récemment, des travaux ont montré que les voies de phagocytose et d'autophagie pouvaient coopérer à la réponse à des complexes immuns contenant de l'ADN et impliquer la signalisation du TLR9. L'autophagie est une voie de dégradation permettant à la cellule de dégrader ses éléments cytoplasmiques dans ses lysosomes. Mais elle intervient aussi dans la réponse immunitaire innée, par le contrôle de l'inflammation et la dégradation de pathogènes internalisés, et dans le contrôle de l'immunité adaptative, par le contrôle de la présentation antigénique et des réponses cytokines/chimiokines (Deretic et al, 2013). Ainsi, les auteurs montrent que suite à l'activation par des complexes ADN-Ac, l'internalisation du complexe par le récepteur FcR induisait le recrutement du TLR9 et de UNC93B1 dans le phagosome selon un mécanisme ADN-indépendant mais PI3K-dépendant, suggérant le rôle seul de la liaison de l'anticorps avec le récepteur FcR (Henault et al, 2012). Par la suite, l'activation de la signalisation TLR9 par l'ADN induit la maturation du phagosome avec des lysosomes issus de la voie de l'autophagie et conduit à l'activation d'IRF7 pour la synthèse d'IFN α (Henault et al, 2012).

2. LL37

Le peptide LL37 est un peptide cationique antimicrobien, issu du clivage de la cathélicidine par une sérine protéase, que l'on retrouve chez l'homme. Son équivalent murin est le peptide CRAMP. Il est sécrété par les kératinocytes de la peau en cas de psoriasis. Dans ce cas, par ses groupements cationiques, le LL37 peut interagir avec les groupements phosphates anioniques contenus dans l'ADN du soi et favoriser son accès au TLR9 dans les pDCs. Les complexes LL37-ADN deviennent en effet plus résistants à la DNase que l'ADN seul. De plus, le LL37 permet de retenir l'ADN dans les endosomes précoces, où l'ADN peut induire une signalisation via le TLR9 et initier une réponse IFN de type 1 (Lande et al, 2007).

Le LL37 peut aussi s'associer avec de l'ARN et induire la production d'IFN α via la signalisation TLR7 ou TLR8 dans les pDCs. En cas de psoriasis, des complexes LL37-ARN sont en effet aussi retrouvés (Lande et al, 2007).

De plus, la réponse des pDC via le TLR9 et leur production d'IFN de type 1 peut aussi impliquer des neutrophiles, qui peuvent entrer en NETose et libérer de l'ADN lié à des

peptides comme la SLPI (secretory leukocyte proteinase inhibitor) ou la NE (neutrophil elastase) (Skrzeczynska-Moncznik et al, 2012). SLPI est un peptide cationique antimicrobien d'environ 12kDa, inhibiteur de sérines protéases, telles que la neutrophile élastase ou la cathepsine G. Il serait un facteur limitant de l'inflammation générée par des protéases à sérines, notamment au niveau épithélial ou dans les muqueuses (Doumas et al, 2005). Produite par de nombreux types cellulaires dont les cellules épithéliales et les neutrophiles, SLPI est capable d'interagir avec l'ADN génomique et d'entrer en compétition avec des facteurs de transcription comme la p65, contribuant à inhiber la voie NF-kB (Taggart et al, 2005). Cependant, en association avec l'ADN et l'élastase, il induit l'activation des pDCs via le TLR9. Les ADN, NE et SLPI seuls n'ont pas d'effet (Skrzeczynska-Moncznik et al, 2012).

3. HMGB1

La protéine HMGB1 (High Mobility Group Box 1) est une protéine nucléaire associée à la chromatine au niveau du sillon mineur de l'ADN, qui intervient dans la régulation de l'expression des gènes. Elle a la capacité de courber ou relâcher l'ADN et ainsi de jouer sur l'affinité des facteurs de transcription à reconnaître l'ADN. Sa liaison sur l'ADN se fait sans spécificité de séquence, qu'il soit simple ou double brin, mais il a plus d'affinité pour un ADN avec des structures particulières qu'un ADN linéaire (Jaouen et al, 2005).

HMGB1 présente deux domaines : la boîte A (avec une fonction régulatrice) et la boîte B (fonction effectrice, pour l'induction de sécrétion de cytokine), avec un C-terminal acide. Elle peut être libérée en cas de nécrose ou sécrétée en cas d'apoptose ou de stimulation. En cas de stimulation des pDCs et des cDCs par le CpG, HMGB1 est transloqué du noyau vers le cytoplasme avant d'être sécrétée. Différents récepteurs ont été décrits pour HMGB1, notamment le TLR2, le TLR4, RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-Products) (Bianchi & Manfredi, 2007).

La protéine HMGB1 peut se lier aussi bien au CpG qu'au TLR9. Des complexes HMGB1-CpG ont été observés *in vitro* et des complexes HMGB1-TLR9 ont été localisés dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Ivanov et al, 2007). HMGB1 n'est pas essentiel à la réponse CpG, puisque des cellules dérivées du foie fœtal et immortalisées (iFLDCs), déficientes en HMGB1 et exprimant le TLR9, présentent toujours une réponse au CpG seul mais beaucoup plus faible que chez des souris contrôles. HMGB1 est requis pour l'expression optimale de cytokines et d'iNOS en réponse au CpG DNA (Ivanov et al, 2007 ;

Yanai et al, 2009). L'addition de HMGB1 au CpG augmente la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type 1 via l'activation du TLR9, comparé au CpG seul (Ivanov et al, 2007). En accord avec ces données, il a été démontré dans des souris invalidées pour HMGB 1, 2 et 3 que l'absence des protéines HMGB empêche l'activation du TLR3, TLR7 et TLR9 par leur ligand respectif. Les protéines HMGB sont des sentinelles universelles de la réponse innée aux acides nucléiques (Yanai et al, 2009).

HMGB1 peut provenir aussi bien du noyau que du milieu extracellulaire, avant d'aller se lier au CpG. Elle accélère la formation d'un complexe CpG-TLR9 et la relocalisation du TLR9 du réticulum endoplasmique vers les endosomes (Ivanov et al, 2007). HMGB1 se lie différemment aux ODN CpG-A et CpG-B, avec une interaction préférentielle avec le CpG-A, car ce dernier présente des structures multimériques alors que le CpG-B est linéaire (Tian et al, 2007). L'interaction de HMGB1 aux CpG implique aussi une interaction avec le récepteur RAGE. Le complexe augmente alors la réponse cytokine des pDCs et des lymphocytes B via la signalisation TLR9, par rapport au CpG seul. L'interaction de et RAGE le TLR9 a lieu seulement en présence de CpG (Tian et al, 2007).

HMGB1 et RAGE interviennent aussi dans l'activation par des complexes immuns contenant de l'ADN. En effet, HMGB1 peut lier de l'ADN ou de la chromatine, complexé à des anticorps, et induire l'activation de lymphocytes B auto-réactifs (Tian et al, 2007). Par ailleurs, dans le sérum de patients atteints de lupus érythémateux systémique (SLE), il a été observé que la sécrétion d'IFN α peut être inhibée avec des anticorps contre les protéines HMGB1 (High Mobility Group Box Protein 1) et RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-Products) (Tian et al, 2007).

4. Granuline

Il s'agit d'une protéine riche en cystéines et fortement glycosylée, qui potentialise la réponse au CpG par le TLR9. Elle peut interagir avec le TLR9 entier dans une lignée de macrophages et a la capacité de se lier au CpG et de le délivrer dans le compartiment endosomal. L'addition de son précurseur (la progranuline) permet d'augmenter la sécrétion de TNF α en réponse au CpG. En effet, les souris déficientes pour la granuline montrent une réponse TNF α plus faible, qui peut être récupérée par l'addition de progranuline. La granuline reconnaît les oligonucléotides sans spécificité de séquence et peut aussi lier des oligonucléotides inhibiteurs (Park et al, 2011).

5. CD14

CD14 est une protéine soit soluble soit ancrée dans la membrane avec un glycoposphatidylinositol. Elle présente des régions riches en leucines comme les TLRs. Elle interagit de manière constitutive avec certains TLRs, en interagissant directement non seulement avec le TLR4 mais aussi avec son ligand, le LPS. Le CD14 peut se lier à d'autres TLRs, dont le TLR7 ou le TLR9. Ainsi, le LPS (ligand du TLR4), les oligonucléotides CpG (ligand du TLR9) et l'imiquimod (ligand du TLR7) peuvent entrer en compétition pour se lier au CD14. D'autres ligands, tels que les acides nucléiques (ARN ou ADN) peuvent se lier au CD14. Les BMDMs ou BMDCs de souris déficientes pour le CD14 répondent moins à l'imiquimod ou au CpG, avec une expression et une sécrétion réduites de cytokines pro-inflammatoires (Baumann et al, 2010).

J. IMPLICATION DU TLR9 DANS LES INFECTIONS PAR D'AUTRES PARASITES

1. TLR9 et ADN de *Trypanosoma cruzi* et *brucei*

L'ADN de *Trypanosoma cruzi* et de *Trypanosoma brucei* sont capables d'activer les macrophages et les cellules dendritiques (Shoda et al, 2001). Cette activation est TLR9-dépendante et augmentée en présence de DOTAP (Drennan et al, 2005 ; Bartholomeu et al, 2008).

Dans la réponse contre le *Trypanosoma cruzi*, l'implication de différents TLR (TLR2, TLR4, TLR9) a été démontré *in vivo* et *in vitro* (Campos et al, 2004 ; Bafica et al, 2006). Les TLR2 et TLR9 coopèrent même entre eux dans la réponse contre le parasite. En effet, alors que les souris déficientes pour le TLR9 présentent une légère augmentation de la charge parasitaire et celles pour le TLR2 ne montrent pas de différence, les souris déficientes pour le TLR9 et TLR2 simultanément présentent des charges parasitaires significativement plus élevées que celles déficientes pour le TLR9 seul (Bafica et al, 2006). Par la suite, il a été démontré que l'ADN de *T. cruzi* colocalise avec le TLR9 et le marqueur lysosomal LAMP-1 (Bartholomeu et al, 2008). L'étude de l'implication du TLR9 dans la réponse au *T. cruzi* a aussi révélé que son génome contient des motifs CpG activateurs qui, de manière surprenante, sont situés dans

des séquences particulières codant pour des rétrotransposons ou des gènes codant pour des glycoprotéines (Bartholomeu et al, 2008).

2. TLR9 et ADN de *Plasmodium falciparum*

De manière surprenante, il a été découvert que l'ADN de l'agent de la malaria, *Plasmodium falciparum*, peut induire la signalisation du TLR9. En réalité, l'activation du TLR9 par l'ADN du *P. falciparum* dépend de son interaction avec l'hémozoïne, qui le transporte aux endosomes (Parroche et al, 2007). L'hémozoïne est synthétisé par le parasite dans les érythrocytes, et résulte de l'activité parasitaire pour contrer la réponse oxydante de l'érythrocyte en transformant l'hème de l'hémoglobine en un crystal insoluble. Bien qu'il ait été démontré auparavant que l'hémozoïne seul pouvait activer le TLR9 (Coban et al, 2005), en réalité il active et interagit avec le TLR9 que lorsqu'elle est liée à l'ADN (Parroche et al, 2007). Comme la DOTAP, elle permettrait alors à l'ADN du parasite à avoir accès au TLR9 dans le compartiment endosomal pour induire son activation (Parroche et al, 2007). D'autres protéines telles que l'histone et d'autres protéines nucléaires, liées à l'ADN de *P. falciparum* et provenant du parasite, peuvent aussi permettre l'activation des cellules via le TLR9, alors que l'ADN seul ou l'histone seule n'induit pas d'activation (Gowda et al, 2011).

La faible activation TLR9 par le génome du parasite *P. falciparum* peut s'expliquer par son faible contenu en motifs CpG. Quasiment la totalité des motifs CpG retrouvés dans son génome ressemblent aux motifs CpG de la classe B, formés autour de la séquence RRCGY, et les deux tiers de ces motifs sont localisés dans les régions sous-téломériques et dans des gènes codant pour des antigènes caractéristiques du parasite (tels PfEMP1) (Parroche et al, 2007). En étudiant sa richesse en bases AT (environ 80%) et le motif immuno-stimulateur ATTTTAC (Shimosato et al, 2006), il apparaît que ce motif est très présent (plus de 6000 fois) dans le génome du parasite et qu'il cause la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type 1 (Sharma et al, 2011). La réponse est médiée par des senseurs cytosoliques de l'ADN impliquant STING, TBK1 et IRF3-IRF7 et ne concerne le TLR9 que lorsque la translocation endosomale de l'ADN du parasite est forcée, en présence de DOTAP par exemple (Sharma et al, 2011).

3. TLR9 et ADN de *Toxoplasma gondii*

L'implication de différents TLR a été démontrée dans la réponse contre le parasite *Toxoplasma gondii* dont les TLR2 et TLR4 contre ses molécules phospho-glyco-conjuguées de surface (Debierre-Grockiego et al, 2007), les TLR 7 et TLR9 contre l'ARN et l'ADN du parasite (Andrade et al, 2013) et les TLR11 et TLR12 contre la profiline, une protéine se liant à l'actine et participant au fonctionnement du cytosquelette (Yarovinsky et al, 2005 ; Koblanski et al, 2013). Cependant, alors que les souris déficientes pour MyD88 sont très sensibles au parasite *T. gondii*, les souris déficientes pour les TLR2 et TLR4 présentent une sensibilité limitée. Il s'agit surtout des souris déficientes pour les TLR endosomaux (TLR7, TLR9 et TLR11) qui présentent une grande sensibilité au parasite, suggérant que les TLR endosomaux auraient un rôle plus important que les autres TLR (Andrade et al, 2013).

HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE LA THESE

Dans un modèle de souris C57BL/6, l'équipe avait précédemment montré que le récepteur TLR9 était impliqué dans la résistance à l'infection par *Leishmania major*. Les souris TLR9^{-/-} sont en effet plus sensibles à l'infection. Au niveau du site de l'infection, dans les ganglions drainants, des différences dans l'expression des cytokines entre les lignées C57BL/6 et TLR9^{-/-} indiquent que l'établissement d'une réponse Th1 est retardée dans la lignée TLR9^{-/-} (Abou Fakher et al, JI, 2009).

Le rôle précoce du TLR9 dans la réponse immunitaire contre *L. major* a été mis en évidence dans les cellules dendritiques (DCs) de souris. *In vitro*, le parasite *L. major* induit l'expression de molécules de co-stimulation (CD40 et CD80) et de cytokines pro-inflammatoires dans les cellules dendritiques (DCs) de C57BL/6 mais pas dans celles de TLR9^{-/-}. Le composant du parasite capable d'activer la signalisation TLR9 est l'ADN génomique de *L. major*. Il s'agit d'une activation spécifique par l'ADN du parasite puisque les ADN de vertébrés seuls sont incapables de stimuler les DCs.

Dans la première partie, nous avons entrepris de déterminer les propriétés de l'ADN de *L. major* lui permettant d'induire l'activation du TLR9. Deux hypothèses ont été testées :

- L'implication de la voie d'internalisation de l'ADN dans les cellules.
- L'importance de la séquence et de la structure de l'ADN du parasite.

On considère aujourd'hui que l'activation du TLR9 ne dépend pas uniquement de son ligand mais de cofacteurs capables d'interagir avec le TLR9 ou avec l'ADN. De plus, alors que le CpG non méthylé avait été décrit comme l'élément activateur du TLR9, il a été proposé par la suite que l'activation du TLR9 repose en réalité sur la charpente désoxyribose (constituée de liaisons phosphodiester), indépendamment des bases associées. Enfin, l'ADN endogène n'ayant pas accès au TLR9, cela protégerait la cellule d'une réaction contre le soi, et les voies d'accès au TLR9 pourraient donc jouer un rôle essentiel dans l'activation par l'ADN de parasite.

Par ailleurs, l'activation du TLR9 nécessite son clivage par des protéases et s'accompagne d'une maturation et d'une acidification du pH endosomales. En effet, alors que tous les deux

ont la capacité de lier le TLR9, un ADN activateur induit le changement de conformation du TLR9 contrairement à un ADN non activateur. Il avait donc été proposé que la stimulation par un ADN activateur induit le clivage du TLR9. Mais par la suite, l'existence d'un TLR9 clivé présent avant toute activation a aussi remis en cause la nécessité de la stimulation par l'ADN activateur pour que le clivage ait lieu.

Dans la seconde partie, notre objectif était de discriminer le rôle des macrophages et des cellules dendritiques dans la réponse immunitaire à l'infection via la signalisation du TLR9, grâce à l'existence de souris déficientes pour différentes protéases intervenant dans la maturation du TLR9 (AEP et CatL, CatB, CatS).

L'asparagine endopeptidase (AEP) et les cathepsines (Cat) sont impliquées dans le clivage du TLR9. L'AEP joue un rôle important dans les DCs, elle clive le TLR9 à un pH 5.5. En revanche, dans les macrophages, le pH est plus acide et optimal pour la cathepsine L (CatL), alors que le rôle de l'AEP n'est pas essentiel. Plusieurs protéases peuvent intervenir dans la maturation du TLR9. A côté de la cathepsine L dans les macrophages, d'autres cathepsines dont les cathepsines B (CatB) et S (CatS) peuvent aussi être impliquées.

PARTIE 1

HMGB1 is involved in TLR9-dependent dendritic cell activation by *Leishmania major* but not vertebrate DNA

PRESENTATION

Dans la première partie, notre objectif a été d'étudier les mécanismes impliqués dans le rôle protecteur de l'ADN de *L. major* via le TLR9 et l'absence d'activation du TLR9 par l'ADN de vertébré. Nous avons deux hypothèses pour rendre compte de l'activation spécifique du TLR9 par l'ADN de *L. major*:

- Est-elle dépendante de l'internalisation de l'ADN dans la cellule ?
- Est-elle liée à la séquence ou à la structure de l'ADN du parasite ?

Pour comprendre le comportement différent du TLR9 face à l'ADN de parasite et l'ADN de vertébré, nous avons étudié les caractéristiques ces ADN quant à :

- La taille du génome. L'ADN de *L. major* (32.8 Mb) est 100 fois plus petit que l'ADN génomique de souris (3400 Mb), nous avons réduit les ADN génomiques de *L. major* et de souris à la même taille par sonication, pour ainsi comparer les propriétés de l'ADN de parasite et l'ADN de vertébré lorsqu'ils sont entiers ou soniqués.
- L'internalisation de l'ADN génomique par les cellules dendritiques. Nous avons suivi l'internalisation des deux types d'ADN dans les cellules dendritiques par deux techniques différentes : la microscopie confocale et la cytométrie en flux.

N'ayant observé de différences entre l'ADN de parasite et l'ADN de vertébré, nous nous sommes intéressés à l'implication de facteurs protéiques favorisant l'accès au TLR9.

Avant de nous focaliser sur HMGB1, considéré comme sentinelle de la réponse innée aux acides nucléiques, nous avons constaté une synergie entre l'ADN de parasite et des facteurs comme LL37, SLPI et HMGB1 pour l'activation via TLR9. Le constat d'une fixation accrue

de HMGB1 sur l'ADN de *L. major* indiquait des différences entre les ADN de *L. major* et celui des vertébrés.

Cela nous a conduit à étudier la compétition entre ADN de parasite et ADN de vertébré pour la signalisation via le TLR9. Nous avons alors constaté que l'ADN de *L. major* et l'ADN de vertébré pouvaient être en compétition pour l'activation des cellules dendritiques comme cela avait été observé entre des oligonucléotides (ODN) activateurs et l'ADN de vertébré.

L'étude des génomes des *Trypanosomatidae* et des vertébrés, leur différente sensibilité à la DNase et leur contenu en motifs activateurs ou inhibiteurs pour le TLR9 nous a convaincu du rôle de la séquence dans l'activation du TLR9, sans indiquer s'il s'agit d'un effet direct ou indirect par le biais de cofacteur.

En parallèle, nous avons entrepris d'étudier la colocalisation des différents ADN avec le TLR9 et de suivre leur migration dans les endosomes et les lysosomes, lieux de la maturation du TLR9. De plus, nous voulions aussi discriminer l'impact de l'ADN de parasite et de vertébré sur la maturation du TLR9. De nombreuses expériences ont été faites pour cela. Malheureusement, l'absence d'un anticorps spécifique pour le TLR9 a été un réel obstacle. Ces travaux restent en cours et sont présentés dans l'annexe de la 1^e partie.

HMGB1 is involved in TLR9-dependent dendritic cell activation by *Leishmania major* but not vertebrate DNA

Short title

Activation of TLR9 by *Trypanosomatidae* DNA

Erin M. Khan^{*,#}, Chloé Borde^{*,#}, Eduardo P.C. Rocha^{†,‡}, Sophie Goyard[§], Véronique Mériaux^{*}, Vincent Maréchal[¶], Jean-Marc Cavaillon^{*}, Bénédicte Manoury^{||}, Noëlle Doyen^{*}

* Institut Pasteur, Département Infection et Epidémiologie, Unité Cytokines et Inflammation, 28 Rue du Docteur Roux, 75015 Paris, FRANCE;

† Institut Pasteur, Département Génomes et Génétique, Unité de Génomique Evolutive des Microbes, 28 Rue du Docteur Roux, 75015 Paris, FRANCE;

‡ CNRS UMR3525, 28 Rue du Docteur Roux, 75015 Paris

§ Institut Pasteur, Département Infection et Epidémiologie, Laboratoire des Processus Infectieux à Trypanosomatidés, 25 Rue du Docteur Roux, 75015 Paris, FRANCE;

¶ Centre de Recherche des Cordeliers, UMRS 872 - IUC, 15 rue de l'école de Médecine, 75006 Paris, FRANCE;

|| INSERM U1151, Hôpital Necker-Enfants Malades, 75015 Paris, FRANCE;

These authors contributed equally to this work.

² **Corresponding author** : Dr. Noëlle Doyen, Institut Pasteur, Département Infection et Epidémiologie, Unité Cytokines et Inflammation, 28 Rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France. E-mail: ndoyen@pasteur.fr

ABSTRACT

Leishmania major parasite infection is partly controlled by TLR9 as TLR9-deficient mice do not respond to this parasite. *L. major* DNA activates dendritic cells (DCs) in a TLR9-dependent manner whereas vertebrate DNA does not. Here we observed that the immunostimulatory property of *L. major* DNA is shared by other *Trypanosomatidae* DNAs, suggesting this is a general trait of these parasites. Lack of stimulation by vertebrate DNA is not due to its limited cellular uptake. To determine the mechanism underlying this differential activation, we investigated whether cofactors in DCs were involved in TLR9-dependent activation by DNA. DCs activation by *L. major* DNA allowed nuclear-cytoplasmic translocation of High-Mobility Group Box protein 1 (HMGB1) in DCs prior to its secretion. HMGB1 enhanced TLR9 activation by *L. major* DNA but not by vertebrate DNA. Furthermore, *L. major* and vertebrate DNA differed in their HMGB1 binding and DNase sensitivity. Analysis of genomic DNA sequences revealed that vertebrate genomes over-represent inhibitory and under-represent stimulatory sequences, whereas *Trypanosomatidae* genomes display the inverse trends. This suggests selection acting for recognition of parasite sequences by TLR9 and for neglecting the organism own DNA. Accordingly we show that vertebrate DNA inhibits TLR9 activation by *L. major* DNA. Our results show that properties intrinsic to DNA contribute to the discrepancy between *Trypanosomatidae* and vertebrate DNA regarding TLR9 activation.

INTRODUCTION

Toll-like receptors (TLRs) play a crucial role in the recognition of invading pathogens and the subsequent activation of innate immune responses. Several studies revealed a role for intracellular TLR9 in host resistance to protozoan parasites infection including *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and Leishmania (1-6). Previously, it was shown that DNA from *L. major* stimulates TLR9 signaling in dendritic cells (DCs). Importantly, DCs activation did not occur with DNA isolated from vertebrate organs, suggesting that this activation is specific for *L. major* DNA (7).

The lack of immunostimulatory activity by vertebrate DNA has been explained by a combination of several factors such as CpG suppression, CpG methylation, presence of inhibitory motifs and saturable amount of DNA uptake (8, 9). However, the DNA sequences required for TLR9 activation are controversial, as studies have shown conflicting results regarding the nature of the DNA backbone, the route of DNA uptake and the cell type (10, 11). Until recently the prevailing paradigm was that TLR9 recognizes unmethylated CpG motifs, which are abundant in bacterial DNA but relatively scarce in mammalian DNA (12). The idea that stimulatory properties of DNA correlate solely with the lack of CpG methylation may be an over simplification, as hypomethylated mouse DNA fail to activate B cells (13).

Several independent studies have demonstrated that the dependence on CpG motifs for TLR9 activation is restricted to synthetic phosphorothioate (PS) oligonucleotides and that natural phosphodiester (PO) oligonucleotides bind and activate TLR9 via the 2'-deoxyribose backbone in a sequence-independent manner (10, 14-16). This result was consistent with the concept that the phosphodiester backbone acts per se as a TLR9 agonist. Despite the agonist role of PO, some oligonucleotides sequences are stimulatory and others are inhibitory for the TLR9 receptor (9, 12). Optimal oligonucleotide sequences for TLR9 inhibitory activity were investigated either with PO or PS revealing a large range of activity in biological assays (16). Therefore, it has been proposed that discrimination between microbial and self DNA is dependent primarily on the colocalization of DNA and TLR9 in endolysosomes rather than on a chemical specificity of the receptor for microbial ligands (15, 17). Pathogen-derived DNA may specifically access the TLR9-expressing endosomal compartment in the course of infection whereas host derived DNA may not.

However, it has been shown that plasmacytoid dendritic cells (pDCs) can respond to self DNA via TLR9 signaling since they reached the endocytic compartment due either to circulating auto-antibodies in systemic lupus erythematosus (18) or to the antimicrobial peptide LL37 in psoriasis (19). Other proteins which directly bind to DNA are also involved in endosomal TLR activation such as High Mobility Group Box1 (HMGB1), granulins and CD14 which promote the selective uptake of nucleic acids (20-23). Cofactors such as UNC93B1 are also required for TLR9 localization, folding and trafficking from the endoplasmic reticulum to endolysosomes (24, 25). Once in the endosomes/lysosomes, TLR9 is cleaved by proteases in these acidic compartments to induce signaling (26-28).

In this work, we enquired on the molecular basis of the differences between *Trypanosomatidae* and vertebrate DNA (both eukaryotic DNAs) regarding TLR9 stimulation. We investigated the uptake of *L. major* and vertebrate DNA in DCs to assess whether the absence of stimulation by vertebrate DNA was due to its limited access to endosomal compartments. We addressed the possibility that proteins expressed in DCs could interact with DNA and promote TLR9 activation by *L. major* DNA. HMGB1 is a nuclear protein which is translocated to the cytoplasm and subsequently secreted by stimulated immunocompetent cells as macrophages or dendritic cells (29). We focused on this protein since it has been demonstrated that HMGBs serve as universal sentinels for nucleic acids (30) and that HMGB1 interacts with TLR9 in the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (20, 31). Moreover, we have investigated whether differences in *Trypanosomatidae* and vertebrate genomes may be involved in their different stimulatory capacity. We also analysed the presence of stimulatory or inhibitory motifs for TLR9 (described in previous studies), in both types of DNA. Our results illustrate that *Trypanosomatidae* and vertebrate DNA differ in the frequency of certain motifs and in the ability to associate with factors involved in TLR9 stimulation. Interestingly, murine and human TLR9 behave in the same way towards *L. major* and vertebrate DNA.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

Animals were housed in the Institut Pasteur animal facilities accredited by the French Ministry of Agriculture to perform experiments on mice in appliance of the French and European regulations on care and protection of the Laboratory Animals (EC Directive 86/609, French Law 2001-486 issued on June 6, 2001).

Mice, parasites and reagents

Six to 8 weeks old female C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories. TLR9^{-/-} backcrossed to the C57BL/6 background for 10 generations were provided by S. Akira (Osaka University, Osaka, Japan). All mice were bred in our facilities and housed under specific pathogen-free conditions.

Promastigotes of *L. major* LV39, *T. vivax*, *T. cruzi*, *T. brucei* were propagated *in vitro* in adapted medium supplemented with 10% of FCS. Genomic DNA from vertebrate kidney and lymphnodes purified cells and from *L. major*, *T. vivax*, *T. cruzi*, *T. brucei* were prepared by proteinase K digestion followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. For DNA uptake experiments, DNA was stained overnight with propidium iodide (PI) and precipitated in ethanol.

We used DOTAP (cationic lipid N-(2,3-Dioleoyloxy-1-propyl) trimethylammonium methyl sulfate) (Sigma-Aldrich), CpG ODN 1826 (TCCATGACGTTCCCTGACGTT), CpG ODN type A 2216 (5'-GGGACGATCGTG-3') (Sigma-Proligo), ODN 2088 (5'-TCCTGGCGGGGAAGT-3') (Eurogentec), imidazoquinoline C1-097 (InvivoGen), DNase I (2U/ml) (BioLabs), DNase II (1100U/ml) and glycyrrhizin (Sigma-Aldrich). HMGB1 was kindly provided by Dr. V. Maréchal (Centre de recherche des Cordeliers, France) (32). Residual lipopolysaccharide, quantified using the E-toxate assay (Sigma) was less than 100 fg per microgram rhHMGB1.

Cell culture

Bone marrow (BM) cells were isolated by flushing mice femurs and tibiae with PBS. After treatment with RBC (Red Blood Cells) lysis buffer (Sigma-Aldrich), BM cells were cultured in complete RPMI 1640 supplemented with GM-CSF from J558L cell line supernatant. (33). At day 8, 75-80% of cells are BM derived dendritic cells (BMDCs) CD11c⁺CD11b⁺.

Gen2.2 is a plasmacytoid cell line pDC provided by a leukaemia patient (34). Briefly, they grow on a murine fibroblast feeder cell line MS5 in RPMI, supplemented with 10% FCS, 1% L-glutamine, non essential amino acids, gentamicin and 0.2% sodium pyruvate.

Stimulation of BMDCs and Gen2.2

BMDCs or Gen2.2 were cultured in 6-well plates (3×10^6) using complete RPMI 1640. Cells were activated for 6 h with *L. major*, *T. vivax*, *T. cruzi*, *T. brucei* or vertebrate (mouse, pig, sheep or human) genomic DNA (40 to 2.5 μg), 0.25 μg CpG 1826, 5 μg CpG 2216 or 0.25 μg Cl-097. When indicated, stimulation was done with DNA complexed with DOTAP (10 μg for 2.5-5 μg of DNA) and in some experiments, cells were treated with chloroquine at 20 μM for 1 h before activation. For DNA competition experiments, cells were incubated with both parasite and vertebrate DNA. Supernatants and cells were harvested for ELISA or RNA extraction. As controls, we used CpG and LPS (100ng/ml) to test the capacity of the cells to be activated by stimuli requiring or not TLR9.

ELISA

IL-6 and TNF α were quantified in cell culture supernatants using the BD OptEIA TNF α and IL-6 ELISA set (BD Biosciences). All ELISA procedures were performed according the manufacturer.

RNA extraction and quantitative RT-PCR

RNA was extracted from BMDCs or Gen2.2 using a microRNeasy extraction kit (Qiagen). A trace of genomic DNA was removed by RNase free-DNase set. RNA (2 μg) was reverse transcribed using (200 U) Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (SuperScript II, Invitrogen). Subsequent real time PCR was performed on Step One Plus (Applied Biosystems) using Taq polymerase or SYBER green (Taq-Man Universal or SYBER Green PCR master mix, Applied biosystems).

Flow Cytometry

Flow cytometric data were acquired on a four-color FACS Calibur cytometer (BD Biosciences) and analysis was done with Cell Quest Pro software. For surface phenotyping, the following antibodies were used : anti-human CD45RA-FITC (MEM-56), CD11c-APC (BU15), HLA-DR-FITC (LT-DR), CD123-PE (9F5); anti-mouse CD11b-PE (M1/70),

CD11c-APC (HL3) (BD Bioscience). Uptake of propidium iodide-stained DNA in CD11c-APC cells was performed on FL3 channel.

Immunofluorescence

BMDCs were plated on a μ -slide 8 well ibiTreat (ibidi) then stimulated for 1 h with *L. major* or mouse DNA, stained extemporaneously with propidium iodide. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde for 20 min at RT. Images were taken using a Leica SP5 scanning confocal microscope with a $\times 63$ oil objective. DAPI and propidium iodide signal was acquired following respective excitation at 405 nm and 561 nm and respective emission at 420/65 nm and 577/690 nm, in sequential captures with optical sections of 0.4-0.8 μ m. All microscope parameters were kept constant between experiments. Icy software (version 1.3.6.0) was used for merge analysis and image presentation (35). ImageJ® software (version 1.47q) was used to calculate the average DNA uptake into cells.

Analysis of HMGB1-DNA complexe by western blot

Gel retardation experiments were performed as previously described (36) with the following modifications. Increasing amounts of HMGB1 protein (0.125 μ g to 2.5 μ g) were incubated for 20 min with 250 ng of sonicated parasite or vertebrate DNA in a buffer containing 0.15M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.6. The complexes were loaded on a 1% agarose-TBE gel. Following electrophoretic migration the gels were stained with 0.5 μ g/ml ethidium bromide (EtBr) for 45 min. Transfert was performed onto PVDF membranes (Amersham Biosciences) and membranes were probed with antibodies against HMGB1 (Abcam, 1:1000).

Subcellular distribution of HMGB1

BMDCs (3×10^6) were stimulated with CpG (1 μ g), *L. major* or vertebrate DNA (20 μ g) for 30 min and 1h. The cells were lysed in buffer (20 mM TrisHCl (pH 7.4), 10mM NaCl, 3mM MgCl₂) with anti-proteases for 30 min at 4°C. After centrifugation at 3000 rpm, the cytoplasmic fraction was harvested and the nuclear fraction extracted with the buffer from Subcellular Proteome Extraction kit (Calbiochem). The fractions were analysed by Western Blotting, run in a 10% SDS-PAGE, probed with antibodies against HMGB1 (1:1000, Abcam), actine (1:10000, Sigma), histone H3 (1:5000, Abcam) and revealed with an anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulin-horseradish peroxidase conjugates (1:10000, Serotec). Quantification was performed with ImageJ® software.

DNase activity assay

L. major or vertebrate DNA (1 µg) were incubated with DNase I or II at different concentrations for 30 min at 37°C, and 10 min at 75°C in buffer (10 mM Tris-HCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, pH 7.6 or 150 mM Na acetate-HCl, 5 mM EDTA pH 4.5 respectively). With cytoplasmic extract (up to 5 µg), DNA was incubated for 2 h at 37° and 10 min at 75°. DNA was incubated with HMGB1 for 20 min at room temperature before DNase digestion. Cleavage products were analysed by 0.7% agarose gel electrophoresis, stained with EtBr.

Genome analysis

The genomes analysed are referenced in GenBank Assembly database as : GCA_000002725.2 for *Leishmania major* genome strain Friedlin by the Friedlin Consortium, GCA_000001635.4 for mouse (*Mus musculus*) genome by the Genome Reference Consortium Mouse and GCA_000001405.13 for human (*Homo sapiens*) genome by the Genome Reference Consortium Human. The *Trypanosomatidae* genomes referenced *T. cruzi* strain CL Brener Esmeraldo-like, *T. brucei* strain TREU 927 and *T. vivax* strain Y486 (2013-01-16 versions for all) were taken from *Trypanosomatidae* database TritrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) (37). All bioinformatic analyses, including motif counts and determination of genome size were made from this same dataset. The different motifs were searched in each chromosome or in the whole genome with in-house software (wcount). The motif is represented using the IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) nucleotide ambiguity code.

Statistical analysis

Statistical significance was tested using Prism 5.0 (GraphPad Software) by Mann-Whitney test (for cells activation and chromosomes analysis) and Wilcoxon signed-rank test (for genomes analysis, to test whether rO/E is different from 1). Error bars in all figures represent SEM, with the midline representing the mean value.

RESULTS

TLR9-dependent specific activation of dendritic cells by *Trypanosomatidae* DNA

Previously it has been demonstrated that DNA purified from *L. major* parasites induced a TLR9-dependent activation of BMDCs (bone-marrow derived DCs). This property is shared by other *Trypanosomatidae* DNA. Purified trypanosoma (T) DNA from *T. cruzi*, *T. brucei* and *T. vivax* stimulates cytokine expression in BMDCs from C57BL/6 mice but has no effect on BMDCs from TLR9-deficient mice (Figure 1A).

When *Trypanosomatidae* DNAs are complexed with DOTAP to enhance the endosomal translocation of DNA, a 8-fold lesser amount of DNA induces higher cytokine production by BMDCs in comparison to the naked DNA (Figure 1B). While we observe an increase in the expression of cytokines (IL-6 and TNF α) proportional to the amount of *L. major* DNA added, we do not detect either dependent or independent TLR9 activation with different vertebrate DNAs, even in the presence of DOTAP (Figure 1C).

Each mouse chromosome is at least 35-fold longer than any *L. major* chromosome. Therefore, we investigated whether the lack of activation by vertebrate DNA could be due to chromosomal size, which may hinder its uptake by the cell. Thus we sonicated both types of DNA into 200 base pair fragments. Sonicated *L. major* DNA induced a production of proinflammatory cytokines, even in presence of DOTAP, proportional to the concentration used (Supplemental Fig. 1), while sonicated vertebrate DNA did not (Figure 1D). These data suggest that differences in activation are not based on chromosome size disparity between parasite and vertebrate DNA but on other characteristics.

Similar cellular uptake of *Trypanosomatidae* and vertebrate DNA

Differential DNA uptake by BMDCs could account for the difference for TLR9 signaling between *L. major* and vertebrate DNAs. To compare their uptake in BMDCs, both purified DNAs were labeled with propidium iodide (PI) and added to cells. To avoid PI diffusion, the DNA uptake process was analysed after one hour of incubation with the cells by confocal microscopy (Figure 2A and 2B) or flow cytometry (Figure 2C). With both techniques, we detected 6-10% of BMDCs that contain exogenous full-length DNA. Although we may have expected a higher rate of internalization of the fragmented DNA, we found the same proportion of BMDCs with exogenous sonicated DNA (Figure 2A, 2B and 2C). Thus, the uptake between *L. major* and vertebrate DNA is not significantly different. We also

investigated whether *L. major* and vertebrate DNAs could compete for cellular uptake and tracked their internalization in BMDCs by flow cytometry. No difference in *L. major* DNA uptake was observed in presence of vertebrate DNA (Figure 2C).

HMGB1 enhances TLR9-dependent dendritic cell activation by *L. major* DNA

In presence of DOTAP, we reported above an increased DCs activation by *Trypanosomatidae* DNA. Other factors such as cationic peptides could interact with DNA and facilitate the access to the endosomal TLR9. We observed an overall increase in the expression of cytokine mRNA in BMDCs when *L. major* DNA was complexed with cationic peptides such as LL37, SLPI (secretory leucocyte protease inhibitor) (38) or HMGB1 protein (Supplemental Fig. 2). In order to determine whether HMGB1 could modify the immunostimulatory properties of DNA, BMDCs were stimulated either with *L. major* or vertebrate DNA alone, or with pre-formed HMGB1-DNA complexes. Stimulation with *L. major* DNA complexed with HMGB1 protein enhanced by 2-fold cytokine mRNA expression and secretion compared to DNA alone (Figure 3A and 3B), whereas HMGB1-vertebrate DNA complex or HMGB1 alone did not.

We analysed the ability of recombinant HMGB1 protein to interact with *L. major* or vertebrate DNA *in vitro*. For this purpose, sonicated DNA was incubated with increasing amounts of HMGB1 protein and analysed by electrophoresis. By Western Blot, we detected more HMGB1 on *L. major* DNA than on vertebrate DNA (Figure 3C) (lane 5-7). A DNA shift was observed with HMGB1 (Figure 3C) at a molar ratio of 50:1 for HMGB1:*L. major* DNA (lane 7), whereas with vertebrate DNA a significant DNA shift was already initiated with a molar ratio of 15 (lane 5). Although the size of the two DNAs is the same, the electrophoretic mobility of HMGB1-DNA complexes differ between vertebrate and *L. major* DNA. HMGB1 alone (25 kDa) did not migrate in this electrophoretic condition.

The *in vitro* demonstration of an interaction of HMGB1 with DNA led us to investigate the behaviour of HMGB1 in BMDCs. In the presence of DNA (CpG, *L. major* or vertebrate), HMGB1 gradually moved into the cytoplasm with a peak 30 min after stimulation with CpG and 60 min with the two eukaryotic DNAs (Figure 3D), enabling interaction with DNA. The absence of histone H3 in the cytoplasm, a marker of cell necrosis, indicates that cytoplasmic HMGB1 does not result from nuclear lysis. Although the DC-stimulation increases HMGB1-translocation to the cytoplasm by about 3 times, the majority of HMGB1 remains in the nucleus. To determine whether HMGB1 could be released by BMDCs after activation by *L. major* DNA, we used glycyrrhizin, an HMGB1 inhibitor (39). Addition of this inhibitor to the

cells reduced by about 50% the DNA-triggered cytokine response (Figure 3E), indicating the presence of extracellular HMGB1 in the medium and thus, the cellular release of HMGB1.

***L. major* and vertebrate DNA differ in their nuclease sensitivity**

DNase I and II nucleases are usually involved in the digestion of DNA that originated outside of the nucleus (40). As in phagocytic cells, the DNase content is much higher than in other cells, we compared the DNase sensitivity of *L. major* and mouse genomic DNA, by adding increasing concentration of both DNase I or II (Figure 4A et 4B). We observed that the complete degradation of *L. major* DNA needs ten times more DNase I or II than for vertebrate DNA. With a cytoplasmic extract from dendritic cells, we observed the same difference in sensitivity to DNase for both DNA (Figure 4A). In the presence of HMGB1, complete digestion of both DNA requires about 10 times less DNase when compared to DNA alone (Figure 4B). Thus, *L. major* DNA is intrinsically more resistant to DNase than vertebrate DNA but HMGB1 increases the sensitivity of both types of DNA to DNase.

Different distribution of inhibitory and activating sequences between *L. major* and vertebrates

We analysed the genomic frequency of motifs affecting the activation or inhibition of TLR9 in *L. major* and vertebrate (mouse and human) DNA. 3'extension with polyG reduces nuclease sensitivity (41). In agreement with the greater resistance to DNase for *L. major* DNA, we found that the relative frequency of polyG_n (n=8) motif was 4 times larger in the genome of *L. major* than in the mouse genome (Figure 5A and Supplemental Table 1). Additionally, we searched for the stimulatory CpG motif GACGTT or GTCGTT, respectively defined as the mouse and human TLR9 optimal motifs (12, 42). These stimulatory motifs are 6 and 13 times more frequent in *L. major* than in mouse and human genomes respectively. In contrast, the inhibitory telomeric motif TTAGGG (43) is 3 times less frequent in the *L. major* genome.

To extend these observations, we examined all the combinations around the dinucleotide CpG in the canonical motif (RRCGY₂) and other motifs that are analogous to oligonucleotides previously described as activators (HRWCGTTN) (9, 12), that are found in every class of CpG. We also investigated combinations around G-rich sequence described to have inhibitory properties (WKKVGGGG) and the optimal TLR9 inhibitory sequence CCNDDNNGGG (9,

16). Table 1 shows the total number of each set of motifs in the different genomes. We also computed the number of expected motifs given the frequency of each nucleotide and genome size. From these data, we obtained the ratio of observed/expected motifs (rO/E) for each genome. For stimulatory motifs RRCGY Y and HRWCGTTN, the ratio is higher than expected (1.1) in *L. major* genome. This ratio is lower in the mouse and human genomes (respectively 0.20 and 0.13). The TLR9 inhibitory motifs CCNDDNNGGG and WKKVGGGG are rare in the *L. major* genome (rO/E of 0.33 and 0.93 respectively). In human and mouse genomes inhibitory motifs are more frequent than expected (between 1.3 and 1.8).

We analyzed the distribution of stimulatory and inhibitory motifs in each of the 36 chromosomes of *L. major* and then compared it statistically with that of the 21 mouse chromosomes and 24 human chromosomes (Figure 5B). rO/E values for the activating motifs RRCGY Y and HRWCGTTN were very similar among chromosomes of the same genome. The rO/E values for the inhibitory motifs CCNDDNNGGG and WKKVGGGG were very similar in the 36 chromosomes of *L. major* (<1), but more diverse among mouse and human chromosomes. Importantly, rO/E values for inhibitory motifs were systematically and very significantly lower in *L. major* than in human and mouse genomes ($p < 0.0001$ for both, Mann-Whitney test). Conversely, the rO/E values of stimulatory motifs were systematically and significantly higher in *L. major* than in human and mouse genomes ($p < 0.0001$ for both, Mann-Whitney test). Overall, these results show that the genomes of human and mouse contain fewer stimulatory motifs than expected (and fewer than *L. major*) and more inhibitory G-rich motifs than expected (and more than *L. major*).

Competition by vertebrate DNA prevents the immunostimulatory activity of *L. major* DNA

Given the different properties of *L. major* and vertebrate genomes, we investigated whether there might be a competition between these DNAs for TLR9 activation. Figure 6A shows that the addition of different vertebrate DNA (mouse or pig) to *L. major* inhibits the activation of BMDCs induced by *L. major* DNA alone. Indeed the production of IL-6 and TNF α by BMDCs was significantly reduced. Figure 6B show that this inhibition is proportional to the concentration of added vertebrate DNA. The percentage of inhibition reached approximately 50% with an amount of vertebrate DNA equal to that of *L. major* DNA and reaches up to 70% using 2 times more vertebrate DNA. Sonicated vertebrate DNA and

inhibitory oligonucleotide also inhibited the activation induced by *L. major* DNA. Neither toxic effect of a high concentration of DNA (20 or 40 μg) (Figure 1C) nor inhibition of LPS activation by a high concentration of DNA (20 μg) were observed (data not shown). This inhibition could reflect a competition between both DNAs, since the high frequency of inhibitory sequences in vertebrate DNA could interfere with the presence of stimulatory sequences in the *L. major* DNA.

The properties of *L. major* DNA are shared by other *Trypanosomatidae* DNA

We then enquired on the generality of our findings, notably if other *Trypanosomatidae* shared the stimulatory features of *L. major* DNA. Indeed, the addition of mouse DNA to *T. cruzi* DNA inhibits the activation of BMDCs induced by *T. cruzi* DNA alone (Figure 7A). The percentage of inhibition reached about 90% with equal quantities of both DNA. Inhibition by vertebrate DNA may therefore be generalized to other *Trypanosomatidae* DNA. Given the previous results, we extended our comparisons to the genomes of different *Trypanosomatidae*. The ratios rO/E for both stimulatory motifs RRCGY and HRWCGTTN are identical and have values in *L. major*, *T. cruzi* and *T. brucei* of respectively 1.1, 0.8, 0.9; for *T. vivax* the ratios are 0.68 and 0.91 (Figure 7B and Table 1). In contrast, for the two inhibitory motifs, the distribution is more variable between *Trypanosomatidae* genomes. The ratios are between 0.3 and 0.9 for *L. major*, *T. cruzi* and *T. vivax* genome and slightly higher than 1 only for *T. brucei*.

In addition, we calculated the ratios S/I between each stimulatory and inhibitory sequences (Table II). The ratio between the canonical stimulatory motif RRCGY and each inhibitory motif in *Trypanosomatidae* genomes are between 10 and 15. This ratio is slightly higher in *L. major* than *T. cruzi* and higher in *T. cruzi* than *T. brucei*. Interestingly, the order of the ratios matches the order of activation. This is not the case with *T. vivax*, although *T. vivax* and *L. major* have similar S/I, but the former has a lower rO/E of both inhibitory and stimulatory motifs. With the second stimulatory motif HRWVGTTN, the ratio S/I are around 2 but they represent only 6% of the canonical motif RRCGY. All the ratios S/I in *Trypanosomatidae* genome are 3 to 10 times higher than those in vertebrate genome. Indeed, rO/E values of stimulatory motifs are much lower in vertebrate (rO/E < 0.2) than in *Trypanosomatidae* (>0.7) (Table 1). Conversely, rO/E values of inhibitory motifs in *Trypanosomatidae* are 1.4 to 4.6 times lower than in vertebrate genomes.

Overall, this analysis confirms that the contrast in the genomic frequency of inhibitory and stimulatory motifs between *L. major* DNA and human and mouse genomes is shared by the other *Trypanosomatidae*.

TLR9 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells occurs with *L. major* DNA but not vertebrate DNA

To address whether human TLR9, like mouse TLR9, could be activated by *L. major* DNA but not by vertebrate DNA, we investigated TLR9 signaling in human plasmacytoid dendritic cell (pDCs). In contrast to myeloid dendritic cells, human pDCs uniquely express TLR7 and TLR9, that recognize nucleic acids within endosomal compartments and trigger type 1 interferon (IFN) production. Because of their low frequency in human blood, we used a human pDCs cell line GEN2.2 derived from leukemic pDCs (34). FACS analysis of GEN2.2 confirmed the expression of CD123 and HLA-DR as previously described. As expected by the presence of TLR9 and TLR7, CpG and Cl-097 (TLR7 agonist) stimulated proinflammatory cytokine expression of IFN alpha 2 and beta ($\alpha 2$ and β) in the GEN2.2 pDC cell line (Supplemental Fig. 3). Therefore, we compared the activation of human pDCs by *L. major* and vertebrate DNA. Only *L. major* DNA was able to increase the expression of IFN $\alpha 2$ and IFN β (Figure 8). Even in the presence of DOTAP, no detectable activation was observed with the vertebrate DNA. Moreover treatment of pDCs with chloroquine impaired their activation by *L. major* DNA, supporting its dependence on endosomal acidification. These data demonstrated that *L. major* and not vertebrate DNA can induce TLR9 signaling in mouse and human cells.

DISCUSSION

While TLR9 shares a common function of nucleic acid recognition along with other TLRs (TLR3, TLR7 and TLR8), it is also involved in parasite recognition (1, 2, 4, 7, 44, 45). Previously, it has been reported that DNA from certain protozoan parasites (*B. bovis*, *T. cruzi*, *T. brucei*) stimulated B cell proliferation and macrophage activation (1, 46, 47). Our data confirm that *L. major* and other *Trypanosomatidae* DNAs stimulate dendritic cells in a TLR9-dependent manner, which is not the case for vertebrate DNA. Here we provided experimental evidence that accounts for the specific and exclusive activation of TLR9 pathway by *Trypanosomatidae* DNA.

Previously, it has been proposed that the discrimination between microbial and self DNA is based on the endosomal localization of TLR9 and the failure of self DNA to access endosomes (15, 17). Here we have demonstrated that the lack of immunostimulatory activity by vertebrate DNA is not due to a limited accessibility for TLR9. Indeed, we observed the same uptake rates of both DNAs in BMDCs. Using DOTAP, a cationic agent promoting DNA translocation in endosomes, there was no activation by the vertebrate DNA as reported, while the activation was increased by *L. major* DNA and remained dependent on TLR9. It has been proposed previously that there could be a saturability in DNA uptake, suggesting a receptor-mediated process (9) or the involvement of an endocytotic pathway (48). Therefore, the same amount of DNA taken up by BMDCs may be sufficient to cause cellular activation by parasite DNA and not by vertebrate DNA. We also eliminated the possibility that the lack of activation by vertebrate DNA was due to its large genomic size, as the differences in the BMDCs activation between *L. major* and vertebrate DNA persisted when the DNA were reduced to the same size by sonication. This implies that the differences found between vertebrate and *Trypanosomatidae* DNA are due to their intrinsic properties such as their nucleotidic motifs.

Several cofactors are also implicated in the endosomal TLR recognition, as UNC93B1. UNC93B1 mutant mice are highly susceptible to *L. major* and to *T. cruzi*. (44, 45), showing the involvement of TLR9 but also TLR7 and TLR3 in resistance to *L. major* infection.

Our work sheds light on the molecular mechanism of TLR9 activation which may be generated by another endogenous protein-DNA complex formed in the cell during the internalization of DNA. We observed an increase in the expression of proinflammatory cytokines in DCs activated by *L. major* DNA complexed with different peptides such as

LL37, SLPI or HMGB1. We assumed a potential role of HMGB1 in the specific stimulation of *L. major* DNA by BMDCs, since HMGB1 increases the recognition of CpG-ODN by TLR9 and extracellular HMGB1 accelerates its delivery to the receptor (20, 31). Indeed, we have observed an increase in the expression of cytokines in stimulated BMDCs by HMGB1 complexed to *L. major* DNA but not when HMGB1 is alone or complexed to vertebrate DNA. In resting immune cells, HMGB1 is highly abundant in the nucleus but shuttles between it and the cytoplasm (29). Following the activation by *L. major* and vertebrate DNA, the shuttle system is disturbed and HMGB1 gradually increases in the cytoplasm. Moreover, the release of HMGB1 is indicated by the fact that in the presence of glycyrrhizin (39), we observed a decrease in cytokine production. Previously, secretion of HMGB1 has been reported upon activation of inflammatory cells with a variety of stimuli. HMGB1 is transferred in the secretory lysosomes via a non classical pathway following LPS activation, as suggested by a partial colocalization with the lysosomal marker LAMP1 (49, 50). Although extracellular HMGB1 could interact with DNA outside the cell according the inhibition observed with glycyrrhizin, this interaction could also take place inside the cell, as suggested by the rapid cellular uptake of DNA and the subsequent translocation of HMGB1 after DNA activation.

Because of the differences between *L. major* and vertebrate DNA seen with TLR9 signaling, we compared the interaction of HMGB1 with both DNAs. Surprisingly there was more HMGB1 on *L. major* DNA than on vertebrate DNA. Preliminary results suggest that there is also more HMGB1 on other *Trypanosomatidae* DNA (*T. cruzi*, *T. vivax*, *T. brucei*). This difference could result from a larger binding of HMGB1 or a higher stability of the interaction of HMGB1 with *L. major* DNA. This could be one of the factors involved in the specific activation of TLR9.

The composition and the structure of genomic DNA could also be involved in this difference. First, *L. major* DNA as other *Trypanosomatidae* DNA is composed of a nuclear and a kinetoplastic DNA, consisting of a network of particular DNA structures (maxi and minicircles) (51). HMGB1 is considered to be a non specific single- or double-stranded DNA binding protein with special affinity for distorted DNA structures such as supercoiled DNA or DNA minicircles (52). Secondly, the *L. major* genome is more GC rich than the mouse or the human genome (63% against 42%). One report described that HMGB1 has some preference for binding CpG-rich oligonucleotides over GpC/GpG ODNs on single-stranded DNA (31). CpG-rich regions can also include kinks or adopt cruciform conformations, promoting multimerization through stable and high-ordered structures as G-tetrads, like polyG sequences

(53). HMGB1 has been reported to preferentially bind such DNA structures (54) and to be involved in local changes in chromatin architecture (55).

L. major DNA is more resistant to DNase I and DNase II degradation compared to vertebrate DNA. DNase I is a nuclease responsible for degrading extracellular DNA. DNase II is an ubiquitous lysosomal endonuclease that requires an acidic environment to cleave DNA (40). As expected, DNase present in cytoplasmic extracts of dendritic cells can degrade *L. major* or vertebrate DNA taken up by the cell. Unexpectedly the HMGB1 binding to DNA renders it more susceptible to DNase degradation. The ability of HMGB1 to bend DNA may account for this increased sensitivity. In all cases, *L. major* DNA is more resistant to DNase than vertebrate DNA, suggesting that the parasite DNA persists longer in the cell and remains a better activator for TLR9. Besides, 3' poly G extensions also reduce nuclease sensitivity (53). Here, we reported that *L. major* DNA is richer in polyG sequences than vertebrate DNA. Initially, TLR9 was identified as the receptor for oligonucleotides containing unmethylated CpG motifs but the idea that stimulatory properties of DNA correlate solely with the presence of unmethylated CpG motifs may be an oversimplification (13). It has been proposed that *Trypanosomatidae* DNA (*T. cruzi*, *T. brucei*) are hypomethylated and stimulate the expression of inflammatory cytokines (4, 46). To determine the requirement for unmethylated CpG dinucleotides in cellular activation, CpG were methylated by MSss1 methylase which methylates all cytosine residues within the double-strand sequence CG, which is not the case of mammalian methylase. Overmethylation of *T. cruzi* and *T. brucei* reduced but did not eliminate the stimulatory activity of these *Trypanosomatidae* DNA. Moreover, it has been found that even predominantly or completely unmethylated DNA was still not stimulatory (8, 13). Therefore, this implies that vertebrate DNA could contain unknown structural motifs that inhibit the immunostimulatory function of its unmethylated CpG motifs.

More recently, it has been shown that the DNA sugar backbone 2'-deoxyribose represents a prime determinant for the interaction between single-stranded DNA and TLR9. In its natural phosphodiester state, the base-free 2'-deoxyribose backbone acts as a basal TLR9 agonist and the addition of DNA bases, even lacking CpG motifs, enhances its agonist activity (10). This suggests that any mammalian or pathogen DNA could activate TLR9. However along with other works (9, 12), we have shown that vertebrate DNA fails to activate innate immune cells. Even by forcing endosomal translocation by DOTAP, we observed neither dependent or independent TLR9 activation by vertebrate DNA.

Alltogether the data mentioned above on the differences between *L. major* and vertebrate DNA with respect to the HMGB1 fixation and resistance to DNase led us to compare their

genomic sequences. The strongest activation is seen with double-stranded DNA fragments containing optimal CpG motifs. But other CpG- rich DNA, lacking optimal CpG motifs, and that are present within mammalian DNA, induced cell activation (11). Canonical and non canonical stimulatory sequences were investigated in both types of genome. Their ratio of observed to expected (rO/E) sequences is on average five times more in *L. major* DNA than in mouse and human DNA, whereas the ratio for inhibitory sequences is on average two times lower. This suggests that vertebrate genomes have counter-selected stimulatory motifs and selected for inhibitory motifs, presumably to avoid auto-immunity and/or better discriminate non-self DNA(17).

Moreover, vertebrate DNA could be an effective TLR9 ligand. Indeed, it has been reported that both stimulatory and inhibitory DNAs can interact with TLR9, suggesting a non specific process of recognition, but only stimulatory oligonucleotide could induce conformational changes leading to MyD88 recruitment and TLR9 signaling (56). Besides, competition for TLR9 activation has been already observed between CpG and inhibitory oligonucleotides (9, 57, 58). In the presence of vertebrate DNA, we observed a similar inhibition of *L. major* DNA-induced TLR9 activation. The differences we have demonstrated in their sequence are then consistent with the observed competition between *L. major* and vertebrate DNA.

Until now very few data were available regarding nucleotide sequence and cellular events involved in the differential recognition of parasite and vertebrate DNA by TLR9. Interestingly, the stimulatory activity of *T. cruzi* DNA is correlated with the finding that mouse- and human- like CpG motifs for TLR9 are clustered on retrotransposon VIPER elements and mucin-like glycoprotein genes in the *T. cruzi* genome (4). However, in *L. major* DNA, the stimulatory motifs are distributed throughout the whole genome and not concentrated in particular genomic regions as for *T. cruzi*. Further analysis of different *Trypanosomatidae* genomes confirmed the presence of more stimulatory and less inhibitory sequences, compared to vertebrate genomes. Inhibition by vertebrate DNA can be generalized to other *Trypanosomatidae* DNA since it is based on a competition between DNA motifs contributing to TLR9 activation or inhibition.

It is interesting to note that the human TLR9 also recognizes *L. major* DNA, leading to TLR9 signaling, but not the self DNA. This ability of TLR9 to discriminate pathogen DNA from the self DNA is mentioned as a lock for additional security, enabling the cell to maintain its integrity (17).

This work highlights the mechanisms that enhance the recognition of pathogen DNA by TLR9, involving some genomic characteristics and the implication of accessory proteins such as HMGB1.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are especially grateful to Pr J. Louis (Institut Pasteur IP, retired), Pr J.M. Sallenave (IP) and Pr F. Strauss (Museum National d'Histoire Naturelle) for helpful discussions. We are thankful to D. Eisen and A. Holland for their critical reading and the English editing of the manuscript. We gratefully acknowledged for the advices and the help of M. Parlato (IP), S. Maschalidi (Hôpital Necker), R. Rua (IP) and P. Escoll Guerrero (IP). We thank also C. Fitting (IP) for her precious technical assistance. We thank I. Schwartz (Institut National de la Recherche Agronomique) for providing us vertebrate organs, T. Blisnik (Institut Pasteur) and S. Bonnefoy (Institut Pasteur) for the cultures of parasites. We acknowledged the Plateforme d'Imagerie Dynamique, Imagopole (Institut Pasteur).

REFERENCES

1. Drennan, M. B., B. Stijlemans, J. Van den Abbeele, V. J. Quesniaux, M. Barkhuizen, F. Brombacher, P. De Baetselier, B. Ryffel, and S. Magez. 2005. The induction of a type 1 immune response following a *Trypanosoma brucei* infection is MyD88 dependent. *J Immunol* 175: 2501-2509.
2. Liese, J., U. Schleicher, and C. Bogdan. 2007. TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. *European journal of immunology* 37: 3424-3434.
3. Schleicher, U., J. Liese, I. Knippertz, C. Kurzmann, A. Hesse, A. Heit, J. A. Fischer, S. Weiss, U. Kalinke, S. Kunz, and C. Bogdan. 2007. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. *The Journal of experimental medicine* 204: 893-906.
4. Bartholomeu, D. C., C. Ropert, M. B. Melo, P. Parroche, C. F. Junqueira, S. M. Teixeira, C. Sirois, P. Kasperkovitz, C. F. Knetter, E. Lien, E. Latz, D. T. Golenbock, and R. T. Gazzinelli. 2008. Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 181: 1333-1344.
5. Carvalho, L. P., P. M. Petritus, A. L. Trochtenberg, C. Zaph, D. A. Hill, D. Artis, and P. Scott. 2012. Lymph node hypertrophy following *Leishmania major* infection is dependent on TLR9. *J Immunol* 188: 1394-1401.
6. Weinkopff, T., A. Mariotto, G. Simon, Y. Hauyon-La Torre, F. Auderset, S. Schuster, H. Zangger, N. Fasel, A. Barral, and F. Tacchini-Cottier. 2013. Role of Toll-like receptor 9 signaling in experimental *Leishmania braziliensis* infection. *Infection and immunity* 81: 1575-1584.
7. Abou Fakher, F. H., N. Rachinel, M. Klimczak, J. Louis, and N. Doyen. 2009. TLR9-dependent activation of dendritic cells by DNA from *Leishmania major* favors Th1 cell development and the resolution of lesions. *J Immunol* 182: 1386-1396.
8. Krieg, A. M., T. Wu, R. Weeratna, S. M. Efler, L. Love-Homan, L. Yang, A. K. Yi, D. Short, and H. L. Davis. 1998. Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 12631-12636.
9. Stacey, K. J., G. R. Young, F. Clark, D. P. Sester, T. L. Roberts, S. Naik, M. J. Sweet, and D. A. Hume. 2003. The molecular basis for the lack of immunostimulatory activity of vertebrate DNA. *J Immunol* 170: 3614-3620.
10. Haas, T., J. Metzger, F. Schmitz, A. Heit, T. Muller, E. Latz, and H. Wagner. 2008. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity* 28: 315-323.
11. Yasuda, K., C. Richez, M. B. Uccellini, R. J. Richards, R. G. Bonegio, S. Akira, M. Monestier, R. B. Corley, G. A. Viglianti, A. Marshak-Rothstein, and I. R. Rifkin. 2009.

Requirement for DNA CpG content in TLR9-dependent dendritic cell activation induced by DNA-containing immune complexes. *J Immunol* 183: 3109-3117.

12. Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky, and D. M. Klinman. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-549.

13. Sun, S., C. Beard, R. Jaenisch, P. Jones, and J. Sprent. 1997. Mitogenicity of DNA from different organisms for murine B cells. *J Immunol* 159: 3119-3125.

14. Latz, E., A. Schoenemeyer, A. Visintin, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, C. F. Knetter, E. Lien, N. J. Nilsen, T. Espevik, and D. T. Golenbock. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature immunology* 5: 190-198.

15. Yasuda, K., P. Yu, C. J. Kirschning, B. Schlatter, F. Schmitz, A. Heit, S. Bauer, H. Hochrein, and H. Wagner. 2005. Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 174: 6129-6136.

16. Ashman, R. F., J. A. Goeken, E. Latz, and P. Lenert. 2011. Optimal oligonucleotide sequences for TLR9 inhibitory activity in human cells: lack of correlation with TLR9 binding. *International immunology* 23: 203-214.

17. Barton, G. M., J. C. Kagan, and R. Medzhitov. 2006. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nature immunology* 7: 49-56.

18. Gilliet, M., W. Cao, and Y. J. Liu. 2008. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nature reviews. Immunology* 8: 594-606.

19. Lande, R., J. Gregorio, V. Facchinetti, B. Chatterjee, Y. H. Wang, B. Homey, W. Cao, Y. H. Wang, B. Su, F. O. Nestle, T. Zal, I. Mellman, J. M. Schroder, Y. J. Liu, and M. Gilliet. 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449: 564-569.

20. Tian, J., A. M. Avalos, S. Y. Mao, B. Chen, K. Senthil, H. Wu, P. Parroche, S. Drabic, D. Golenbock, C. Sirois, J. Hua, L. L. An, L. Audoly, G. La Rosa, A. Bierhaus, P. Naworth, A. Marshak-Rothstein, M. K. Crow, K. A. Fitzgerald, E. Latz, P. A. Kiener, and A. J. Coyle. 2007. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nature immunology* 8: 487-496.

21. Park, B., L. Buti, S. Lee, T. Matsuwaki, E. Spooner, M. M. Brinkmann, M. Nishihara, and H. L. Ploegh. 2011. Granulin is a soluble cofactor for toll-like receptor 9 signaling. *Immunity* 34: 505-513.

22. Baumann, C. L., I. M. Aspalter, O. Sharif, A. Pichlmair, S. Bluml, F. Grebien, M. Bruckner, P. Pasierbek, K. Aumayr, M. Planyavsky, K. L. Bennett, J. Colinge, S. Knapp, and G. Superti-Furga. 2010. CD14 is a coreceptor of Toll-like receptors 7 and 9. *The Journal of experimental medicine* 207: 2689-2701.

23. Moresco, E. M., and B. Beutler. 2011. Special delivery: granulin brings CpG DNA to Toll-like receptor 9. *Immunity* 34: 453-455.
24. Tabeta, K., K. Hoebe, E. M. Janssen, X. Du, P. Georgel, K. Crozat, S. Mudd, N. Mann, S. Sovath, J. Goode, L. Shamel, A. A. Herskovits, D. A. Portnoy, M. Cooke, L. M. Tarantino, T. Wiltshire, B. E. Steinberg, S. Grinstein, and B. Beutler. 2006. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nature immunology* 7: 156-164.
25. Brinkmann, M. M., E. Spooner, K. Hoebe, B. Beutler, H. L. Ploegh, and Y. M. Kim. 2007. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *The Journal of cell biology* 177: 265-275.
26. Park, B., M. M. Brinkmann, E. Spooner, C. C. Lee, Y. M. Kim, and H. L. Ploegh. 2008. Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nature immunology* 9: 1407-1414.
27. Ewald, S. E., B. L. Lee, L. Lau, K. E. Wickliffe, G. P. Shi, H. A. Chapman, and G. M. Barton. 2008. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 456: 658-662.
28. Sepulveda, F. E., S. Maschalidi, R. Colisson, L. Heslop, C. Ghirelli, E. Sakka, A. M. Lennon-Dumenil, S. Amigorena, L. Cabanie, and B. Manoury. 2009. Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells. *Immunity* 31: 737-748.
29. Dumitriu, I. E., P. Baruah, B. Valentinis, R. E. Voll, M. Herrmann, P. P. Nawroth, B. Arnold, M. E. Bianchi, A. A. Manfredi, and P. Rovere-Querini. 2005. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol* 174: 7506-7515.
30. Yanai, H., T. Ban, Z. Wang, M. K. Choi, T. Kawamura, H. Negishi, M. Nakasato, Y. Lu, S. Hangai, R. Koshiba, D. Savitsky, L. Ronfani, S. Akira, M. E. Bianchi, K. Honda, T. Tamura, T. Kodama, and T. Taniguchi. 2009. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature* 462: 99-103.
31. Ivanov, S., A. M. Dragoi, X. Wang, C. Dallacosta, J. Louten, G. Musco, G. Sitia, G. S. Yap, Y. Wan, C. A. Biron, M. E. Bianchi, H. Wang, and W. M. Chu. 2007. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood* 110: 1970-1981.
32. Messmer, M., C. Klein, R. Boniface, N. F. Gnadig, M. Lecerf, S. Barnay-Verdier, and V. Marechal. 2013. DsRed-mediated oligomerization stabilizes HMGB1 on chromatin *in vivo* and on DNA *in vitro*. *Biochimie* 95: 962-966.
33. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine* 176: 1693-1702.

34. Chaperot, L., N. Bendriss, O. Manches, R. Gressin, M. Maynadie, F. Trimoreau, H. Orfeuvre, B. Corront, J. Feuillard, J. J. Sotto, J. C. Bensa, F. Briere, J. Plumas, and M. C. Jacob. 2001. Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 97: 3210-3217.
35. de Chaumont, F., S. Dallongeville, N. Chenouard, N. Herve, S. Pop, T. Provoost, V. Meas-Yedid, P. Pankajakshan, T. Lecomte, Y. Le Montagner, T. Lagache, A. Dufour, and J. C. Olivo-Marin. 2012. Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature methods* 9: 690-696.
36. Bottger, M., S. V. Zaitsev, A. Otto, A. Haberland, and V. I. Vorob'ev. 1998. Acid nuclear extracts as mediators of gene transfer and expression. *Biochimica et biophysica acta* 1395: 78-87.
37. Aslett, M., C. Aurrecochea, M. Berriman, J. Brestelli, B. P. Brunk, M. Carrington, D. P. Depledge, S. Fischer, B. Gajria, X. Gao, M. J. Gardner, A. Gingle, G. Grant, O. S. Harb, M. Heiges, C. Hertz-Fowler, R. Houston, F. Innamorato, J. Iodice, J. C. Kissinger, E. Kraemer, W. Li, F. J. Logan, J. A. Miller, S. Mitra, P. J. Myler, V. Nayak, C. Pennington, I. Phan, D. F. Pinney, G. Ramasamy, M. B. Rogers, D. S. Roos, C. Ross, D. Sivam, D. F. Smith, G. Srinivasamoorthy, C. J. Stoeckert, Jr., S. Subramanian, R. Thibodeau, A. Tivey, C. Treatman, G. Velarde, and H. Wang. 2010. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic acids research* 38: D457-462.
38. Taggart, C. C., S. A. Cryan, S. Weldon, A. Gibbons, C. M. Greene, E. Kelly, T. B. Low, J. O'Neill S, and N. G. McElvaney. 2005. Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF-kappaB binding sites in monocytes and inhibits p65 binding. *The Journal of experimental medicine* 202: 1659-1668.
39. Mollica, L., F. De Marchis, A. Spitaleri, C. Dallacosta, D. Pennacchini, M. Zamai, A. Agresti, L. Trisciuglio, G. Musco, and M. E. Bianchi. 2007. Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. *Chemistry & biology* 14: 431-441.
40. Schafer, P., I. A. Cymerman, J. M. Bujnicki, and G. Meiss. 2007. Human lysosomal DNase Ialpha contains two requisite PLD-signature (HxK) motifs: evidence for a pseudodimeric structure of the active enzyme species. *Protein science : a publication of the Protein Society* 16: 82-91.
41. Bishop, J. S., J. K. Guy-Caffey, J. O. Ojwang, S. R. Smith, M. E. Hogan, P. A. Cossum, R. F. Rando, and N. Chaudhary. 1996. Intramolecular G-quartet motifs confer nuclease resistance to a potent anti-HIV oligonucleotide. *The Journal of biological chemistry* 271: 5698-5703.
42. Bauer, S., C. J. Kirschning, H. Hacker, V. Redecke, S. Hausmann, S. Akira, H. Wagner, and G. B. Lipford. 2001. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 9237-9242.

43. Gursel, I., M. Gursel, H. Yamada, K. J. Ishii, F. Takeshita, and D. M. Klinman. 2003. Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation. *J Immunol* 171: 1393-1400.
44. Caetano, B. C., B. B. Carmo, M. B. Melo, A. Cerny, S. L. dos Santos, D. C. Bartholomeu, D. T. Golenbock, and R. T. Gazzinelli. 2011. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 187: 1903-1911.
45. Schamber-Reis, B. L., P. M. Petritus, B. C. Caetano, E. R. Martinez, K. Okuda, D. Golenbock, P. Scott, and R. T. Gazzinelli. 2013. UNC93B1 and nucleic acid-sensing Toll-like receptors mediate host resistance to infection with *Leishmania major*. *The Journal of biological chemistry* 288: 7127-7136.
46. Shoda, L. K., K. A. Kegerreis, C. E. Suarez, I. Roditi, R. S. Corral, G. M. Bertot, J. Norimine, and W. C. Brown. 2001. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. *Infection and immunity* 69: 2162-2171.
47. Bafica, A., H. C. Santiago, R. Goldszmid, C. Ropert, R. T. Gazzinelli, and A. Sher. 2006. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 177: 3515-3519.
48. Wittrup, A., S. Sandgren, J. Lilja, C. Bratt, N. Gustavsson, M. Morgelin, and M. Belting. 2007. Identification of proteins released by mammalian cells that mediate DNA internalization through proteoglycan-dependent macropinocytosis. *The Journal of biological chemistry* 282: 27897-27904.
49. Gardella, S., C. Andrei, D. Ferrera, L. V. Lotti, M. R. Torrisi, M. E. Bianchi, and A. Rubartelli. 2002. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO reports* 3: 995-1001.
50. Bonaldi, T., F. Talamo, P. Scaffidi, D. Ferrera, A. Porto, A. Bachi, A. Rubartelli, A. Agresti, and M. E. Bianchi. 2003. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *The EMBO journal* 22: 5551-5560.
51. Rogers, W. O., and D. F. Wirth. 1987. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 565-569.
52. Jaouen, S., L. de Koning, C. Gaillard, E. Muselikova-Polanska, M. Stros, and F. Strauss. 2005. Determinants of specific binding of HMGB1 protein to hemicatenated DNA loops. *Journal of molecular biology* 353: 822-837.
53. Li, Y., I. C. Berke, and Y. Modis. 2012. DNA binding to proteolytically activated TLR9 is sequence-independent and enhanced by DNA curvature. *The EMBO journal* 31: 919-931.

54. Pil, P. M., and S. J. Lippard. 1992. Specific binding of chromosomal protein HMG1 to DNA damaged by the anticancer drug cisplatin. *Science* 256: 234-237.
55. Joshi, S. R., Y. C. Sarpong, R. C. Peterson, and W. M. Scovell. 2012. Nucleosome dynamics: HMGB1 relaxes canonical nucleosome structure to facilitate estrogen receptor binding. *Nucleic acids research* 40: 10161-10171.
56. Latz, E., A. Verma, A. Visintin, M. Gong, C. M. Sirois, D. C. Klein, B. G. Monks, C. J. McKnight, M. S. Lamphier, W. P. Duprex, T. Espevik, and D. T. Golenbock. 2007. Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nature immunology* 8: 772-779.
57. Lenert, P., L. Stunz, A. K. Yi, A. M. Krieg, and R. F. Ashman. 2001. CpG stimulation of primary mouse B cells is blocked by inhibitory oligodeoxyribonucleotides at a site proximal to NF-kappaB activation. *Antisense & nucleic acid drug development* 11: 247-256.
58. Avalos, A. M., and H. L. Ploegh. 2011. Competition by inhibitory oligonucleotides prevents binding of CpG to C-terminal TLR9. *European journal of immunology* 41: 2820-2827.

FOOTNOTES

¹ **Funding :** This work was supported by Institut Pasteur and the grant 10-MIDI-0008 from ANR (Agence Nationale de la Recherche) to ND with a post-doctoral fellowship to CB and a DIM MALINF (Région Ile-de-France) PhD fellowship to MEK. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

² **Abbreviations used in this paper :** BM, bone marrow; DC, dendritic cell; BMDC, BM-derived DC; CI-097, imidazoquinoline compound; DOTAP, N-(2,3-Dioleoyloxy-1-propyl) trimethylammonium methyl-sulfate; HMGB1, High-Mobility Group Box protein 1; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; *L.* , Leishmania ; ODN, oligonucleotide ; pDC, plasmacytoid DC; PI, propidium iodide ; PO, phosphodiester ; PS, phosphorothioate ; SLPI, secretory leucocyte protease inhibitor ; *T.* , Trypanosoma.

FIGURE LEGENDS AND FIGURES

Figure 1 TLR9-dependent activation of BMDCs specific to *trypanosomatidae* DNA

C57BL/6 or TLR9^{-/-} BMDCs were stimulated *in vitro* either with *trypanosomatidae* or vertebrate DNA for 6 hours (A) Expression of the indicated cytokines was determined by real time RT-PCR. The mRNA expression levels were normalized to the expression of the HPRT gene and calculated as the n-fold difference with the expression in unstimulated BMDCs. (B-D) IL-6 and TNF α production was measured by ELISA in the supernatants of stimulated BMDCs for 6 h (B) with *trypanosomatidae* DNA alone or complexed with DOTAP, (C) with different concentrations of *L. major* or vertebrate (mouse or pig) DNA alone or complexed with DOTAP, (D) with *L. major* or mouse sonicated DNA in 200 base pair (bp) fragments. The data represent the mean and SEM of three independent experiments. Significant differences were found between C57BL/6 and TLR9^{-/-} in A, B, C (*, p<0.05) and between *L. major* and vertebrate DNA (mouse or pig) in C and D (*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001).

Figure 2 Comparative analysis of mouse and *L. major* DNA cell uptake

Analysis by confocal microscopy (A, B) and flow cytometry (C) of BMDCs stimulated 1 h by 10 μ g of full-length DNA or sonicated DNA (200 bp) from *L. major* or mouse labelled with propidium iodide (PI) (red). (A, B) Nuclei are stained with DAPI (blue). Quantification was performed by counting 250-300 BMDCs per condition per experiment. (C) Internalized DNA was detected in FL3 channel in BMDCs labelled with an anti-CD11c. (Upper panel) Filled and open histograms represent unstimulated or stimulated BMDCs with PI stained DNA. *L. major* DNA (*L.m*), vertebrate DNA (V) and *L. major* with vertebrate DNA (*L.m*⁺V) are represented respectively with a thin, solid and a dashed line. (Lower panel) Percentage of BMDCs with exogenous DNA. In the experience of uptake competition, only *L. major* DNA was stained with PI. The data represent three independent experiments : one representative for A and C (upper panel) and the mean and SEM in B and C (lower panel).

Figure 3 The contribution of HMGB1 to TLR9 activation

C57BL/6 BMDCs were stimulated with *L. major* or vertebrate DNA (20 μ g) complexed with rHMGB1 (1 μ g) or alone (as control and reference) for 6 h. (A) Cytokines mRNA were detected by real-time PCR. The data are expressed as the n-fold difference with the expression in stimulated BMDCs by *L. major* or vertebrate DNA alone. The mRNA

expression levels were normalized to the expression of the HPRT gene. nd : not detectable. **(B)** IL-6 and TNF α production was measured in supernatants by ELISA. **(C)** Analysis of DNA-HMGB1 complex by gel electrophoresis : *(right)* Western Blot revealed with an anti-HMGB1 antibody and *(left)* with EtBr staining. Lane 1 shows the migration for 250 ng of DNA alone. From lane 2 to 7, DNA was complexed to HMGB1 respectively at a molar ratio of 2.5, 5, 7.5, 15, 25 and 50. Results represent one from three independent experiment. Free HMGB1 (25 kDa) did not migrate in the 1% agarose gel. **(D)** Time-course analysis of HMGB1 in the cytoplasm and nucleus of BMDCs not stimulated (NS) or stimulated by CpG (1 μ g), *L. major* or vertebrate DNA (20 μ g). *(left)* Analysis was performed by Western Blot at 30 and 60 min post-induction. *(right)* Quantification of HMGB1 in cytoplasmic extracts was normalized to that of actin and expressed as the n-fold difference with the unstimulated BMDCs. The mean and SEM of six independent experiments, each including both 30 min and 60 min extracts is represented by the histogram. **(E)** C57BL/6 BMDCs were stimulated with *L. major* DNA alone (20 μ g) or with glycyrrhizin (10 or 20 μ g/ml) for 6 h. Percentage (%) of inhibition = [100-(cytokines production by *L. major* DNA with glycyrrhizin/cytokines production by *L. major* DNA alone)] \times 100. The data represent three independent experiments: one representative for C and D and the mean and SEM in A, B, E (*p<0,05, **p<0,01).

Figure 4 *L. major* and vertebrate DNA differ in their DNase sensitivity

DNA degradation was analysed by electrophoresis on a 0.7% agarose gel, stained by EtBr. **(A)** Increasing amounts of DNase I *(left)*, DNase II *(middle)* or cytoplasmic extract from C57BL/6 BMDCs *(right)* was added to a same amount of full-length genomic *L. major* or vertebrate DNA (1 μ g). **(B)** Genomic *L. major* or vertebrate DNA (1 μ g) alone or complexed with HMGB1 (3 μ g) treated with DNase I. L is the Kb ladder (λ DNA-*HindIII*). The data represent one representative of three experiments.

Figure 5 Selection for inhibitory and against stimulatory TLR9 motifs in vertebrate genome

(A) Poly G (GGGG)₂, stimulatory GACGTT and GTCGTT and inhibitory TTAGGG motifs were quantified in *L. major*, mouse or human genomes and represented as copy number per 10⁶ bases pair (=copy number/ genome size (bp)*10⁶). **(B)** Stimulatory (RRCGY and HRWCGTTN) and inhibitory (WKKVGGGG and CCNDDNNGGG) motifs were quantified

in each *L. major*, mouse or human chromosome. They are represented as the ratio of observed/expected sequences rO/E, as indicated in Table I. For each chromosome, the ratio is represented by a single dot. Significant differences between *L. major* and vertebrate chromosomes are indicated (***, p<0.001).

Figure 6 Competition with vertebrate DNA prevents the immunostimulatory activity of *L. major* DNA

C57BL/6 BMDCs were stimulated *in vitro* for 6 h with 10 µg of *L. major* DNA alone or with 10 µg of vertebrate DNA (mouse or pig). Cytokines production was measured by ELISA in the supernatants of cultures. **(A)** The data represent the mean and SEM of three independent experiments. Significant differences are indicated (*, p<0.05; **, p<0.01). **(B)** The percentage of inhibition of BMDCs activation obtained by adding increasing amount of vertebrate DNA (mouse, pig or sheep) to *L. major* DNA. Percentage (%) of inhibition = [100-(cytokines production by *L. major* with vertebrate DNA/cytokines production by *L. major* DNA alone)]×100. The data represent one of two independent experiments.

Figure 7 The immunostimulatory activities of other *trypanosomatidae* DNA are based on their common properties

(A) C57BL/6 BMDCs were stimulated *in vitro* for 6 h with 10 µg of *T. cruzi* DNA alone or in competition with 10 µg of vertebrate DNA. Cytokines were measured by ELISA. The data represent the mean and SEM of three independent experiments. Significant differences are indicated (*, p<0.05; **, p<0.01). **(B)** The data represent the ratio of observed/expected number rO/E for each motif [stimulatory (RRCGY and HRWCGTTN) or inhibitory (WKKVGGGG and CCNDDNNGGG)] from the analysis of *trypanosomatidae* complete genomes (Table I).

Figure 8 Stimulation of human plasmacytoid dendritic cells by *L. major* and vertebrate DNA

Human plasmacytoid cell line (Gen2.2) was stimulated by *L. major*, mouse and human DNA alone (*left*) or complexed with DOTAP (*right*). In the indicated lanes, cells were treated with chloroquine (20 µM) before *L. major* stimulation. Expression of the indicated cytokines was determined by real time RT-PCR. The mRNA expression levels were calculated as described in Figure 1 and the results represent the mean and SEM of three independent experiments (*p<0,05, **p<0,01).

FIGURE 1

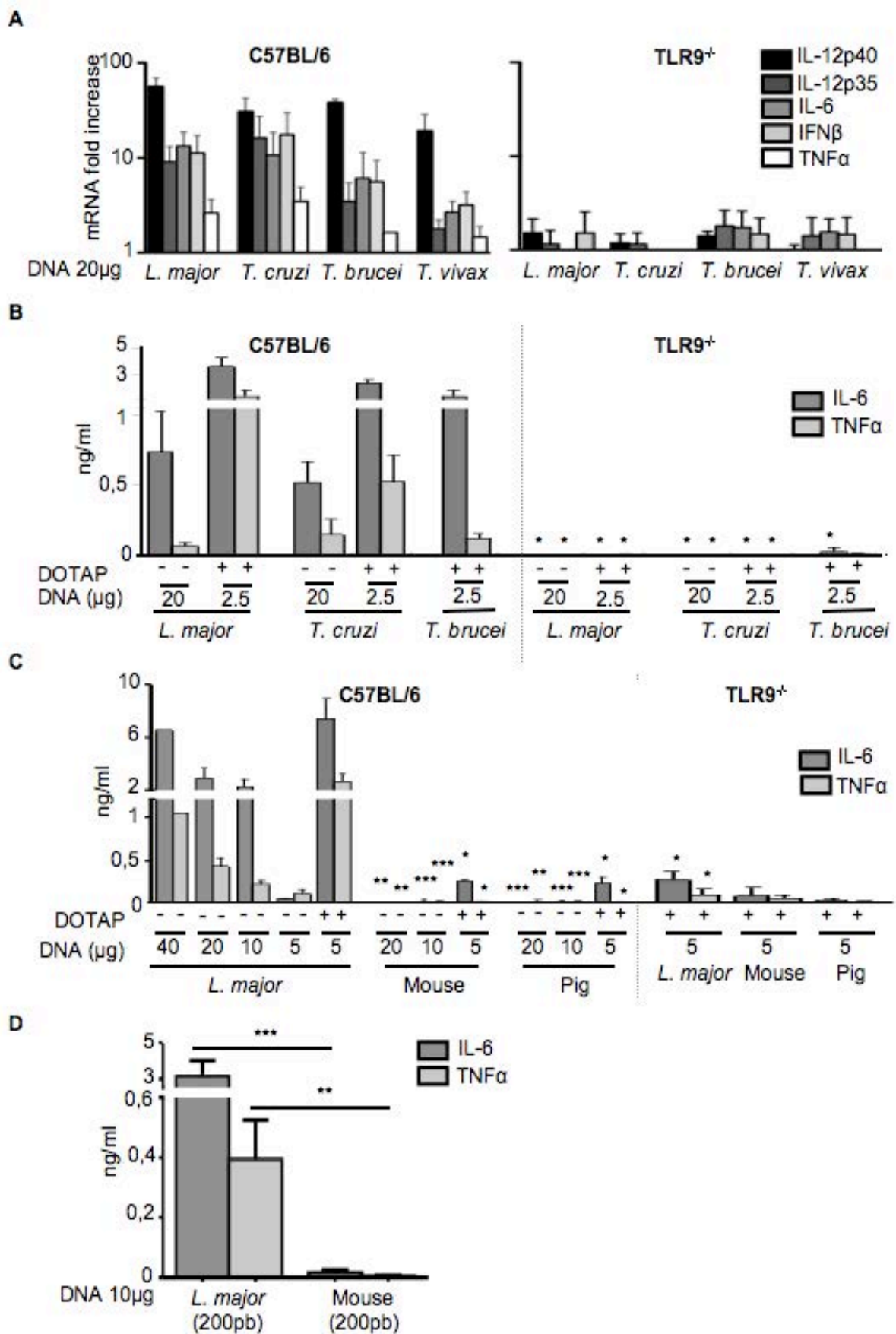
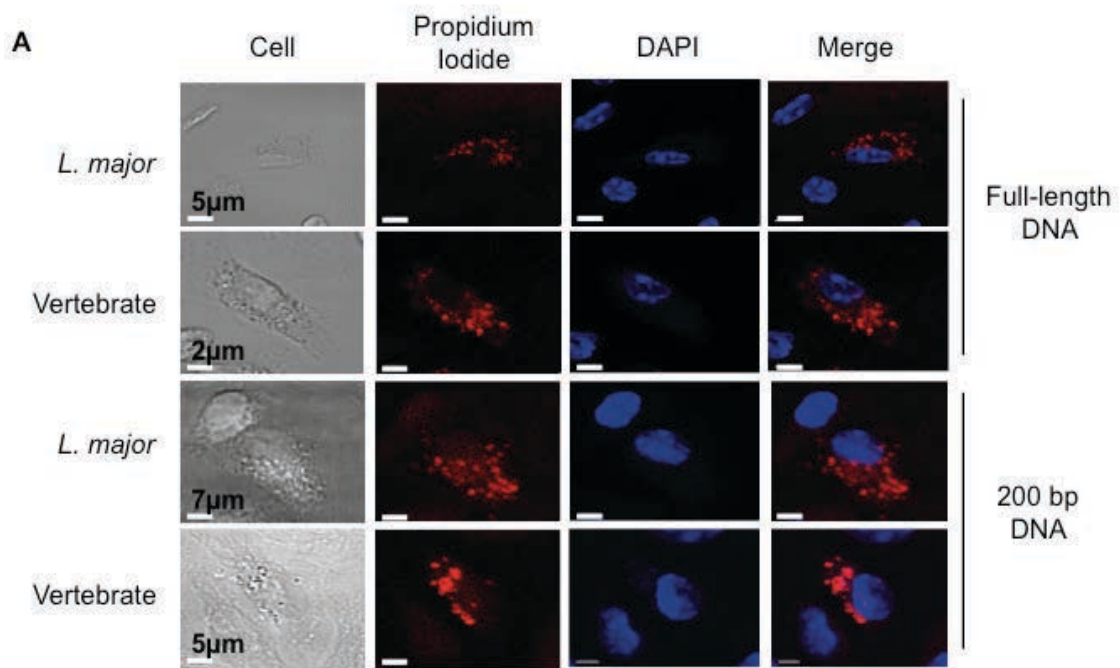
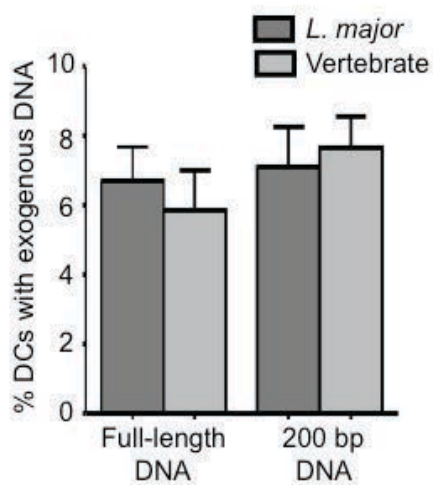


FIGURE 2



B Microscopy



C Flow cytometry

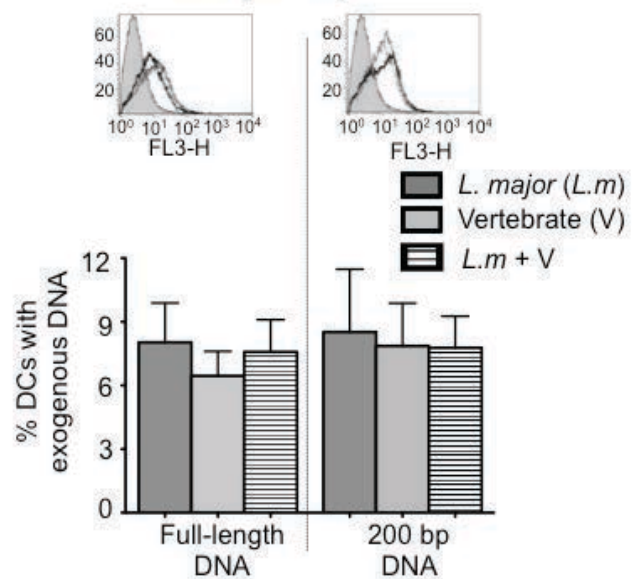


FIGURE 3

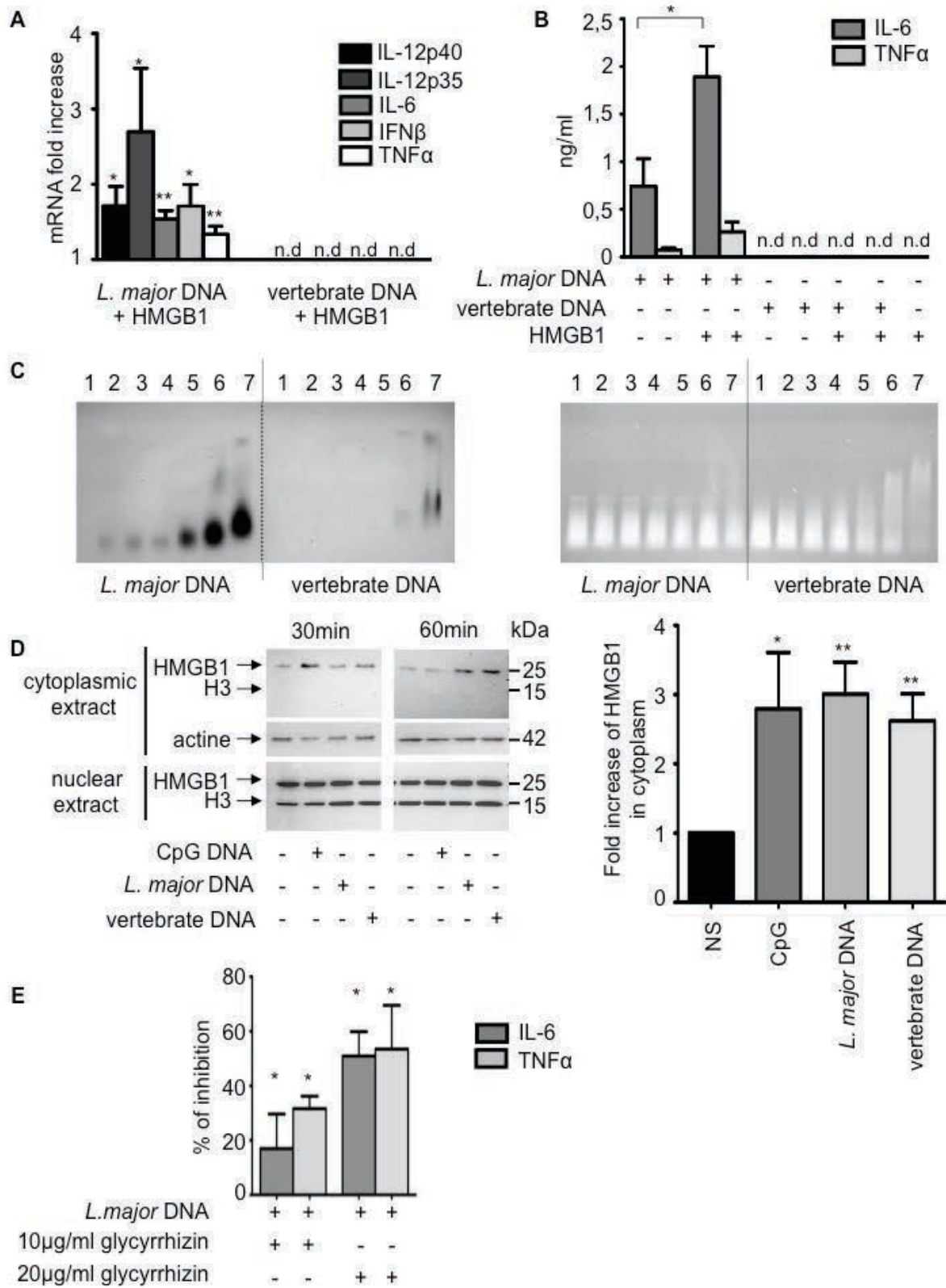


FIGURE 4

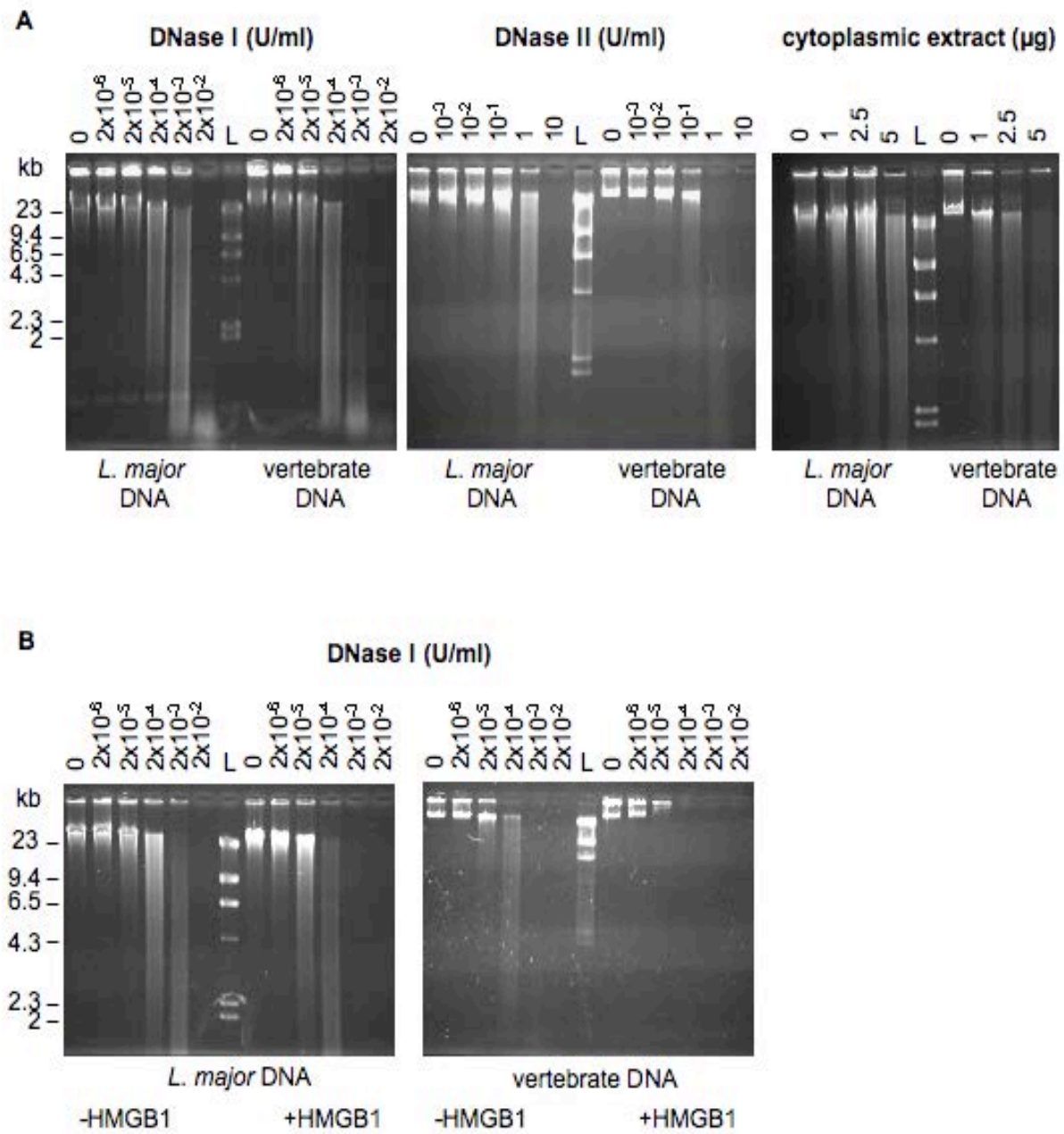


FIGURE 5

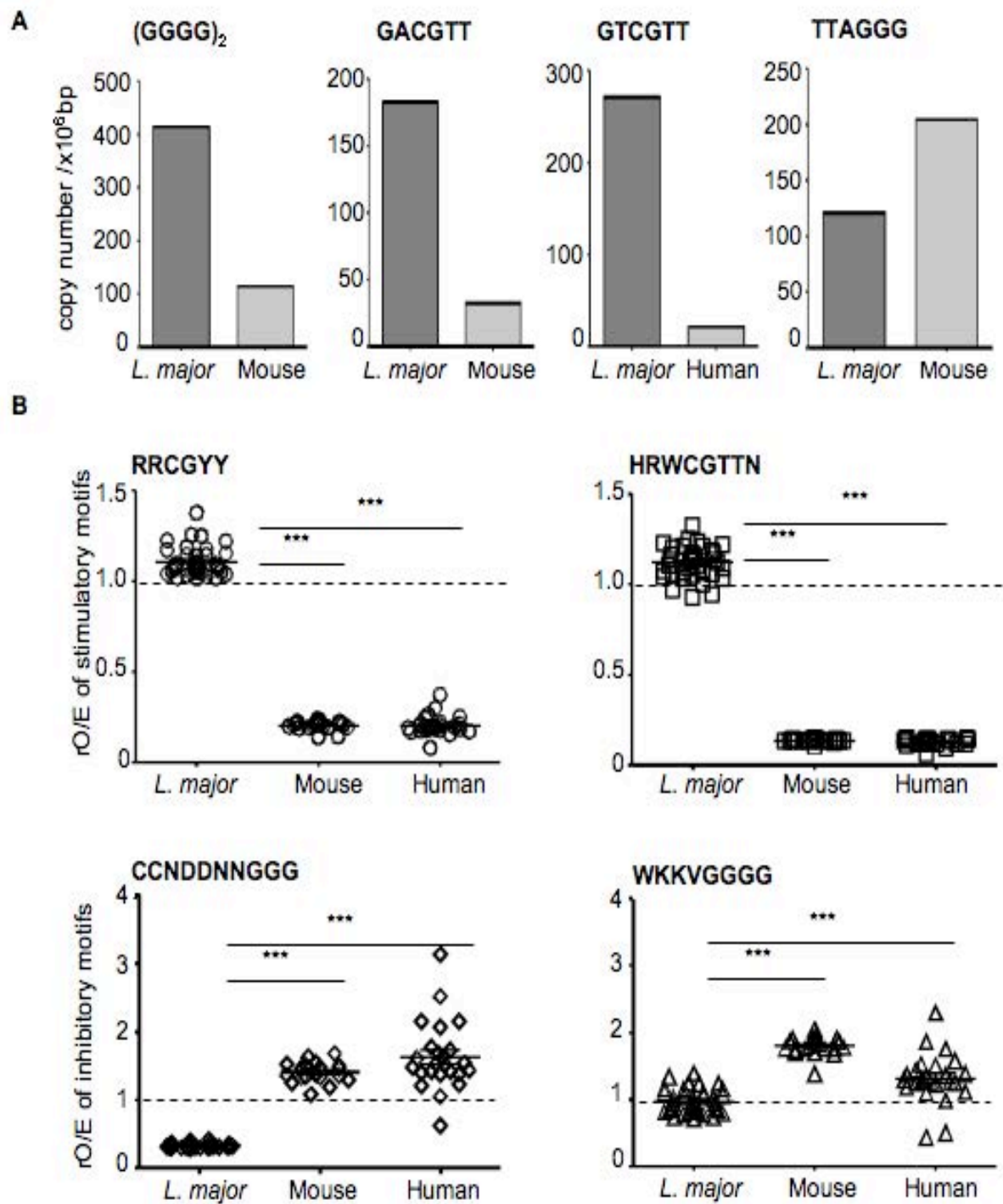


FIGURE 6

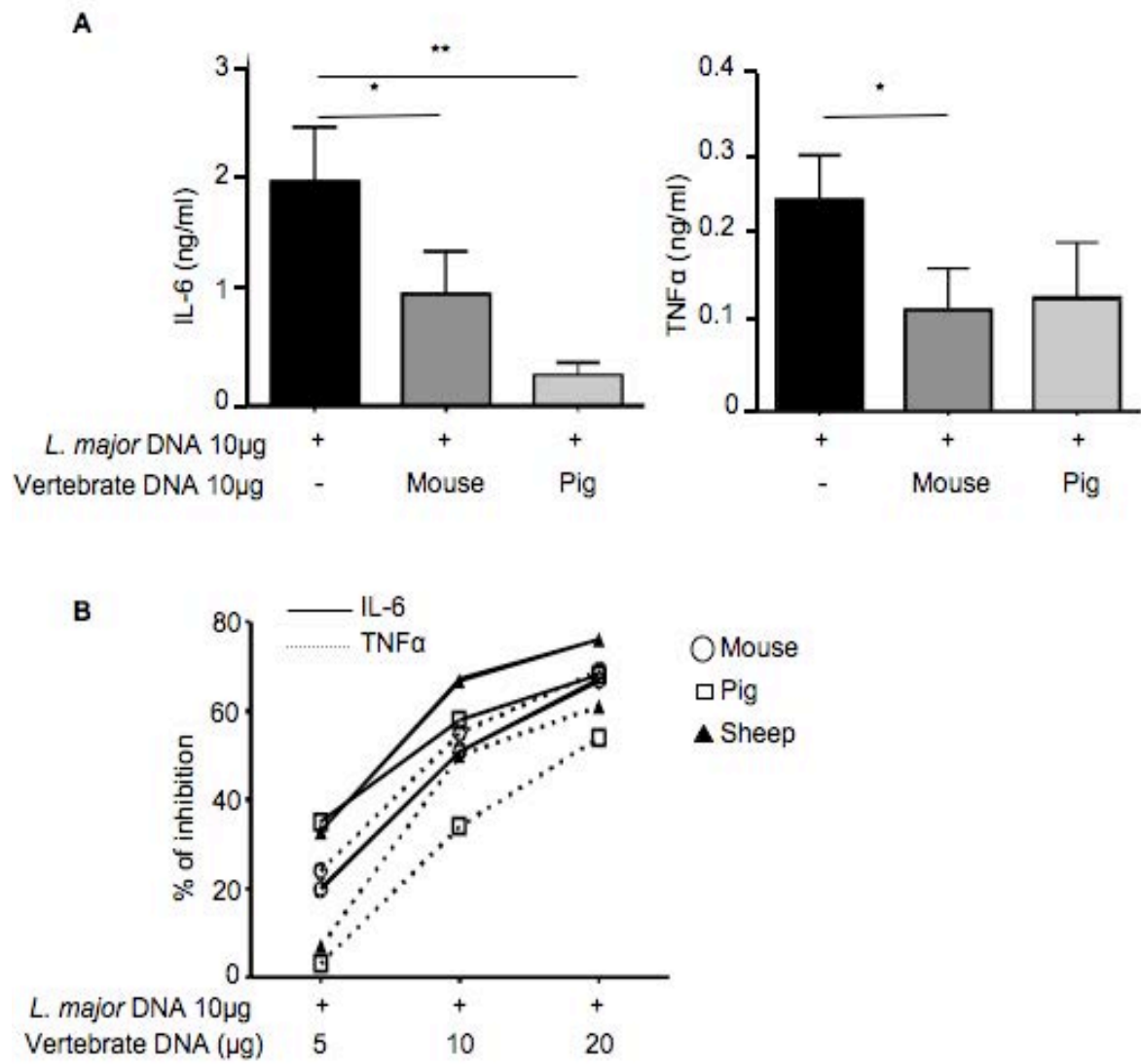


FIGURE 7

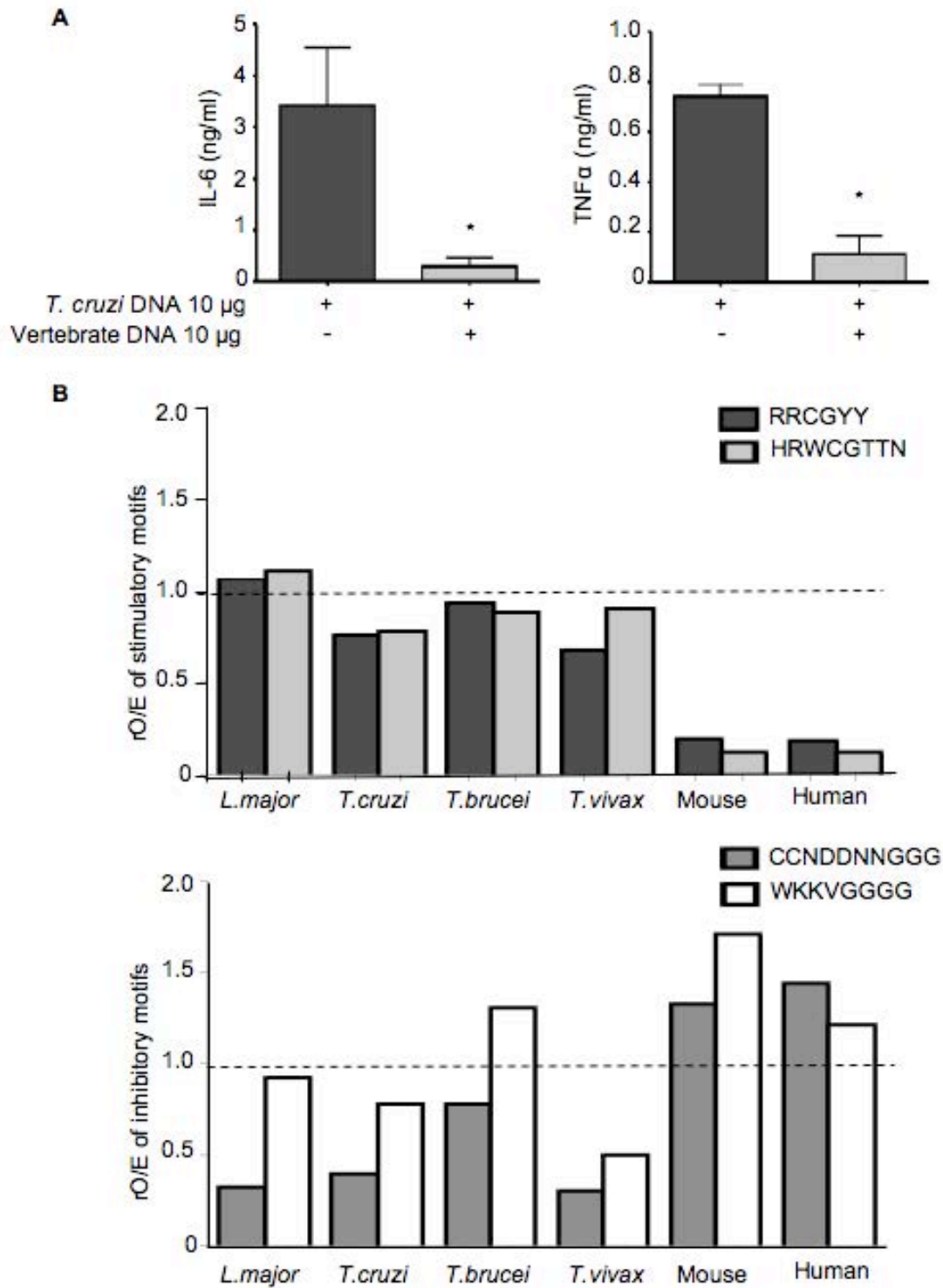


FIGURE 8

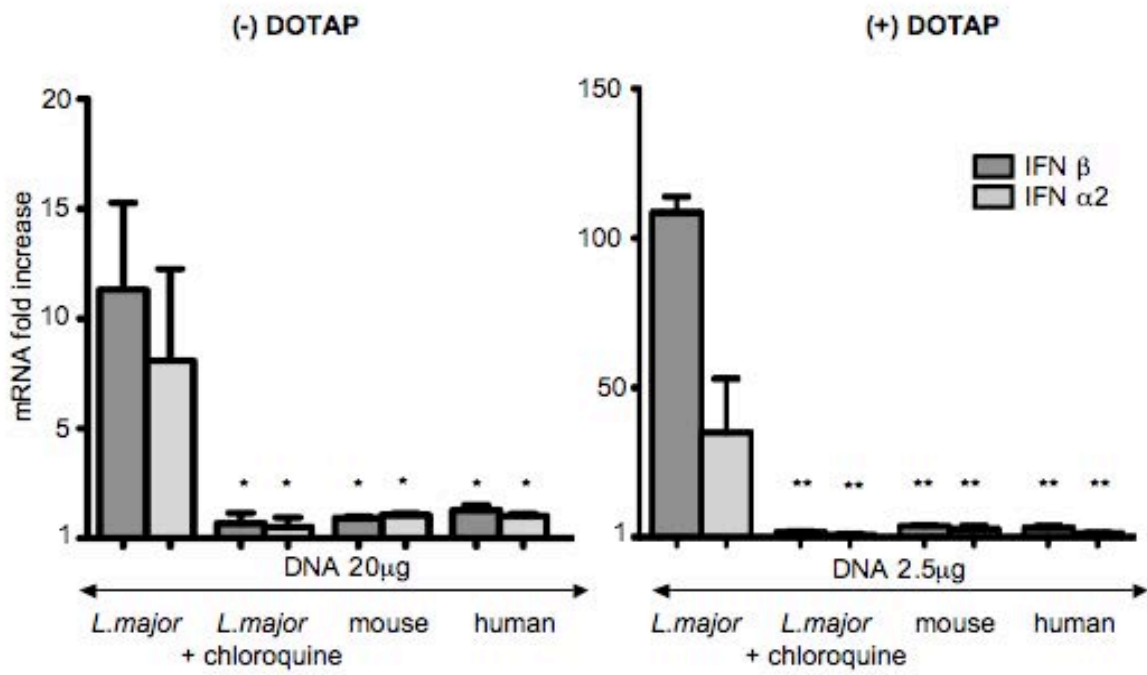


Table I

Stimulatory motif		Frequency	Expected number	Observed number	rO/E
RRCGY	<i>L. major</i>	$5.63 \cdot 10^{-3}$	184500	197597	1.07
	<i>T. cruzi</i>	$4.23 \cdot 10^{-3}$	137439	105362	0.77
	<i>T. brucei</i>	$3.31 \cdot 10^{-3}$	87665	82685	0.94
	<i>T. vivax</i>	$4.56 \cdot 10^{-3}$	103513	70098	0.68
	Mouse	$2.76 \cdot 10^{-3}$	7607250	1490164	0.20
	Human	$2.76 \cdot 10^{-3}$	8875125	1665432	0.19
HRWCGTTN	<i>L. major</i>	$5.04 \cdot 10^{-4}$	16531	18555	1.12
	<i>T. cruzi</i>	$6.92 \cdot 10^{-4}$	22496	17819	0.79
	<i>T. brucei</i>	$8.02 \cdot 10^{-4}$	21258	18976	0.89
	<i>T. vivax</i>	$6.47 \cdot 10^{-4}$	14710	13428	0.91
	Mouse	$8.50 \cdot 10^{-4}$	2345140	309431	0.13
	Human	$8.50 \cdot 10^{-4}$	2735997	347034	0.13
Inhibitory motif					
CCNDDNNGGG	<i>L. major</i>	$1.19 \cdot 10^{-3}$	39055	12726	0.33
	<i>T. cruzi</i>	$6.51 \cdot 10^{-4}$	21165	8478	0.40
	<i>T. brucei</i>	$3.82 \cdot 10^{-4}$	10118	7873	0.78
	<i>T. vivax</i>	$7.65 \cdot 10^{-4}$	17372	5267	0.30
	Mouse	$2.55 \cdot 10^{-4}$	703493	936758	1.33
	Human	$2.55 \cdot 10^{-4}$	820742	1183790	1.44
WKKVGGGG	<i>L. major</i>	$6.48 \cdot 10^{-4}$	21254	19451	0.92
	<i>T. cruzi</i>	$4.17 \cdot 10^{-4}$	13557	10625	0.78
	<i>T. brucei</i>	$2.76 \cdot 10^{-4}$	7312	9605	1.31
	<i>T. vivax</i>	$4.71 \cdot 10^{-4}$	10691	5305	0.50
	Mouse	$2.00 \cdot 10^{-4}$	552602	944031	1.71
	Human	$2.00 \cdot 10^{-4}$	644703	787326	1.22

Analysis for stimulatory and inhibitory motifs in *trypanosomatidae* and vertebrate genomes

Stimulatory motifs (RRCGY for [purin-purin-C-G-pyrimidin-pyrimidin]; HRWCGTTN for [(notG)-purin-(A or T)-C-G-T-T-any base] and inhibitory motifs (WKKVGGGG for [(A or T)-(G or T)-(G or T)-(A or C or T)-G-G-G-G]; CCNDDNNGGG for [C-C-x-(notC)-(notC)-x-x-G-G-G], where x stands for any base) were searched in whole genomes. For each motif, the counted number was indicated as the observed number. The expected motif number was calculated as (motif frequency x genome size). The motif frequency corresponds to the product of frequency for each nucleotide, which is different from one genome to another (Supplementary Table I). The rO/E corresponds to the ratio between the observed number and the expected number of the motifs.

Table II

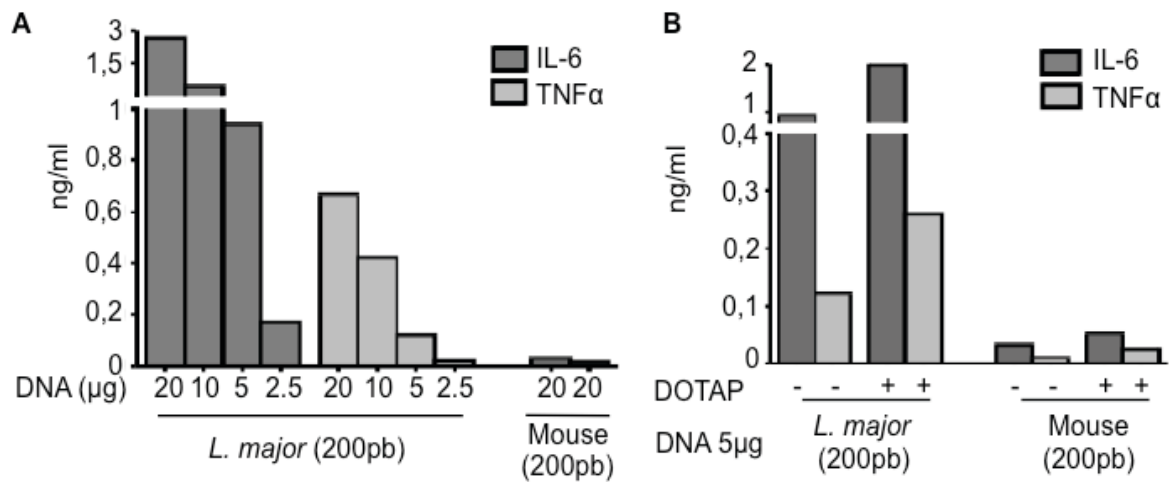
S/I	<i>L. major</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>T. brucei</i>	<i>T. vivax</i>	Mouse	Human
A/C	15.5	12.4	10.5	13.3	1.6	1.4
A/D	10.2	9.9	8.6	13.2	1.6	2.1
B/C	1.5	2.1	2.4	2.5	0.3	0.3
B/D	1.0	1.7	2.0	2.5	0.3	0.4

A- RRCGY	197597	105362	82685	70098	1490164	1665432
B- HRWCGTTN	18555	17819	18976	13428	309431	347034
C-CCNDDNNGGG	12726	8478	7873	5267	936758	1183790
D- WKKVGGGG	19451	10625	9605	5305	944031	787326

Ratio between stimulatory and inhibitory motifs in *trypanosomatidae* and vertebrate genomes

The table shows the S/I ratio that corresponds to (number of stimulatory motif/ number of inhibitory motif) calculated for each motif and genome. The number of motifs observed in each genome is reported as in Table I, A and B corresponding to the stimulatory motifs and C and D to the inhibitory ones. The S/I ratios are significantly higher in *trypanosomatidae* DNA than in mouse DNA, according to Wilcoxon test ($p < 0.5$).

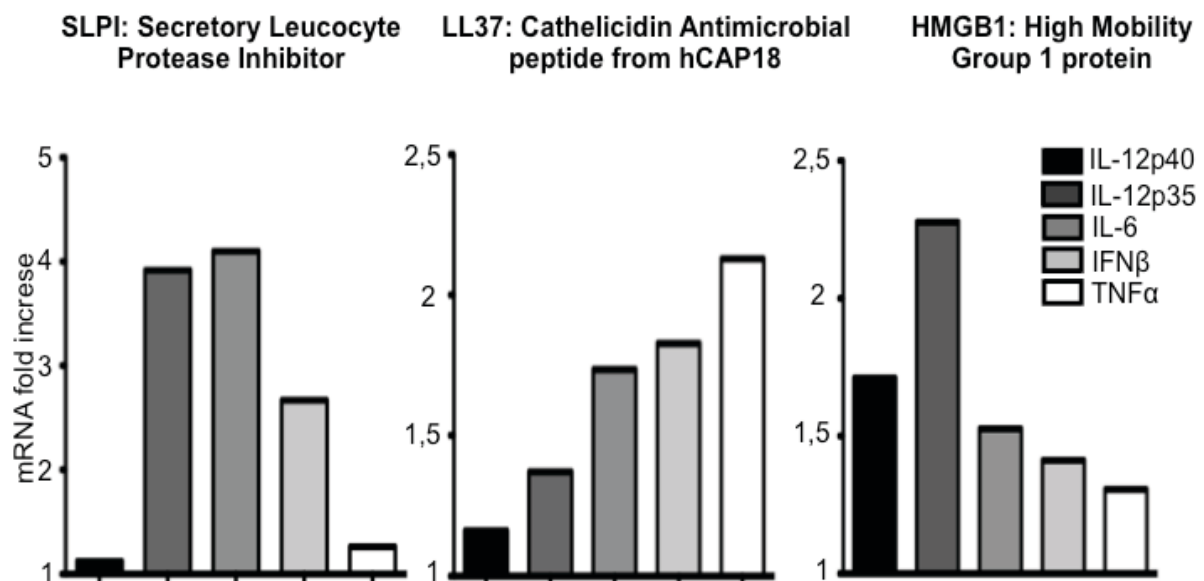
SUPPLEMENTARY FIGURE 1



BMDCs stimulation by sonicated mouse and *L. major* DNA

BMDCs were stimulated 6 h (A) by increasing amount of sonicated *L. major* DNA or 20 µg of vertebrate DNA or (B) with 5 µg of DNA alone or complexed with DOTAP. Cytokines production was analysed by ELISA. Results are from one of two independent experiments.

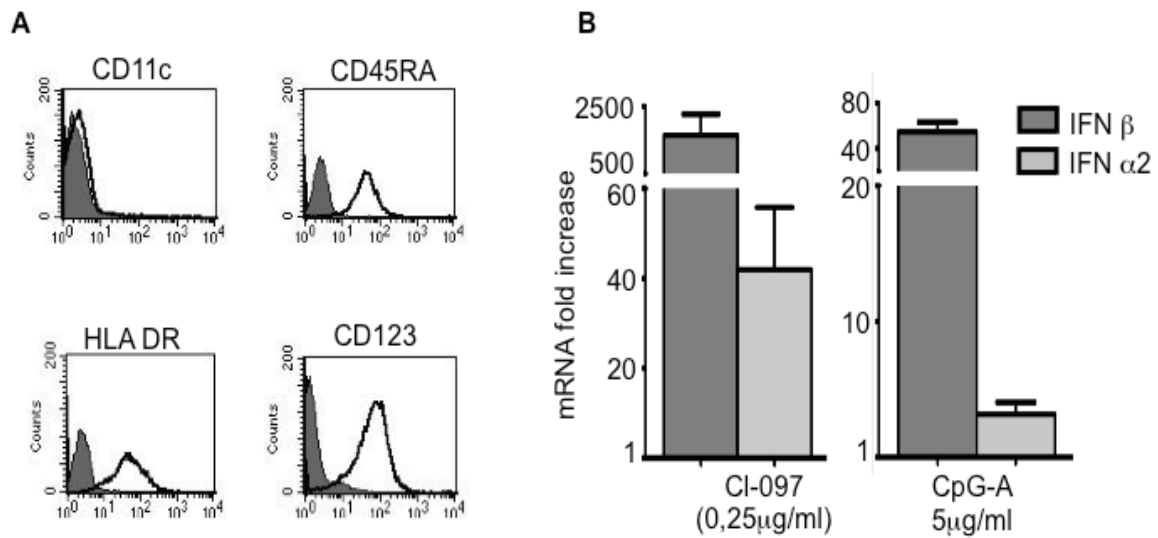
SUPPLEMENTARY FIGURE 2



BMDCs stimulation by *L. major* DNA complexed with different cofactors

BMDCs were stimulated with *L. major* DNA complexed with SLPI (20 µg), LL37 (2 µg), or HMGB1 (1 µg) or alone (as control) for 6 h. Expression of the indicated cytokines was determined by real-time RT-PCR. The data are expressed as the n-fold difference with the expression in stimulated BMDCs by *L. major* DNA alone. The mRNA expression levels were normalized to the expression of the HPRT gene. Results are from one of three independent experiments.

SUPPLEMENTARY FIGURE 3



Characterization of the GEN2.2 plasmacitoid cell line

(A) Cell surface expression of CD11c, CD45RA, HLA-DR and CD123 on GEN2.2 was analysed by flow cytometry under resting condition. Filled histograms represent staining with isotype control. **(B)** Cytokines mRNA were detected by real time PCR after stimulation of GEN2.2 cells stimulated for 6 h with CpG-A (5 μ g) or with the imidazoquinoline CI-097 (0.25 μ g). Results are from three independent experiments.

Supplementary Table I

	Genome	Nucleotide frequency				Observed number for different motifs			
	size (Mb)	A	C	G	T	(GGGG) ₂	GACGTT	GTCGTT	TTAGGG
<i>L.major</i>	32.8	0.20	0.30	0.30	0.20	13586	6001	8901	3962
Mouse	2760	0.29	0.21	0.21	0.29	312029	87927	nc	564466
Human	3220	0.29	0.21	0.21	0.29	34461	nc	67965	542317
<i>T.cruzi</i>	32.5	0.24	0.26	0.26	0.24	nc	nc	nc	nc
<i>T.brucei</i>	26.5	0.27	0.23	0.23	0.27	nc	nc	nc	nc
<i>T.vivax</i>	22.7	0.23	0.27	0.27	0.23	nc	nc	nc	nc

Characteristics of *trypanosomatidae* and vertebrate genomes

The left part shows the genomic size and the frequency for each nucleotide. The right part shows the observed numbers of motifs ((GGGG)₂, GACGTT, GTCGTT, TTAGGG), counted by the in-house computer program (wcount). *nc* : *not counted*

ETUDES COMPLEMENTAIRES

MATERIEL ET METHODES

Analyse par cytométrie en flux

3.10⁶ BMDCs ont été stimulées avec 1.5.10⁷ de parasites *L. major* LV39-GFP (1h à 16h), 4μM de CpG-Alexa 488 (30min à 2h) ou 20μg d'ADN marqué à l'iodure de propidium (ADN-IP) en présence ou non de CpG-Alexa 488 (30min) dans des plaques 6 puits. Pour les cellules incubées avec des parasites, les cellules ont été lavées avec du PBS puis incubées avec de la trypsine-EDTA (0.025%) pendant 5min, à 37°C, avant d'être lavées dans du milieu complet puis dans du PBS. Pour les analyses en cytométrie en flux au FACScalibur, les cellules ont été centrifugées à 1500rpm, 4°C, 5min, et reprises dans du PBS- 0.5%SVF - 2mM EDTA et marquées avec des anticorps anti-CD11c-APC.

Immunofluorescence

7.5.10⁵ BMDCs ont été mises sur des lamelles en verre durant 2h puis stimulées avec 3.75.10⁶ de parasites *L. major* LV39-GFP (1h ou 2h) ou 4μM de CpG-Alexa 488 (30min à 2h) ou 10μg d'ADN marqué à l'iodure de propidium (ADN-IP) en absence ou en présence de CpG-Alexa 488 (30min à 1h) dans des plaques 24 puits. Pour le marquage intracellulaire des lysosomes avec LAMP1, les cellules ont été traitées à 4°C par fixation et perméabilisation avec le kit Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen) selon les consignes du fabricant, puis marquées avec un anticorps anti-LAMP1 au 500^e (1D4B, Developmental Studies Hybridoma Bank), un anticorps secondaire (au 1000^e) puis tertiaire (au 1000^e) couplé à l'Alexa-488. Le marquage des noyaux a été réalisé au DAPI (100ng/ml).

Suivi de l'acidification du pH

L'acidification du pH a été suivi après activation de BMDCs par du CpG (10 μg/ml) ou par de l'ADN de *L. major* ou de vertébré (30 μg/ml). Pour chaque condition, 4.10⁶ de BMDCs (isolées de la moelle osseuse, mises en culture et récoltées à J8, comme il est décrit dans l'article précédent) sont incubées dans 50μl de milieu RPMI sans SVF chaud (37°C) contenant du dextran de 40kDa couplé au FITC (sensible au pH) (1 mg/ml), ou couplé à l'Alexa 647 (insensible au pH) (0.5 mg/ml), avec ou sans ligand d'activation, pendant 10 min

à 37°C, pendant lequel les cellules internalisent le dextran et le ligand si présent. L'internalisation est ensuite arrêtée par l'ajout de PBS-BSA 1% froid (sur glace). Après ce pulse, les cellules sont ensuite lavées 2 fois et centrifugées à 1500 rpm, 5min, 4°C. Les cellules sont resuspendues dans du milieu chaud RPMI avec SVF et laissées à 37°C pendant le temps de la chasse. Toutes les 10 min, un aliquot de l'échantillon chassé est prélevé et analysé en cytométrie de flux selon un cadre FL1/FL4 pour n'avoir que les cellules ayant internalisé les deux types de dextran.

Dans le même temps, une gamme standard est réalisée avec des BMDCs pulsées avec les deux types de dextran, permettant de mesurer la diminution de la fluorescence du dextran FITC en fonction du pH. Après le pulse et les lavages, elles sont directement reprises dans des milieux de pH différents, avec du triton 0.1%, et analysées immédiatement par cytométrie en flux.

Purification des endosomes

Pour chaque condition, $50 \cdot 10^6$ de BMDCs sont incubées avec des billes magnétiques Dynabeads® (0.8 mg/ml) à 37°C, 5% CO₂, avec ou sans ligand, dans 500 µl final. Les BMDCs ont été activées par du CpG (10 µg/ml) ou par de l'ADN de *L. major* ou de vertébré (30 µg/ml). Pour des endosomes précoces, les échantillons sont récupérés au bout de 20 min. Pour les endosomes tardifs, 2.5 ml de milieu sont rajoutés aux 500 µl initiaux au bout de 20 min et l'échantillon est récupéré après 2h d'incubation. La réaction est ensuite arrêtée avec du PBS-BSA 0.1% froid, lavés plusieurs fois et centrifugées à 1500 rpm, 4°C, 5 min. Puis les cellules sont lysées avec 1ml de tampon d'homogénéisation (8% sucrose, 3mM imidazole, DNase 5 µg/ml, DTT 2µM et inhibiteurs de protéase (Roche)) à froid, avec seringues et aiguilles (22G). Les agrégats cellulaires sont récupérés à l'aide d'un support magnétique. Ils sont repris dans 1ml de tampon de lavage (Hepes 10mM, KCl 110mM, NaCl 10mM, MgCl₂ 5mM et DTT 2mM) et lavés plusieurs fois. Les endosomes ainsi obtenus avec le support magnétique sont lysés dans 40µl de tampon de lyse (50mM Tris pH 7, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0.5% NP-40 et inhibiteur de protéases) 30 min à froid. Le lysat est ensuite centrifugé à 11000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant récupéré correspond au lysat d'endosomes purifiés.

Activation de fibroblastes embryonnaires murins et immuno-précipitation

Des fibroblastes (3×10^6) ont été transfectés avec le plasmide pUNO-mTLR9-HA d'Invivogen et le plasmide UNC93B1-cherry avec du Lipofectamine 2000, selon les consignes du

fabricant. 24h après transfection, les fibroblastes ont été stimulés 1h ou toute la nuit par du CpG (1µg) ou par de l'ADN génomique (10µg ou 5µg), avec ou sans DOTAP (10µg). 1h après l'activation, les cellules ont été récupérées et lysées dans le tampon RIPA (Sigma-Aldrich) complété par des anti-protéases. Les extraits protéiques totaux ainsi obtenus ont été dosés et une quantité identique de protéines a été immuno-précipité toute la nuit, à 4°C, avec un anticorps anti-HA (1:5000, Invivogen). Les extraits immunoprécipités ont alors été incubés avec de la protéine A immobilisée sur de la sépharose CL-4B (Sigma-Aldrich), lavés et dénaturés à 95°C avant leur séparation sur un gel 10% SDS-PAGE. Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF (Amersham, Biosciences). Le TLR9 a été révélé par chimioluminescence à l'aide d'un anticorps anti-HA. 16h après activation, les surnageants ont été récoltés et analysés par ELISA.

RESULTATS

I- Internalisation du parasite et de son ADN dans les cellules dendritiques.

Dans un premier temps, nous avons souhaité étudier l'internalisation de parasites *Leishmania major*, d'oligonucléotides ADN et d'ADN génomique dans les cellules dendritiques dérivées de la moelle (BMDCs) de souris C57BL/6 et de souris déficientes pour le TLR9, nous les avons suivi par cytométrie en flux (**Figure 1**) ou par microscopie confocale (**Figure 2**).

Pour déterminer la cinétique de pénétration des parasites *Leishmania major*, nous avons utilisé la souche LV39-GFP et observé les cellules CD11c⁺GFP⁺, correspondant aux BMDCs ayant internalisé des parasites GFP. Un traitement à la trypsine a permis le détachement et l'élimination des parasites liés à la surface cellulaire. A 1h, les parasites se retrouvent à l'intérieur des cellules dendritiques, avec un niveau similaire entre les BMDCs des souris contrôles et celles des souris déficientes pour le TLR9 (21.9% pour les BMDCs C57BL/6 et 27% pour les BMDCs TLR9^{-/-}) (**Figure 1A et 2A**). La proportion de ces cellules augmente jusqu'à 6h. Jusqu'à 16h, elle est restée stable ou a légèrement diminué (**Figure 1A**). Tout au long de la cinétique, le pourcentage de CD11c⁺GFP⁺ reste similaire dans les deux lignées. Selon l'état des parasites et l'état des BMDCs, le niveau d'internalisation est un peu différent mais dans l'ensemble, le profil reste identique entre les lignées C57BL/6 et TLR9^{-/-} (**Figure 1A et 2A**). Nous avons de même comparé l'internalisation du CpG-Alexa 488 par les cellules dendritiques des deux lignées et observé que la proportion de cellules contenant du CpG marqué reste aussi similaire, aussi bien par cytométrie en flux que par observation par microscopie confocale (**Figure 1B et 2B**). Ces résultats montrent ainsi que l'internalisation du parasite et d'oligonucléotides ADN n'est pas différente dans les BMDCs de C57BL/6 et TLR9^{-/-} et ne reflètent pas les différences dans l'activation.

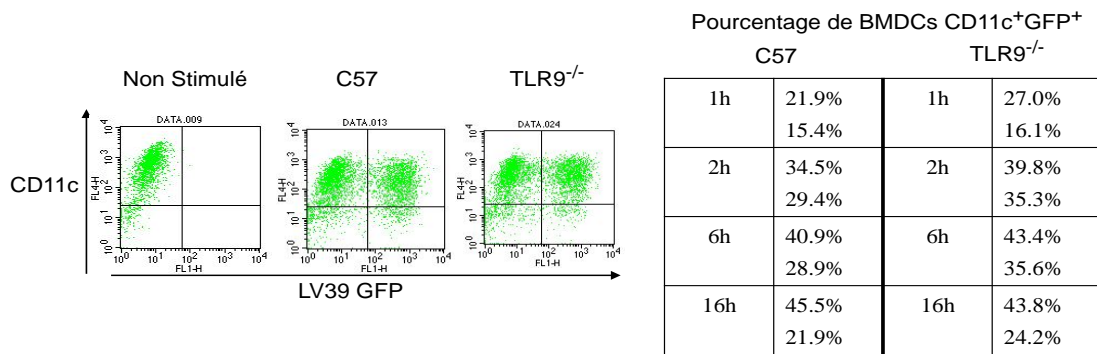
La pénétration rapide du CpG dans la cellule nous a permis d'étudier l'internalisation de l'ADN marqué par un marquage non covalent à l'iodure de propidium et de le suivre sur un temps très court, pour préserver le marquage non covalent et éviter sa dégradation par la DNase.

Notre objectif étant d'étudier l'internalisation de l'ADN génomique, nous avons marqué l'ADN par de l'iodure de propidium (ADN-IP) et l'avons suivi en absence ou en présence de CpG marqué (CpG-A488), par cytométrie en flux et microscopie confocale (**Figure 1C et**

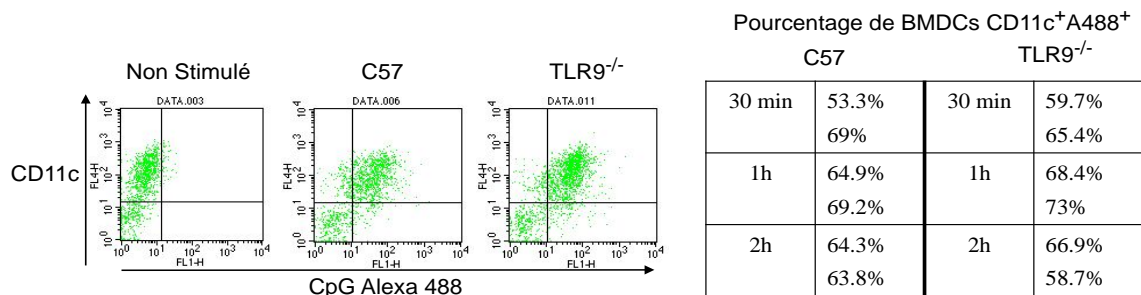
2C). Nous avons observé une faible proportion de cellules contenant de l'ADN marqué, par rapport à celle ayant internalisé du CpG marqué. Nous avons pu ainsi comparer de l'ADN du parasite et de l'ADN de vertébré non stimulateur (voir article).

Figure 1

1A.



1B.



1C.

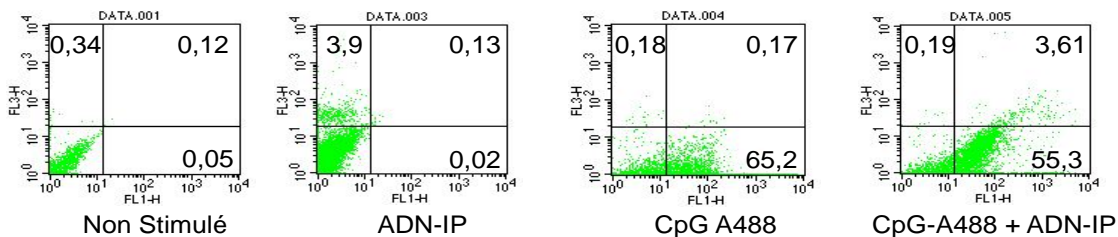


Figure 1 Etude par cytométrie en flux de l'internalisation du parasite-GFP et de l'ADN marqué par cytométrie en flux. Des BMDCs de souris C57BL/6 ou TLR9^{-/-} ont été incubés avec (1A) des parasites *L. major* LV39-GFP ou (1B) du CpG-Alexa 488 pendant les temps indiqués. Le pourcentage de cellules CD11c⁺GFP⁺ ou CD11c⁺Alexa488⁺ a été reporté dans le tableau. (1C) avec de l'ADN marqué à l'iodure de propidium (ADN-IP) (suivi dans le channel FL3) et/ou avec du CpG-Alexa 488. Le pourcentage de cellules observé dans les différents cadrans par analyse en cytométrie en flux est mentionné.

Figure 2

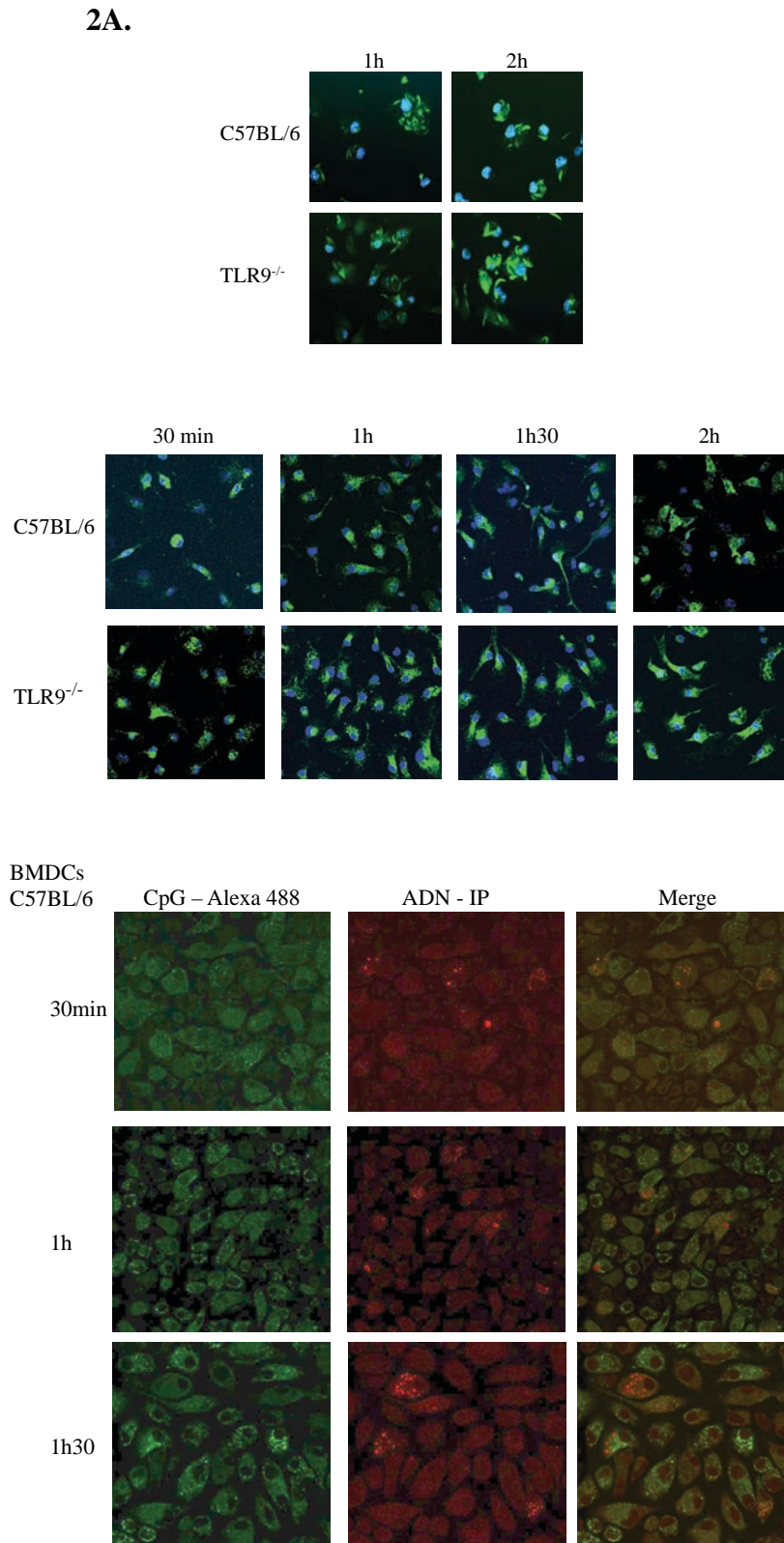


Figure 2 Etude par microscopie confocale de l'internalisation du parasite-GFP et de l'ADN marqué par microscopie confocale. Des BMDCs de souris C57BL/6 ou TLR9^{-/-} ont été incubés avec (2A) des parasites *L. major* LV39-GFP, (2B) du CpG-Alexa 488 ou (2C) du CpG-Alexa 488 et de l'ADN marqué à l'iodure de propidium (ADN-IP) pendant les temps indiqués.

II- Etude de la localisation de l'ADN dans les cellules dendritiques

Après avoir observé une internalisation semblable par les BMDCs de l'ADN de parasite et l'ADN de vertébré, nous avons recherché si ces ADN se trouvaient dans le même compartiment. L'absence d'anticorps spécifique anti-TLR9 ne nous permettant pas de chercher une co-localisation de l'ADN et son récepteur, nous avons tenté de co-localiser l'ADN dans les lysosomes avec le marqueur LAMP-1 ou dans les endosomes avec le marqueur EEA1. Le faible nombre de cellules ayant internalisé l'ADN par les BMDCs et le marquage diffus de LAMP-1 ne nous a pas permis d'observer une colocalisation (**Figure 3**). Nous poursuivons actuellement cette étude.

Figure 3

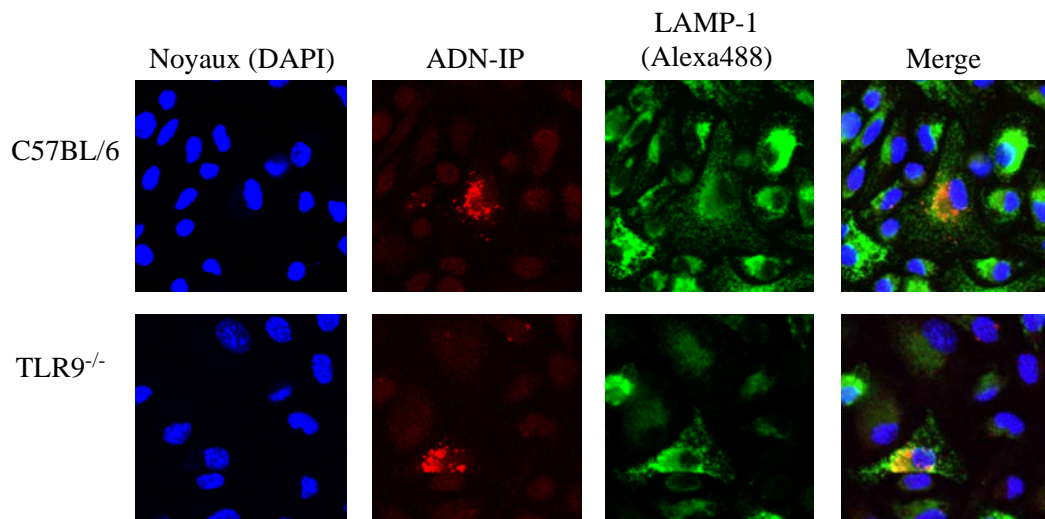


Figure 3 Etude de la localisation intracellulaire de l'ADN de *L. major* Des BMDCs de souris C57BL/6 ou TLR9^{-/-} ont été incubés 1h avec de l'ADN de *L. major* marqué à l'iodure de propidium (ADN-IP) puis les noyaux (DAPI) et les lysosomes (LAMP-1 Alexa 488) des cellules ont été marqués.

III- Etude la maturation du TLR9 dans les cellules dendritiques suite à une stimulation ADN

A. Etude du pH endosomal

N'ayant obtenu aucune différence au niveau de l'internalisation entre l'ADN de parasite et celui de vertébré dans la cellule, nous avons entrepris de comparer la maturation du TLR9 après stimulation par l'un ou l'autre ADN.

En réponse à une stimulation CpG, le compartiment endosomal change de pH et son acidification permet l'activation des protéases intervenant dans le clivage du TLR9.

Nous avons étudié l'évolution du pH endosomal des BMDCs par cytométrie en flux durant 1h, après stimulation par l'ADN de *L. major* ou l'ADN de vertébré. Nous avons utilisé pour cela un dextran couplé à un fluorochrome sensible au pH (FITC) ou couplé à un fluorochrome insensible au pH (Alexa647), pouvant être endocytés, avec lesquels nous avons obtenu une gamme de fluorescence en fonction de pH définis. Plus le pH est faible, plus le dextran sensible au pH perd de la fluorescence et la fluorescence décroît. La courbe étalon permet ainsi de mesurer la baisse de pH dans la cellule. Cependant, celle-ci n'a pu être correctement déterminée et en conséquence, n'a pas permis de mesurer le pH dans la cellule. Nous avons cependant interprété nos résultats en quantifiant la diminution de la fluorescence sensible au pH.

Après stimulation par le CpG, on observe une baisse de la fluorescence, qui est plus importante que celle observée sans stimulation (**Figure 4**). De même, nous avons pu mettre en évidence une diminution du pH avec l'ADN de vertébré et de parasite, qu'il soit soniqué ou non. (**Figure 4**). Cette baisse est moindre que pour le CpG mais est similaire pour tous les ADN. Ces résultats suggéraient l'existence d'une maturation endosomale et d'une baisse de pH qui ne sont pas différentes en fonction des ADN.

Figure 4

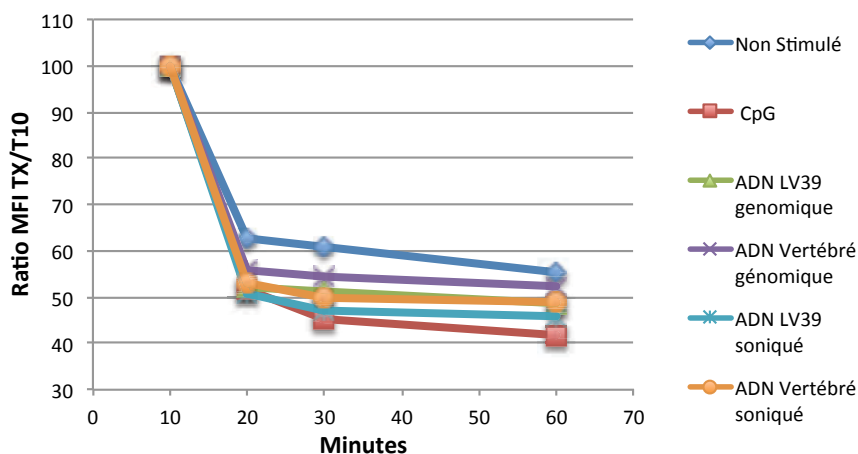


Figure 4 Evolution du pH endosomal après activation par l'ADN ou le CpG. Des BMDCs de souris C57BL/6 ont été stimulés ou non avec du CpG, de l'ADN de *L. major* ou de vertébré (entier ou soniqué à 500pb). L'acidification des endosomes a été suivie par un pulse des BMDCs avec du dextran sensible au pH durant 10min puis chassées jusqu'à 1h. Elle est représentée ici selon le ratio de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) observée à un temps donné (TX) par rapport au temps initial (T10), correspondant à 10min après le pulse.

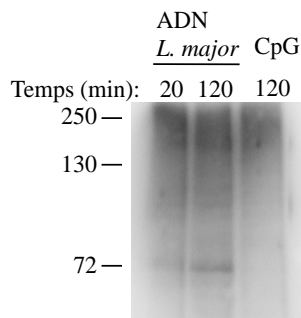
B. Etude du clivage du TLR9

Nous avons alors entrepris de comparer la maturation du TLR9 de façon directe en étudiant son clivage après stimulation par l'ADN de parasite et de vertébré.

Nous avons dû pour cela purifier les endosomes. En effet, la quantité du TLR9 endogène est faible, nécessitant un enrichissement des extraits protéiques en TLR9 par une purification. Par Western Blot, nous avons généralement observé une bande unique aux alentours de 75 kDa, qui aurait pu correspondre (**Figure 5A**). Mais par la suite, il est apparu qu'il s'agissait d'une bande non spécifique, que l'on retrouve aussi dans des extraits protéiques de BMDCs de souris TLR9^{-/-} (**Figure 5B**). Les souris TLR9^{-/-} pourraient exprimer en réalité un TLR9 tronqué inférieur à 260 acides aminés, mais l'anticorps reconnaît un épitope (entre 260 et 280 acides aminés) dans une région qui n'est plus synthétisée.

Figure 5

5A.



5B.

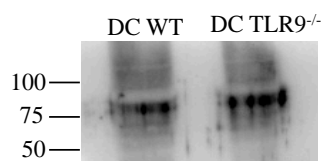


Figure 5 Etude du clivage du TLR9 dans des BMDCs (5A et 5B) Western Blot avec un anticorps anti-TLR9 sur (**5A**) un extrait de phagosomes purifiés de BMDCs de souris C57BL/6, stimulés avec du CpG et de l'ADN de *L. major* pendant les temps indiqués ou (**5B**) sur un extrait total de BMDCs de souris C57BL/6 ou TLR9^{-/-}.

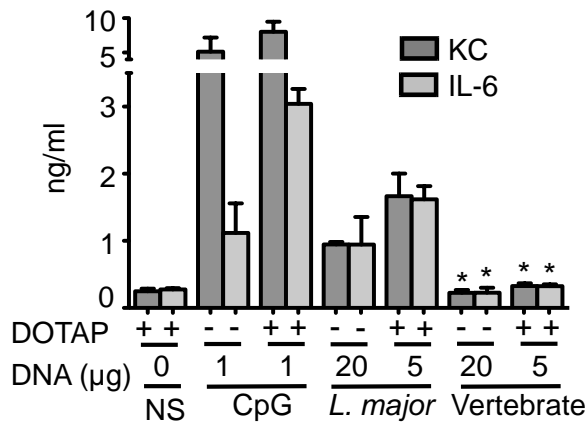
Nous avons alors choisi d'utiliser un système de surexpression de la protéine TLR9, dans des fibroblastes embryonnaires de souris. A la base, ces cellules n'expriment pas le TLR9 et ne répondent pas au CpG. Après transfection avec des plasmides codant pour TLR9-HA (hémagglutinine) et UNC93B1, les fibroblastes sont activées et sécrètent du KC et de l'IL-6, seulement en réponse au CpG ou à l'ADN de *L. major* mais pas en réponse à l'ADN de vertébré (**Figure 6A**). Les fibroblastes transfectés peuvent donc être activées par le CpG et l'ADN de *L. major* via le TLR9. Comme dans les BMDCs, cette réponse est spécifique au parasite et absente avec l'ADN de vertébré, même en présence de DOTAP. De plus, les

fibroblastes ne répondent plus au CpG et à l'ADN en absence de UNC93B1, suggérant que le TLR9 doit aussi être transféré aux endosomes, pour y être activé.

Après avoir validé ce modèle de fibroblastes pour étudier l'activation via TLR9, nous avons aussi regardé la maturation du TLR9 et son clivage par immunoprécipitation. En absence de UNC93B1, le TLR9 n'est pas clivé (**Figure 6B**). Cependant, on observe un TLR9 déjà clivé en absence de toute stimulation et l'addition de CpG, de l'ADN de *L. major* ou de l'ADN de vertébré n'amplifie pas le clivage.

Figure 6

6A.



6B.

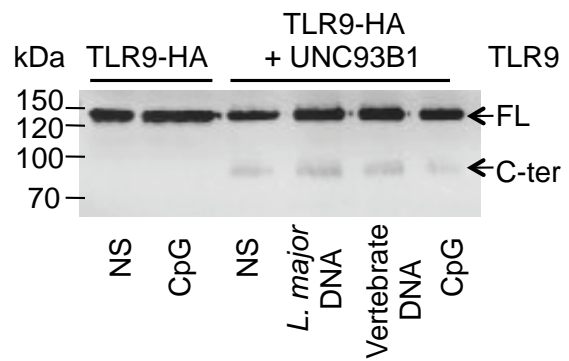


Figure 6 Etude de l'activation et du clivage du TLR9 dans des fibroblastes surexprimant le TLR9. (6A) Réponse cytokine (KC et IL-6) de fibroblastes transfectés avec du TLR9-HA, stimulés par du CpG ou de l'ADN, en présence ou en absence de DOTAP. (n=3) **(6B)** Immunoprécipitation avec un anticorps anti-HA sur un extrait total de fibroblastes transfectés avec du TLR9-HA et/ ou de UNC93B1, non stimulés ou activés par du CpG ou de l'ADN, et révélation par Western Blot du TLR9 entier (FL) ou clivé (C-ter).

CONCLUSIONS DE LA 1^E PARTIE

Nous avons observé que l'activation spécifique des DCs par l'ADN de *L. major* et d'autres *Trypanosomatidae*, absente en cas de stimulation par l'ADN de vertébré, n'est due ni à la différence de taille de leur génome ni à une différence de pénétration dans la cellule. Par ailleurs, nous n'observons pas de différence dans l'acidification du pH endosomal ni de clivage du TLR9 après stimulation par l'ADN de parasite et par l'ADN de vertébré. Ceci semble suggérer que le TLR9 clivé déjà présent dans les cellules avant même toute stimulation pourrait être suffisant pour permettre une réponse différente à l'ADN de parasite et l'ADN de vertébré.

Nous avons démontré par la suite que l'activation du TLR9 est favorisée en présence de cofacteurs comme LL37, SLPI ou HMGB1, conduisant à une augmentation de la réponse des DCs lorsque le cofacteur est complexé à l'ADN de parasite. En revanche, aucun changement n'a lieu en présence de l'ADN de vertébré. Après stimulation avec les deux types d'ADN, nous avons constaté que lors de l'activation des BMDCS, HMGB1 est transloqué du noyau vers le cytoplasme de manière similaire après stimulation avec l'ADN de parasite ou celui de vertébré. Cependant, alors que HMGB1 peut interagir avec les deux types d'ADN, elle présente une plus grande fixation sur l'ADN de parasite, qui pourrait être due à une plus grande affinité. Des résultats préliminaires montrent que HMGB1 interagit aussi de manière préférentielle avec les ADN de *Trypanosoma cruzi* et *Trypanosoma vivax*, comparé à l'ADN de vertébré. L'interaction préférentielle de l'ADN de *Trypanosomatidae* avec HMGB1 suggère la présence de structures particulières sur l'ADN des parasites. En effet, HMGB1 est connu pour interagir préférentiellement avec de l'ADN courbé, l'ADN du kinétoplaste des *Trypanosomatidae* en étant un exemple.

De par leur richesse en polyG, nous avons observé que les ADN de *Trypanosomatidae* sont plus résistants aux DNases, ce qui pourrait leur conférer une durée de vie plus longue. Enfin l'analyse des séquences nous a permis de montrer qu'il y a eu une contre-sélection des motifs activateurs du TLR9 au profit des motifs inhibiteurs dans les génomes de vertébrés, expliquant en partie l'absence d'activation par ces ADN. De plus, l'expression de cytokines pro-inflammatoires via le TLR9, induite par les ADN de parasites, peut être inhibée par l'ADN de vertébré, suggérant une compétition directe entre des motifs ou indirecte par l'intermédiaire d'un cofacteur. Nos résultats nous permettent d'avancer que la charpente désoxyribose n'est pas suffisante pour l'activation du TLR9 et qu'elle est en partie

dépendante de la séquence de l'ADN des *Trypanosomatidae*. Des interactions préférentielles entre ADN de *Trypanosomatidae* et cofacteurs peuvent elles aussi favoriser l'activation du TLR9.

PARTIE 2

IMPLICATION DE L'ASPARAGINE ENDOPEPTIDASE ET DES CATHEPSINES DANS L'INFECTION PAR LE *LEISHMANIA MAJOR*

PRESENTATION

La maturation du récepteur TLR9 requiert un clivage protéolytique qui a lieu dans les endolysosomes. Différentes cystéines protéases lysosomales (dont CatB, S, L) ont été impliquées dans le clivage du TLR9. Bien qu'aucune d'entre elles seule ne soit responsable de la maturation du TLR9, l'inhibition simultanée de plusieurs d'entre elles peut empêcher cette maturation. Une autre cystéine protéase spécifique des résidus asparagines Asn, l'Asparagine Endopeptidase (AEP), est responsable du clivage du TLR9 principalement dans les DCs et contrôle la maturation des cathepsines L et B. Nous nous sommes donc interrogés sur le rôle de toutes ces protéases de fonction redondante. L'existence de formes intermédiaires de maturation pour le TLR9 suggère que son clivage a lieu en plusieurs étapes.

L'AEP est essentiel pour le clivage du TLR9 dans les endosomes/lysosomes dans les cellules dendritiques. En revanche, dans les macrophages, la maturation du TLR9 ne semble pas reposer sur l'AEP. Ceci pourrait être dû au fait que le pH est beaucoup plus acide dans les macrophages que dans les DCs (respectivement de 5.5 et 6.5) et confirme que la maturation du TLR9 ne peut être dépendante d'une seule protéase.

L'observation que différentes protéases peuvent avoir un rôle prépondérant dans le clivage du TLR9, selon s'il s'agit de cellules dendritiques ou de macrophages, nous a conduit à étudier le rôle de ces protéases, pour pouvoir discriminer entre le rôle des macrophages et des DCs dans la réponse immune à l'infection par le *L. major*, via la signalisation par le TLR9.

MATERIEL ET METHODES

Souris et parasites

Des souris femelles, déficientes pour l'asparagine endopeptidase (AEP), la cathepsine B (CatB^{-/-}), la cathepsine S (CatS^{-/-}) et la cathepsine L (CatL^{-/-}), ont été obtenues auprès de Mme Manoury, INSERM, Hôpital Necker. Des parasites promastigotes *Leishmania major*, souche LV39, ont été obtenus à partir de parasites amastigotes, isolés des lésions cutanées sur des souris Nude, et mis en culture dans du milieu M199 supplémenté avec 10% de SVF (sérum de veau fœtal). Les parasites ont été récupérés en phase stationnaire pour les inoculations.

Inoculation de parasites *Leishmania major*, suivi des lésions et charge parasitaire

Pour l'infection par le parasite *L. major*, les souris ont été injectées par voie sous-cutanée avec $3 \cdot 10^6$ de parasites récupérés en phase stationnaire. Le suivi des lésions a été réalisé toutes les semaines en mesurant la taille des coussinets plantaires avec un mesureur Kroeplin. La charge parasitaire au niveau des ganglions poplités a été déterminée chaque semaine au cours de l'infection avec la technique des dilutions limites.

Broyage des coussinets plantaires

Les coussinets ont été prélevés, coupés en morceaux et laissés reposer 1h à 4°C dans 200-400µl de tampon de broyage (EDTA 5mM, NaCl 150mM, Tris pH 7.4 50mM, Triton X-100 1% et un cocktail d'inhibiteurs de protéases Roche). Puis les extraits ont été broyés 30 secondes à l'Ultrarax, centrifugés pendant 15min à 10 000 rpm, 4°C, et les surnageants récupérés.

Analyse des populations cellulaires au niveau des ganglions poplités

Chaque semaine au cours de l'infection, les ganglions poplités des souris ont été prélevés, broyés mécaniquement avec un potter et les globules rouges ont été lysés (avec du RBC lysis buffer de Sigma-Aldrich). Les cellules ainsi obtenues ont été analysées par cytométrie en flux avec les anticorps de BD Pharmingen anti-CD11c-APC (HL3), anti-CD11b-PE (M1/70), anti-CD3-FITC ou -APC (145-2CII), anti-CD8a PE (53-6.7), anti-CD4-PerCP (RM4-5), anti-CD19-APC (ID3), anti-CD45R/B220-FITC (RA3-6B2) et anti-CD49b-APC (Dx5).

Analyse de l'expression de cytokines

Après une extraction ARN au trizol à partir de cellules de ganglions ou de coussinets plantaires, les traces d'ADN génomique ont été éliminées avec de la DNase. Les cDNA ont été obtenus par rétro-transcription avec la Superscript II (200U) (Invitrogen) selon le protocole du fabricant. La PCR a été réalisée sur Step One Plus (Applied Biosystems) avec la Taq polymérase (Taq-Man Universal Master Mix, Applied Biosystems), 20ng de cDNA, les amorces forward/reverse et la sonde marquée FAM associées à chaque cytokine étudiée. L'expression d'ARNm a été normalisée au gène de la HPRT (hypoxanthine phospho-ribosyl-transférase). La production d'IL-1 β dans les surnageants d'extraits issus du broyage de pattes a été mesurée par ELISA (R&D Systems, DY401).

RESULTATS

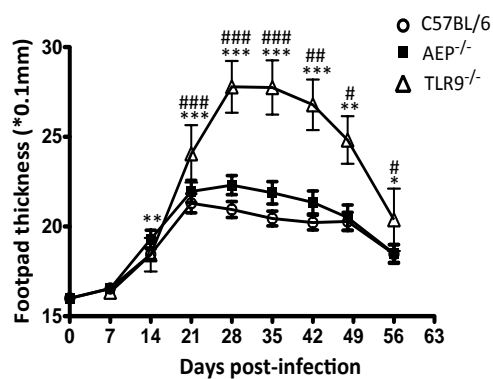
I- Suivi de l'infection des souris AEP^{-/-}, TLR9^{-/-} et C57BL/6 par le *Leishmania major*

Nous avons entrepris de suivre la pathologie due à l'infection par *L. major* dans les souris AEP^{-/-}. L'AEP étant l'enzyme impliqué dans la maturation du TLR9 dans les cellules dendritiques, nous avons comparé leur pathologie avec celle des souris TLR9^{-/-}. Alors que les souris TLR9^{-/-} font des lésions significativement plus grandes que dans les souris C57BL/6, de façon inattendue les souris AEP^{-/-} ont une pathologie semblable à celle des souris sauvages (**Figure 1A**). Il en est de même pour les charges parasitaires mesurées tous les 7 jours et qui sont significativement différentes entre les souris C57BL/6 et TLR9^{-/-} et entre les souris AEP^{-/-} et TLR9^{-/-}, mais pas entre les souris C57BL/6 et AEP^{-/-} (**Figure 1B**). De plus, *in vitro*, alors que les BMDCs de souris TLR9^{-/-} ne répondent pas à une stimulation CpG ou ADN de *L. major*, ceux des souris AEP^{-/-} répondent faiblement (résultats non présentés).

Ces résultats pouvaient signifier soit que les cellules dendritiques n'ont pas un rôle essentiel dans la réponse immune innée à *L. major*, soit qu'il existe une redondance au niveau enzymatique avec d'autres protéases telles que les cathepsines, qui assureraient le clivage et la maturation du TLR9 dans d'autres populations cellulaires. Nous avons donc entrepris de tester le rôle d'autres cathepsines actives à pH acide pouvant intervenir préférentiellement au niveau des macrophages.

Figure 1

1A.



1B.

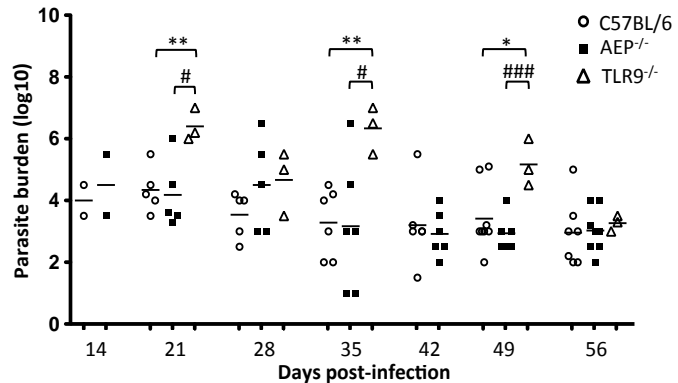


Figure 1 Evolution des lésions et de la charge parasitaire dans les souris AEP^{-/-} et TLR9^{-/-} infectées par le parasite *Leishmania major*

3.10⁶ parasites ont été injectés dans les coussinets plantaires des souris AEP^{-/-} et TLR9^{-/-}, puis (1A) les tailles des lésions et (1B) les charges parasitaires dans les ganglions poplités ont été relevées tous les 7 jours. Les inoculations ont été faites au jour 0 sur environ 18 souris et répétées 4 fois. Tous les 7 jours, 2 à 3 souris ont été sacrifiées. Les tests statistiques ont été réalisés par un *t* test non païré (***) ou ### : $p < 0.0001$; ** ou ## : $p < 0.001$; * ou # : $p < 0.005$; * pour la comparaison entre les TLR9^{-/-} et les C57BL/6 et # pour la comparaison entre les souris TLR9^{-/-} et les souris AEP^{-/-}).

II- Suivi de l'infection des souris déficientes pour la cathepsine L ou S par le *Leishmania major*.

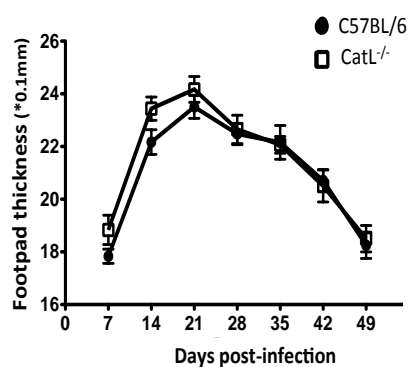
Les souris déficientes pour la cathepsine L ont un défaut de la présentation antigénique par le CMH de classe II, ceci étant dû à une maturation incomplète de la chaîne invariante Ii en la molécule CLIP. La cathepsine S est exprimée dans les cellules présentatrices d'antigènes et est sans doute la protéase la plus importante impliquée dans la présentation antigénique par le CMH de classe II.

In vitro, dans des cellules dendritiques (BMDCs) ou des macrophages (BMDMs) différenciés des cellules de la moelle des souris CatL^{-/-}, puis activés par le parasite *L. major*, son ADN ou le CpG, ligand du TLR9, nous n'avons pas trouvé de différence d'expression des cytokines pro-inflammatoires, par rapport aux cellules provenant de souris contrôles (non présentées dans ce mémoire). En revanche, les BMDCs de souris CatS^{-/-} répondent un peu mieux aux stimulations par le parasite, l'ADN et le CpG. Ces résultats ne vont pas dans le même sens que ceux de l'équipe de Ploegh (Park et al, Nature, 2008), qui a montré que les BMDCs provenant de souris CatL et CatS répondent moins bien au CpG.

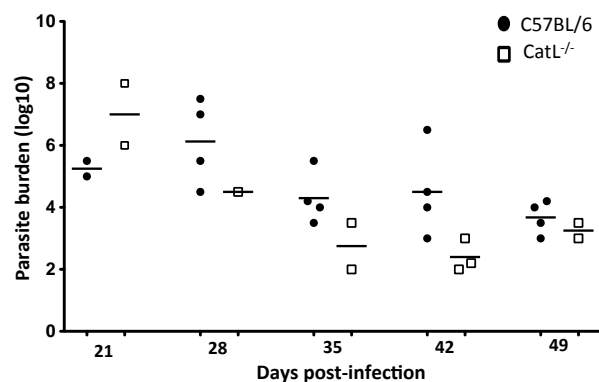
La pathologie dans les souris $CatL^{-/-}$ se déroule comme dans les souris contrôles, aussi bien pour la taille des lésions que pour la charge parasitaire (**Figures 2A et 2B**). Les souris $CatS^{-/-}$ sont un peu plus sensibles à l'infection, en considérant les lésions mais pas les charges parasitaires (**Figures 2C et 2D**). Bien que $CatL$ et $CatS$ aient été proposées comme étant modulées dans la signalisation via le TLR9 et pour $CatS$ comme étant impliquée dans la présentation antigénique, aucune différence significative n'a été observée dans la réponse à l'infection par *L. major* par rapport aux souris contrôles.

Figure 2

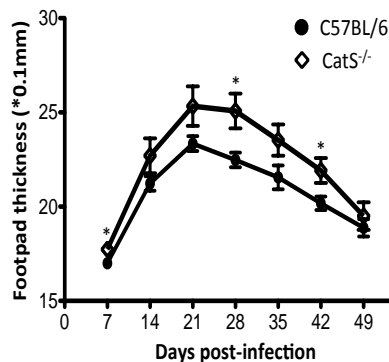
2A.



2B.



2C.



2D.

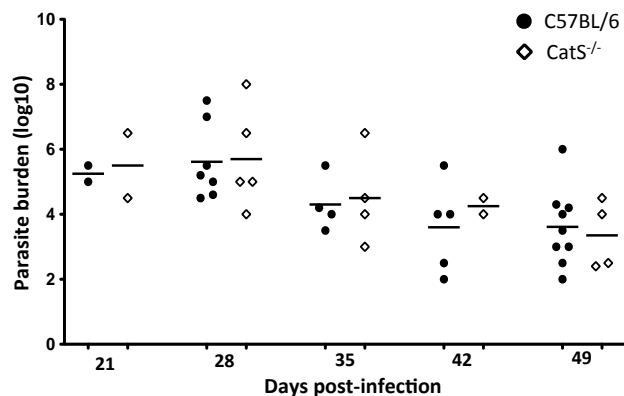


Figure 2 Evolution des lésions et de la charge parasitaire dans les souris $CatL^{-/-}$ et $CatS^{-/-}$ infectées par le parasite *Leishmania major*

$3 \cdot 10^6$ parasites ont été injectés dans les coussinets plantaires des souris $CatL^{-/-}$ et $CatS^{-/-}$, puis (**2A et 2C**) les tailles des lésions et (**2B et 2D**) les charges parasitaires dans les ganglions poplités ont été relevées tous les 7 jours. Les inoculations ont été faites au jour 0 et répétées 3 fois. Tous les 7 jours, 2 à 3 souris ont été sacrifiées. Les tests statistiques ont été réalisés par un *t* test non pairé (*: $p < 0.005$).

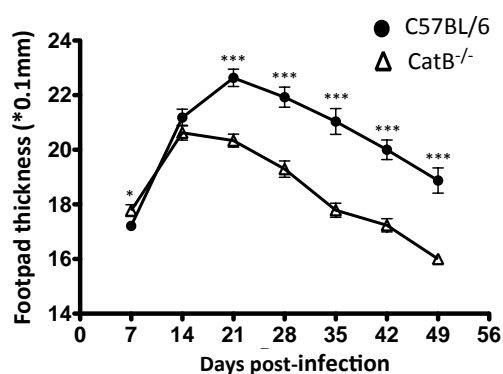
III- Suivi de l'infection des souris déficientes pour la Cathepsine B par le *Leishmania major*

Contrairement aux cathepsines L et S, la cathepsine B intervient peu dans la présentation antigénique par le CMH de classe II. Elle est exprimée de façon ubiquitaire, notamment dans les cellules dendritiques et les macrophages, et joue un rôle dans l'apoptose et dans l'inflammation. Il a été décrit qu'elle pourrait être impliquée dans la maturation post-traductionnelle du TGF β et dans la mise en place d'une réponse de type Th2 (Gantt et al, 2003 ; Pratt et al, 2009).

De façon surprenante, la pathologie des souris CatB^{-/-} est significativement différente des souris C57BL/6 et les souris CatB^{-/-} sont plus résistantes à l'infection. En effet, entre le jour 14 et 21, la taille des lésions régresse dans les souris CatB^{-/-} alors qu'elle continue d'augmenter dans les souris C57BL/6 (**Figure 3A**). De plus, aux jours 7, 14 et 21, elles ont une charge parasitaire qui n'est pas significativement différente de celle des C57BL/6 (**Figure 3B**). Cependant, dès le jour 21, on observe que la charge parasitaire diminue chez les souris CatB^{-/-}, alors qu'elle continue d'augmenter aux jours 21 et 28 dans les souris C57BL/6. Ces résultats nous permettent de constater que les souris CatB^{-/-} sont plus résistantes à l'infection par *L. major*.

Figure 3

3A.



3B.

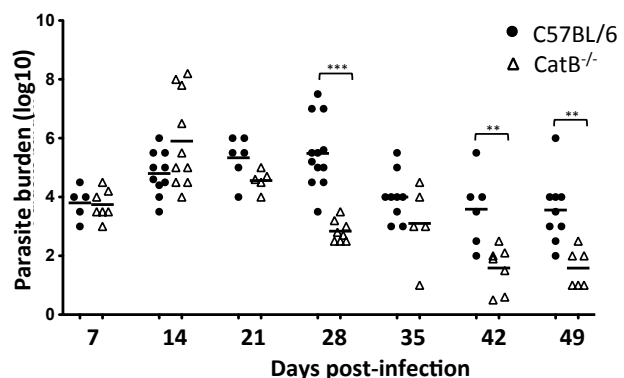


Figure 3 Evolution des lésions et de la charge parasitaire dans les souris CatB^{-/-} par le parasite *Leishmania major*

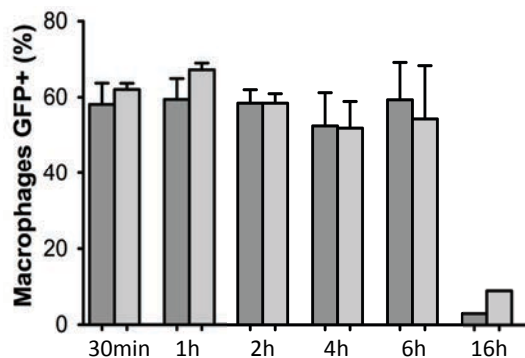
3.10⁶ parasites ont été injectés dans les coussinets plantaires des souris CatB^{-/-}, puis (**3A**) les tailles des lésions et (**3B**) les charges parasitaires dans les ganglions poplités ont été relevées tous les 7 jours. Les inoculations ont été faites au jour 0 et répétées 4 fois. Tous les 7 jours, 2 à 3 souris ont été sacrifiées. Les tests statistiques ont été réalisés par un *t* test non apparié (*** : p < 0.0001 ; ** : p < 0.001 ; * : p < 0.005).

De plus, *in vitro*, nous avons aussi constaté que les BMDCs provenant de souris CatB^{-/-} répondent moins bien au CpG et à l'ADN en produisant moins d'IL-6 et de TNF α , en accord avec les observations de Matsumoto (Matsumoto, BBRC, 2008).

La réponse plus faible de ces cellules aurait pu refléter une internalisation différente du parasite. Nous avons étudié l'internalisation et suivi des parasites *L. major* GFP dans les cellules dendritiques et les macrophages dérivées de la moelle de souris CatB^{-/-} et de souris C57BL/6. Nous n'avons cependant observé aucune différence dans la proportion des cellules contenant le parasite GFP, ni dans les BMDCs ni dans les BMDMs (**Figures 4A et 4B**). En revanche, des résultats préliminaires semblent indiquer que les parasites meurent plus vite dans les macrophages des souris C57BL/6 que dans ceux des CatB^{-/-}, ce qui n'est pas observé dans les cellules dendritiques (résultats préliminaires non présentés).

Figure 4

4A.



4B.

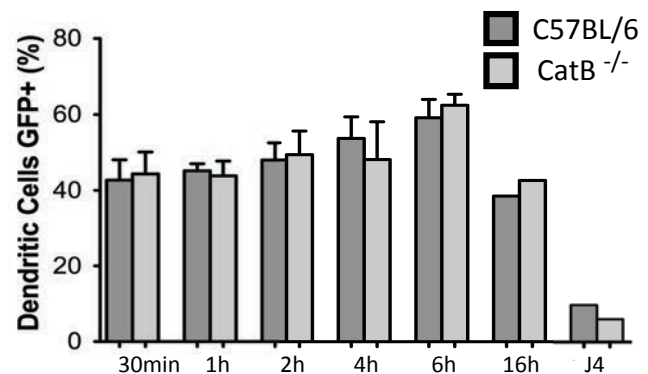


Figure 4 Etude de la pénétration des parasites *L. major*-GFP

Des macrophages et des cellules dendritiques (DCs) ont été incubés avec des parasites *L. major*-GFP (MOI 5/1) pendant les temps indiqués. La proportion de cellules (4A) CD11b⁺GFP⁺ ou (4B) CD11c⁺GFP⁺ a été déterminée par cytométrie en flux. Pour éliminer les parasites présents à la surface, un traitement des cellules à la trypsine a été préalablement effectué.

IV- Recrutement cellulaire dans les ganglions après infection

Nous avons suivi le recrutement cellulaire dans les ganglions drainants des souris infectées.

Dans les souris non infectées de souris CatB^{-/-} et C57BL/6, on trouve un nombre similaire de cellules dans leurs ganglions poplités naïfs. Au cours de l'infection, dans les souris CatB^{-/-}, le

nombre de cellules augmente entre les jours 7 et 21, avant de diminuer à partir du jour 28, tout en restant significativement moins élevé que dans les souris C57BL/6 (**Figure 5A**). Dans ces dernières en revanche, le recrutement augmente au jour 14 puis il reste élevé.

Nous avons de plus constaté dans les souris CatB^{-/-} une diminution des cellules B et une augmentation des cellules T entre les jours 21 et 28 (**Figure 5B**). En revanche, on observe un phénomène inverse chez les souris contrôles avec une augmentation des cellules B et une diminution des cellules T. Au niveau des sous-population de T, les cellules CD4⁺ et CD8⁺ augmentent tout au long de l'infection chez les souris CatB^{-/-}, alors que ces deux populations restent relativement stables chez les souris C57BL/6 (**Figure 5C**). En particulier, la proportion des cellules T CD4⁺ est significativement plus élevée dans les souris CatB^{-/-} que dans les souris C57BL/6 à partir du jour 28.

Concernant les cellules NK (CD49b(Dx5)⁺ CD3⁻) et NKT (CD49b(CD45)⁺ CD3⁺), on n'observe pas de différence entre les deux lignées, et leur proportion diminue de manière similaire au cours de l'infection pour les souris CatB^{-/-} et les souris C57BL/6 (**Figure 6A**). Pour les cellules CD11c⁺CD11b⁺ et CD11c⁻CD11b⁺, on peut observer une légère augmentation de ces populations dans les souris CatB^{-/-} (**Figure 6B**).

V- Etude de l'expression de cytokines dans les ganglions drainants

Nous avons étudié l'expression par PCR des cytokines IL-4 et IFN γ dans les ganglions drainants au cours de l'infection. Au jour 14 de l'infection, on observe dans les 2 lignées une augmentation de l'expression d'IFN γ , mais elle semble plus faible dans les souris CatB^{-/-} que dans les souris C57BL/6 (**Figure 7A**). De plus, dans les souris CatB^{-/-}, l'expression d'IFN γ diminue à partir du jour 21 lorsque la pathologie régresse, alors que chez les souris contrôles on n'observe pas de diminution nette de son expression. En revanche, pour l'IL-4, on observe un profil d'expression similaire pour les souris CatB^{-/-} et les souris C57BL/6, avec une expression augmentée au jour 7, puis diminuée dès le jour 14 (**Figure 7A**).

Sur un nombre restreint de souris, nous avons ainsi noté une forte expression d'IL-6 au jour 7 par les CatB^{-/-}, ainsi que de TNF α . Pour les souris contrôles, l'expression d'IL-6 augmente au jour 21 mais pas celle de TNF α (**Figure 7B**). Ces résultats restent extrêmement préliminaires. De plus, on trouve un peu plus d'iNOS dans les souris C57BL/6 mais une augmentation dans

les 2 lignées au jour 21 (**Figure 7C**). Pour l'IL-10, aucune différence n'est visible si ce n'est au jour 7 (**Figure 7C**).

Nous avons bien établi que la réponse en IFN γ reste inférieure et diminue très vite au cours du temps chez les CatB^{-/-} par rapport aux souris C57BL/6 (**Figure 7A et 7C**). Quant à l'IL-4, nous n'avons pas constaté d'expression différente. De manière surprenante, nous avons observé une augmentation significative des cellules T et peu d'IFN γ . Ces résultats suggèrent un contrôle très strict de la réaction d'inflammation. Nous envisageons de regarder si parmi les cellules T CD4⁺, nous avons des cellules T régulatrices.

Figure 5

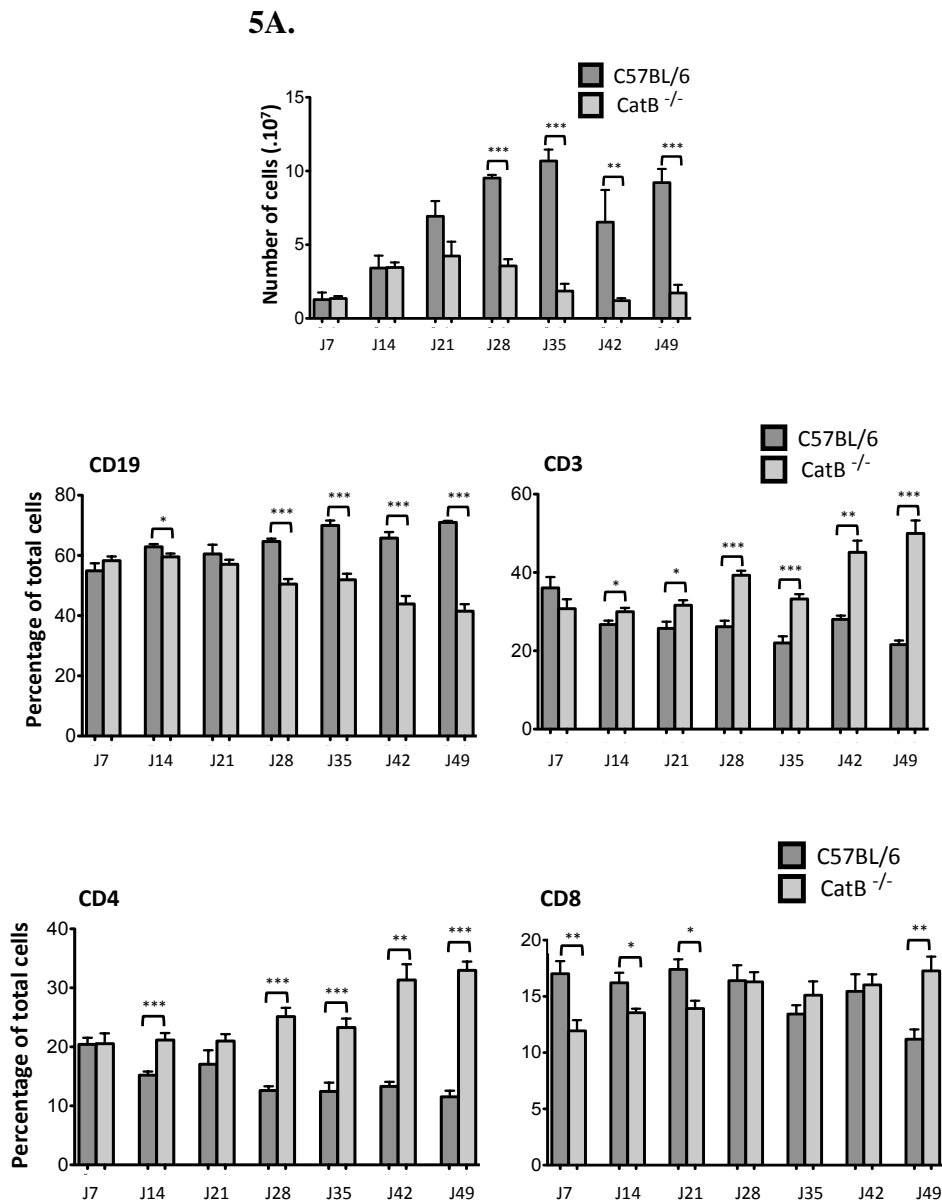
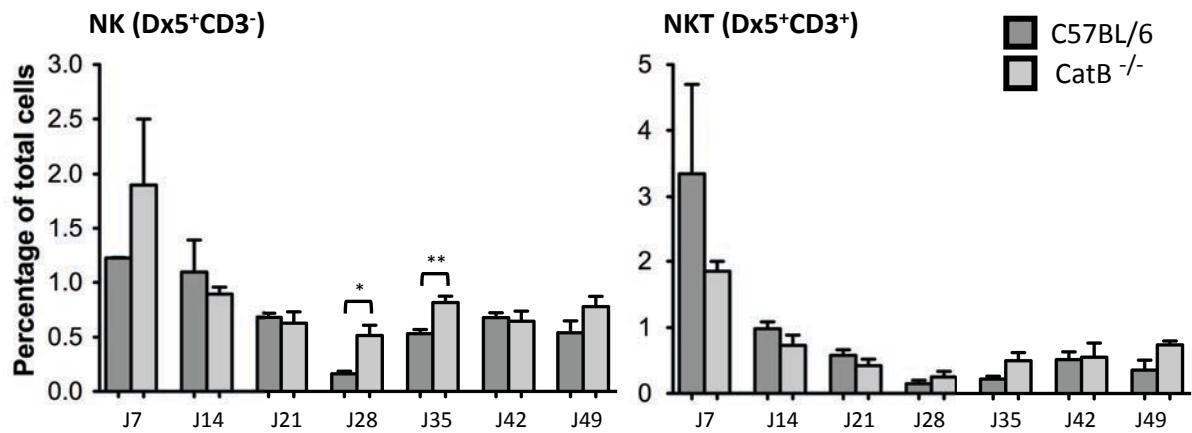


Figure 5 Recrutement des lymphocytes T et B dans les ganglions poplités des souris CatB^{-/-} après infection par *Leishmania major*

Le nombre total de cellules (**5A**) et les proportions de cellules B marquées par CD19 (**5B**) et des cellules T marquées par CD3 (**5B**), CD4 ou CD8 (**5C**) ont été étudiées par cytométrie en flux tous les 7 jours dans les souris C57BL/6 et CatB^{-/-}. Les tests statistiques ont été réalisés par un *t* test non pairé (***: $p < 0.0001$; **: $p < 0.001$; * : $p < 0.005$).

Figure 6

6A.



6B.

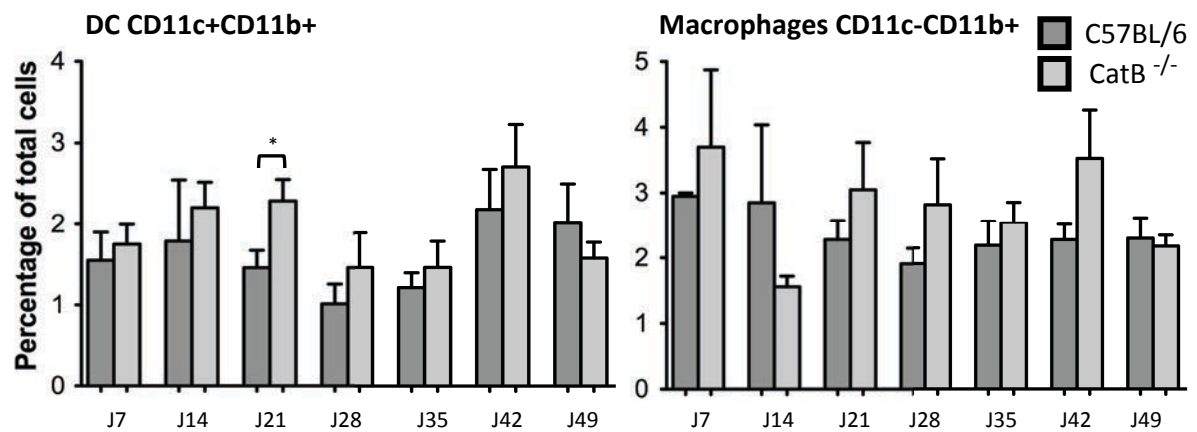
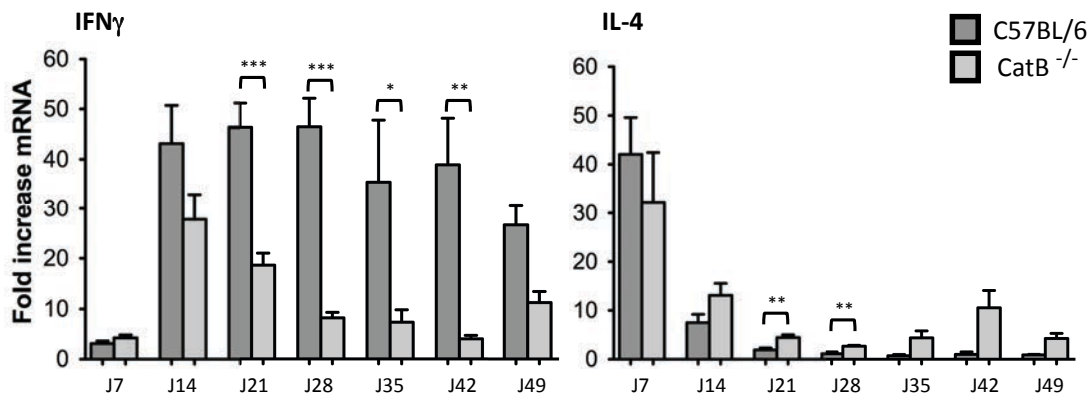


Figure 6 Recrutement des cellules NK, NKT, DCs et macrophages dans les ganglions

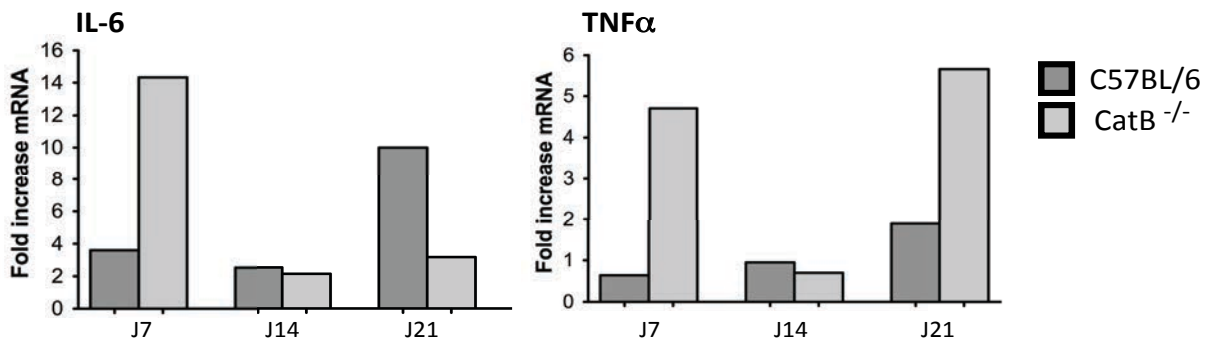
La proportion des différents types cellulaires a été étudiée par cytométrie en flux et comparée tous les 7 jours entre les souris C57BL/6 et CatB^{-/-}, après infection par *L. major*.

Figure 7

7A.



7B.



7C.

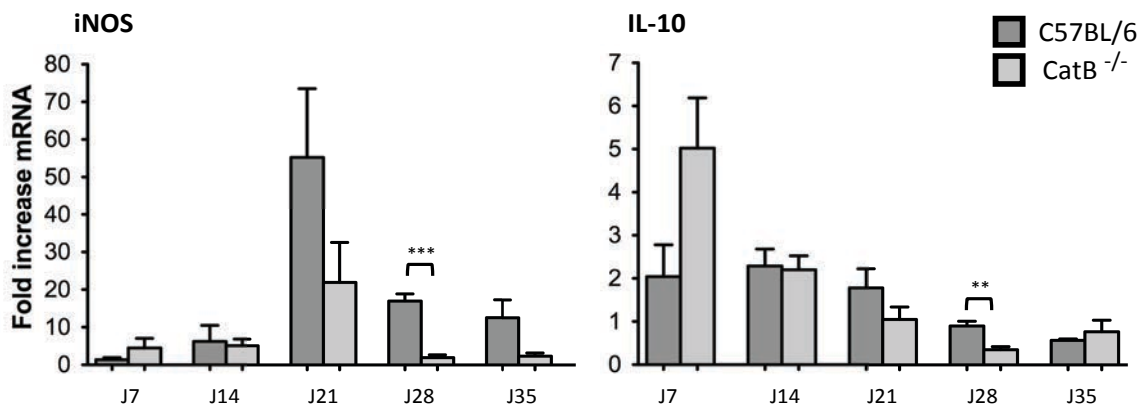


Figure 7 Evolution de l'expression des cytokines dans les souris CatB^{-/-} et C57BL/6 au cours de l'infection par *Leishmania major* dans les ganglions

L'expression de différentes cytokines a été mesurée par PCR à partir d'ARNm extraits de ganglions poplités des souris C57BL/6 ou CatB^{-/-}, prélevés tous les 7 jours après infection par *L. major*. La mesure de l'expression des cytokines est relative à celle trouvée dans les ganglions de souris non infectées, le niveau d'ARNm étant normalisé par rapport à l'expression du gène HPRT. Les tests statistiques ont été réalisés par un *t* test non païré (***: p < 0.0001 ; **: p < 0.001 ; *: p < 0.005).

VI- Suivi de la charge parasitaire et de la production de la cytokine IL-1 β dans les coussinets plantaires des souris C57BL/6 et CatB^{-/-} après infection

Nous avons analysé la charge et l'expression de cytokines dans le lieu d'injection, les coussinets plantaires, et avons observé que la charge parasitaire diminue dès le jour 21, plus vite dans les souris CatB^{-/-} que dans les souris C57BL/6 (**Figure 8**).

Nous avons étudié l'expression de différentes cytokines dans les coussinets plantaires. En considérant l'expression d'IL-1 β , car il a été proposé que sa maturation fasse intervenir la cathepsine B, nous avons observé, une expression très faible d'IL-1 β au jour 7 post-infection mais similaire aux jours 14 et 21, dans les deux lignées (**Figure 9A**). Aux jours 28 et 35, elle a en revanche beaucoup diminué dans les souris CatB^{-/-}. Par ailleurs, des résultats préliminaires obtenus par PCR suggèrent qu'au jour 14, l'expression des cytokines IL-6, IFN γ et IL-10 est supérieure à celle des souris contrôles et qu'il y ait un peu plus d'iNOS dans les pattes des souris CatB^{-/-} que dans celles des souris contrôles (**Figure 9B**).

Figure 8

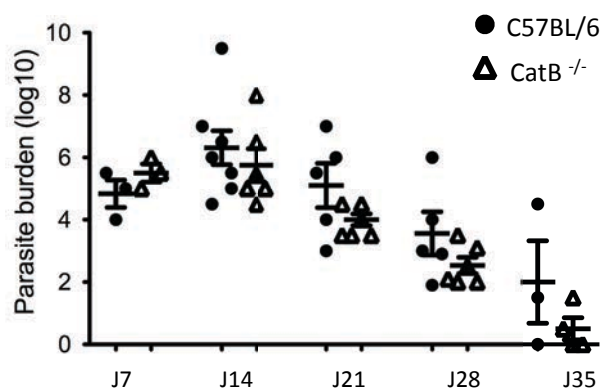


Figure 8 Evolution de la charge parasitaire dans les pattes de souris CatB^{-/-} et C57BL/6
Les souris ont été infectées par une injection sous-cutanée de 3.10^6 parasites dans les coussinets plantaires, puis les charges parasitaires dans les pattes ont été déterminées tous les 7 jours par dilution limite.

Figure 9

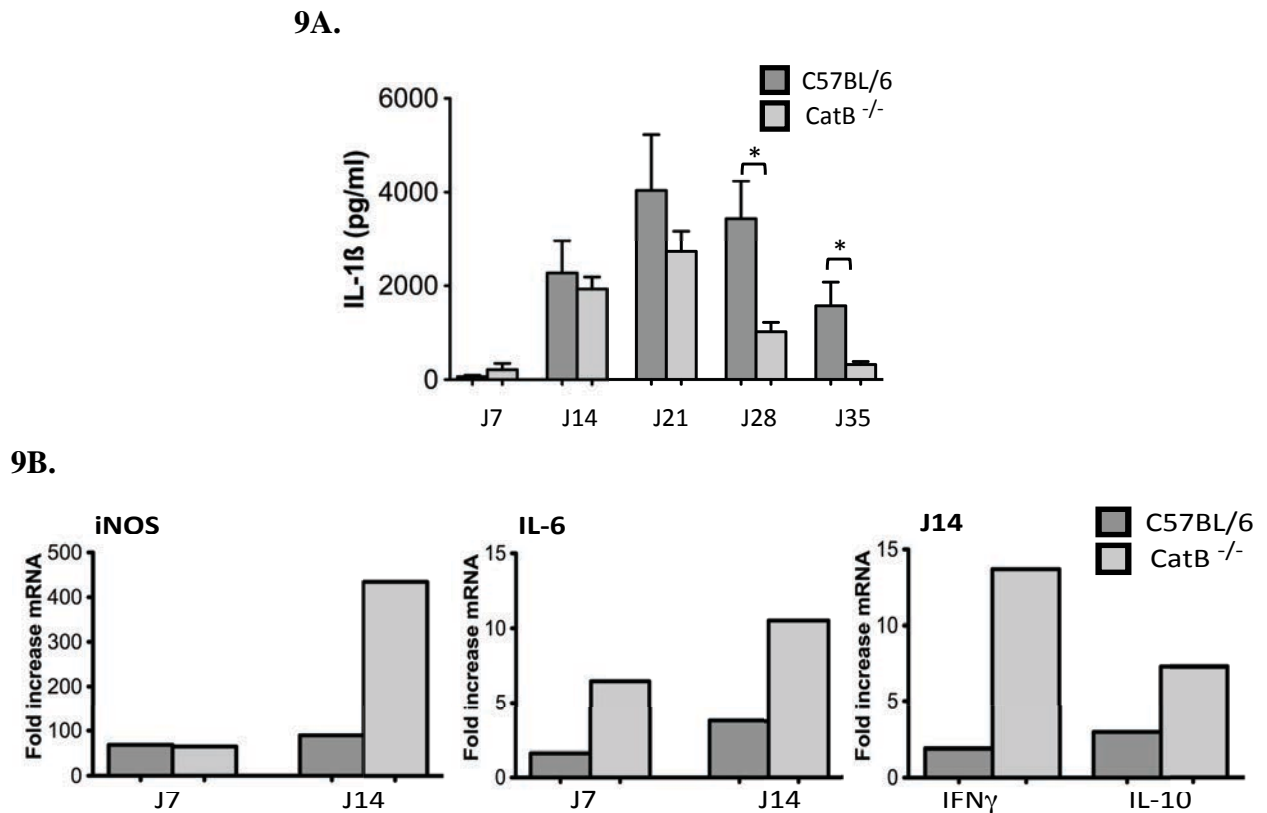


Figure 9 Evolution de la réponse cytokine dans les coussinets plantaires de souris *CatB*^{-/-} et *C57BL/6* infectées par *L. major*

La production d'IL-1 β a été mesurée par (9A) ELISA dans des broyats de coussinets plantaires. L'expression de différentes cytokines a été mesurée par (9B) PCR avec des ARNm extraits de coussinets plantaires, prélevés tous les 7 jours après infection par *L. major*. La mesure de l'expression des cytokines est relative à celle trouvée dans les coussinets plantaires de souris non infectées, le niveau d'ARNm étant normalisé par rapport à l'expression du gène HPRT. Les tests statistiques ont été réalisés par un *t* test non païré (*: $p < 0.005$).

CONCLUSIONS DE LA 2^E PARTIE

Aucune des souris déficientes pour les protéases étudiées (l'asparagine endopeptidase, les cathepsines S, L ou B (AEP^{-/-}, CatS^{-/-}, CatL^{-/-} et CatB^{-/-}) ne se comporte comme les souris TLR9^{-/-} vis à vis de l'infection par *L. major*, bien que ces protéases aient été considérées comme intervenant dans le clivage du TLR9, clivage qui semblait nécessiter plusieurs étapes. Dans les BMDCs AEP^{-/-}, qui répondent moins bien à une stimulation CpG, il a été observé que les activités CatL/CatB étaient augmentées (Sepulveda et al, 2009).

Bien que l'AEP soit la protéase principale pour le clivage du TLR9 dans les cellules dendritiques, les CatL et CatB pourraient avoir un rôle plus important dans les macrophages et cliver le TLR9, compensant ainsi l'absence d'AEP dans les macrophages. En effet, les macrophages ont des endosomes/lysosomes au pH plus acide que les cellules dendritiques et le pH optimal pour l'activité des cathepsines est aussi plus acide que celui de l'AEP.

Cependant, il n'en est rien, car la pathologie des souris CatL^{-/-} est aussi identique à celle des souris C57BL/6 après l'infection par le *L. major*, ce qui confirme l'absence d'un rôle de la CatL dans la maturation du TLR9 dans les macrophages et aussi dans la présentation antigénique via le CMH de classe II pour le *Leishmania major*.

La résistance des souris CatB^{-/-} dans l'infection par *L. major* est tout aussi surprenante. On constate que la réponse immunitaire de ces souris se met en place plus rapidement et que la taille des lésions et la charge parasitaire dans les ganglions atteignent leur maximum environ 7 jours plus tôt dans les souris CatB^{-/-} que dans les souris C57BL/6.

Nous avons étudié la réponse immune dans les souris C57BL/6, CatB^{-/-} ou CatB^{+/+} (contrôles littermate, qui font une réponse identiques aux C57BL/6) dans les ganglions drainants le site d'infection, les ganglions poplités. On a pu observer un recrutement cellulaire 2 à 3 fois moins important dans les souris CatB^{-/-} composé d'un pourcentage plus élevé de cellules T CD4⁺ et un peu moins de cellules B. En revanche, nous n'avons pas mis en évidence de différences au niveau des cellules de la réponse innée (cellules NK, dendritiques et macrophages). Les données sur le recrutement des neutrophiles restent préliminaires. Comme dans toute infection par *L. major* dans des souris sur fond C57BL/6, les souris font une réponse de type Th1, avec une augmentation de l'expression d'IFN γ au jour 14 post-infection.

L'expression d'IFN γ est plus importante chez les souris contrôles que les CatB^{-/-} et diminuent plus vite chez ces dernières. Des résultats préliminaires indiquent une expression plus précoce de TNF α et d'IL-6 mais pas de différence significative pour l'iNOS et l'IL-10 dans les ganglions.

Au niveau des coussinets plantaires, on observe une charge parasitaire maximum au jour 14 de l'infection, qui diminue plus vite dans les CatB^{-/-}, accompagnée d'une expression importante d'IL-1 β qui décroît elle aussi plus vite chez les CatB^{-/-}. L'analyse au niveau du recrutement cellulaire dans les coussinets plantaires n'a pas encore été abordée.

A ce stade, aucun élément de notre étude nous permet de comprendre la résistance des souris CatB^{-/-} à l'infection par *L. major*. En revanche, les résultats montrent que la réponse immune est plus précoce et la réaction inflammatoire mais forte, bien que la charge parasitaire ait atteint le même niveau au cours de la pathologie.

Parallèlement, nous nous sommes penchés sur un autre point qui est celui de l'entrée des parasites dans les cellules et le devenir des parasites. Nous avons observé que l'internalisation de *L. major*-GFP *in vitro* dans les cellules dendritiques ou les macrophages n'est pas différente entre les cellules des lignées CatB^{-/-} et C57BL/6. Cependant, les parasites semblent survivre plus longtemps dans les cellules souris CatB^{-/-} que C57BL/6, allant à l'encontre de l'hypothèse d'une élimination plus rapide des parasites. Ces résultats seront discutés plus loin en tenant compte des résultats connus sur le rôle de la cathepsine B dans l'inflammation.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Malgré les interactions mises en évidence de certains composants du parasite avec le TLR2, TLR3, TLR4 et TLR7, les souris déficientes pour ces TLR et infectées par *Leishmania major* développent une pathologie et une réponse immunitaire semblables à celles de souris contrôles. En comparaison, les souris déficientes pour le TLR9 sont significativement plus sensibles à l'infection.

Nous avons alors constaté *in vitro* que l'ADN de *L. major* purifié mis en contact sur des cellules dendritiques ou des macrophages activaient l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les cellules de souris contrôles mais non de souris déficientes pour le TLR9. Cette activation par *L. major* a été étendue à d'autres ADN de *Trypanosomatidae*. En revanche, aucune activation n'est possible par l'ADN de vertébré.

Notre objectif a alors été de comprendre comment les ADN de *Trypanosomatidae* accédaient au TLR9 et intervenaient dans sa maturation. La majorité des travaux faits sur l'activation et la maturation du TLR9 avaient été réalisés avec des oligonucléotides synthétiques et pas avec de l'ADN purifié.

Les facteurs protéiques impliqués dans l'activation du TLR9

Des travaux récents mettaient en avant l'implication de facteurs protéiques s'associant au TLR9 lui-même ou à son ligand, favorisant ou étant nécessaire à son activation.

Ce fut ainsi le cas de la protéine UNC93B1, considérée comme nécessaire pour le passage du TLR9 du réticulum endoplasmique au compartiment endosomal, ou celui de RAGE, membre de la superfamille des immunoglobulines et récepteur des protéines glyquées (Ivanov et al, 2007; Tian et al, 2007). Ce dernier forme un immuno-complexe HMGB1-ADN-RAGE, et augmente les propriétés activatrices de l'ADN. D'autres facteurs cationiques favorisent l'internalisation de l'ADN comme le facteur LL37, qui permet à l'ADN humain d'être internalisé dans les pDCs et d'être transporté aux endosomes, alors que l'ADN seul n'entre pas dans les pDCs (Lande et al, 2007).

De la même manière, la granuline ou le SLPI ont été décrits comme pouvant faciliter le transport du CpG aux endosomes (Park et al, 2011 ; Skrzeczynska-Moncznik et al, 2013).

Nous avons en effet observé une augmentation de l'activation des cellules dendritiques lorsque l'ADN de *L. major* est en présence des facteurs HMGB1, LL37 et SLPI, par rapport à l'ADN de *L. major* seul. Ces facteurs n'ont aucun effet lorsqu'ils sont seuls ou associés à l'ADN de vertébré.

HMGB1 est une protéine essentiellement nucléaire, pouvant s'associer l'ADN génomique endogène et impliqué dans la régulation de l'expression des gènes. En cas d'inflammation, HMGB1 peut être transloqué dans le cytoplasme et sécrétée dans le milieu extracellulaire, agissant comme une cytokine et influençant la réponse immunitaire (Bianchi & Manfredi, 2007). Nous avons observé qu'après stimulation par l'ADN de *L. major* mais aussi par l'ADN de vertébré, HMGB1 est transloqué dans le cytoplasme. Il existe donc une réponse cellulaire à l'ADN, indépendamment de la nature de l'ADN, qui se traduit par la translocation de HMGB1 du noyau au cytoplasme. HMGB1 est capable de lier aussi bien l'ADN de parasite que l'ADN de vertébré. Mais de manière surprenante, nous avons mis en évidence une quantité ou une fixation plus importante de HMGB1 sur l'ADN de *L. major* que sur l'ADN de vertébré, suggérant que la discrimination de HMGB1 entre ces deux ADN repose sur une différence dans la séquence ou la structure de l'ADN. Nous avons entrepris d'étudier l'interaction de HMGB1 avec d'autres ADN de *Trypanosomatidae*. Des résultats préliminaires montrent que HMGB1 se lierait aussi de manière préférentielle avec les ADN de *Trypanosoma cruzi* et *Trypanosoma brucei*, comparé à l'ADN de vertébré. La question que nous nous posons encore aujourd'hui est celle du lieu où peut se faire cette interaction. Elle pourrait être intracellulaire, notamment dans les lysosomes, HMGB1 ayant été colocalisé avec le marqueur LAMP1, ou dans le milieu extracellulaire. En effet, un traitement à la glycyrrhizine, connu pour interagir avec HMGB1 soluble et l'inhiber, réduit l'activation observée par l'ADN de *L. major*. Ainsi HMGB1 aussi bien endogène qu'extracellulaire peut intervenir dans la réponse des cellules dendritiques à l'ADN de *L. major*, en se liant davantage à ce dernier qu'à l'ADN de vertébré.

L'interaction HMGB1 avec l'ADN de parasite

L'interaction entre HMGB1 et l'ADN pouvait modifier le sort de cet ADN, en augmentant sa durée de vie dans la cellule et en le stabilisant. Une étude de la sensibilité à la DNase de cet ADN a montré que la fixation de HMGB1 augmentait sa sensibilité à la DNase. Il en est de même pour l'ADN de vertébré, lui-même déjà plus sensible à la DNase que l'ADN de parasite

du fait de son contenu moindre en séquences polyG. En effet, la présence de celles-ci aux extrémités d'un oligonucléotide peut lui conférer une meilleure protection à la DNase.

Bien que HMGB1 n'augmente pas la stabilité de l'ADN, il peut favoriser l'accès au TLR9, soit via le complexe RAGE-HMGB1-ADN soit seul en complexe avec l'ADN (HMGB1-ADN). Le rôle de HMGB1 peut aussi être liée à l'internalisation et il serait intéressant de regarder si la présence de HMGB1 augmente l'internalisation cellulaire de ces deux ADN et si possible, de préciser les compartiments accessibles, ce qui est expérimentalement très difficile du fait de la présence d'une grande quantité de HMGB1 dans le noyau.

En forçant la translocation endosomale de l'ADN avec le lipide cationique de la DOTAP, nous observons déjà une augmentation de l'activation par l'ADN de *L. major* et non par l'ADN de vertébré, qu'il soit soniqué ou non. Nous nous sommes alors penchés sur la nature du ligand.

L'interaction différentielle entre l'ADN de parasite et de vertébré avec HMGB1 suggérait un rôle de la structure de l'ADN. HMGB1 présentant une affinité plus grande pour les structures super-enroulées ou particulières d'ADN (Jaouen et al, 2005), la différence d'interaction pourrait être expliquée par des structures particulières retrouvées dans l'ADN des parasites, et non dans l'ADN de vertébré. L'ADN des *Trypanosomatidae* (*L. major*, *T. cruzi*, *T. brucei*) possède en effet une base modifiée, la base J ou gluco-pyranosyl-oxy-methyluracil, que l'on retrouve surtout au niveau des télomères des chromosomes et dont la présence dépend de l'espèce de *Trypanosomatidae* ou du stade de développement du parasite (Borst & Sabatini, 2008). Par exemple, *Trypanosoma brucei* présente des bases J tout au long de son cycle de développement sauf lorsqu'il est sous forme procyclique (dans les insectes-vecteurs). Nous aimerions pouvoir comparer l'impact de ces bases J sur l'interaction de l'ADN de *Trypanosoma brucei* avec HMGB1.

Par ailleurs, les *Trypanosomatidae* ont un ADN kinétoplastidique (analogue à de l'ADN mitochondrial) qui est constitué par un grand nombre de structures super-enroulées en mini-cercles ou maxi-cercles (Jensen & Englund, 2012), qu'il est possible d'isoler par des protocoles particuliers. Nous envisageons de regarder l'implication de ces structures particulières des ADN de *Trypanosomatidae* dans l'interaction avec HMGB1 et dans la stimulation des DCs. Des études préliminaires faites avec des ADN isolés de kinétoplastes montrent qu'ils ont un pouvoir activateur inférieur à celui de l'ADN génomique, laissant croire que l'ADN kinétoplastidique n'est pas l'élément principal d'activation.

L'autre point pouvant expliquer l'interaction différentielle entre les différents ADN et HMGB1 était la séquence de l'ADN, qui nous a conduit à nous intéresser à la nature du ligand du TLR9. Il s'agissait d'une question importante pour nos travaux, puisque nous avons observé qu'au contraire de l'ADN de *Trypanosomatidae*, l'ADN de vertébré n'induisait aucune activation cellulaire.

La nature du ligand du TLR9

La question du ligand du TLR9 s'est posée à plusieurs niveaux. On pensait que la méthylation de l'ADN bloque l'activation du TLR9. C'est pourquoi l'ADN bactérien hypo-méthylé activait le TLR9 alors que l'ADN de vertébré méthylé ne pouvait pas l'activer. En soutien à cet élément, il avait été démontré que l'hyper-méthylation de l'ADN bactérien ou l'ADN de *Trypanosoma cruzi* ou *Trypanosoma brucei* réduisait l'expression de cytokines pro-inflammatoires par les cellules B et les macrophages (Shoda et al, 2001; Bartholomeu et al, 2008). Toutefois, si la quantité d'ADN méthylé était augmentée, il y avait aussi une activation. Une question qui se pose à propos de la méthylation est de savoir si elle empêche l'interaction avec le TLR9 ou si elle bloque l'accès aux endosomes. Une équipe a démontré entre-temps qu'un oligonucléotide activateur méthylé se liait moins bien et se dissociait plus rapidement du domaine C-terminal du TLR9 (Rutz et al, 2004). En revanche, l'hypo-méthylation de l'ADN de vertébré ne le rendait pas activateur du TLR9 (Sun et al, 1997). Pour toutes ces raisons, nous n'avons pas tenu en compte l'état de méthylation des ADN de trypanosomatidae, qui ont un niveau de méthylation moindre que l'ADN de vertébré après digestion par l'enzyme HpaII. Mais il est clair que la méthylation seule ne peut être à l'origine de ces différences, compte tenu des données actuelles.

Il a donc été soutenu que l'ADN devait être riche en motifs CpG pour induire la signalisation via le TLR9, et que l'activation était abolie lorsque le motif était inversé en GpC (Krieg et al, 1995). Cependant tous les motifs CpG ne sont pas activateurs pour le TLR9, certains n'induisent pas la signalisation TLR9 et peuvent même inhiber l'activation induite par des CpG activateurs alors qu'ils ont une charpente phosphodiester (Krieg et al, 1998; Stacey et al, 2003). Par la suite, d'autres travaux ont décrit que la charpente phosphodiester de l'ADN était suffisante pour activer le TLR9 et ce, indépendamment des bases associées. La nécessité de motifs CpG activateurs n'était valable que pour les ADN avec une charpente

phosphorothioate (Haas et al, 2008). Ces éléments suggéraient donc que la charpente phosphodiester de l'ADN était capable d'interagir avec le TLR9. En effet, l'observation que l'ADN de vertébré était capable d'activer un TLR9 chimérique localisé à la membrane cellulaire a lancé l'idée que l'accès au TLR9 endogène pourrait être restreint aux ADN de pathogènes et non à l'ADN du soi, ce qui protégeait la cellule des réponses auto-immunes (Barton et al, 2006). L'ADN de vertébré et de parasite ayant tous les deux une charpente ADN phosphodiester, nos résultats nous ont conduit à envisager que l'activation spécifique par l'ADN de *Trypanosomatidae* ne serait pas complètement indépendant de la séquence de l'ADN. L'ADN de vertébré étant 100 fois plus grand que l'ADN de parasite, nous l'avons réduit à la même taille par sonication. Même ainsi, l'ADN de vertébré soniqué n'active pas le TLR9, alors que celui du *Leishmania major* conserve ses propriétés. La différence d'activation ne repose donc pas sur la taille des génomes.

Par ailleurs, nous avons observé que l'ADN de parasite et l'ADN de vertébré peuvent être en compétition pour l'activation du TLR9, comme il a été observé entre des oligonucléotides activateurs et l'ADN de vertébré. Cette compétition n'a pas lieu au niveau de l'internalisation de l'ADN, puisqu'il y a autant d'ADN de parasite qui entre dans les cellules dendritiques en présence ou en absence de l'ADN de vertébré. Mais elle pourrait avoir lieu pour l'interaction du TLR9. Il a été précédemment démontré qu'aussi bien un oligonucléotide activateur qu'inhibiteur est capable d'interagir avec le TLR9, mais seul celui qui est activateur induit le changement de conformation du TLR9 (Latz et al, 2007). De plus, un oligonucléotide activateur peut être en compétition avec un oligonucléotide inhibiteur pour la liaison au fragment C-terminal du TLR9 (Avalos et al, 2011).

La mise en évidence d'une compétition entre ADN nous a conduit à étudier les séquences décrites comme activatrices et inhibitrices dans les différents génomes. Nous avons pu établir le nombre de séquences attendues et le comparer au nombre de séquences observées. Ceci a permis de montrer que contrairement au génome de vertébrés où il existe une contre-sélection de motifs activateurs, il n'en existe pas dans les génomes de *Trypanosomatidae*.

Les séquences activatrices que l'on retrouve en plus grande proportion dans le génome de *Leishmania major* auraient pu être localisées dans des régions particulières du génome. En effet, dans le génome du *T. cruzi*, les séquences activatrices ont été en grande majorité localisées sur des séquences de rétrotransposons VIPER (Bartholomeu et al, 2008). Mais cela

n'est pas le cas pour le *Leishmania major*, les séquences activatrices sont situées dans tout le génome et non dans des gènes ou éléments génomiques particuliers.

La maturation du TLR9 est-elle dépendante de l'activation par l'ADN ?

Notre objectif était de rechercher s'il y avait une différence dans la maturation endosomale et le clivage du TLR9, lors de la stimulation par un ADN activateur et un ADN inhibiteur. Nous n'avons observé de différence ni dans l'acidification endosomale, ni dans le clivage du TLR9. En accord avec d'autres résultats, une proportion non négligeable de TLR9 clivé existe avant activation et pourrait être suffisante pour l'induction de la signalisation TLR9.

L'élément précis conduisant au clivage du TLR9 est encore discuté quant à la nécessité d'une activation. En effet, en cas d'activation, l'homodimère du TLR9 subit un changement de conformation rapprochant les domaines TIR entre eux (Latz et al, 2007). Le clivage pourrait avoir lieu avant ou après ce changement de conformation. En effet, un modèle serait que le TLR9 se lie à son ligand, la liaison induit sa protéolyse, accompagnée d'un changement de conformation pour rapprocher les domaines TIR et induire la signalisation TLR9. Un autre modèle serait que la protéolyse du TLR9 peut avoir lieu indépendamment de toute stimulation, et s'accompagnerait automatiquement du changement de conformation. Il existerait un troisième modèle où le clivage du TLR9 et son changement de conformation seraient indépendants et seule la liaison du C-terminal du TLR9 avec son ligand activateur induirait un changement de conformation, permettant le rapprochement des domaines TIR pour induire la signalisation. En effet, alors que le TLR9 entier et le fragment C-terminal du TLR9 peuvent tous les deux se lier au CpG, le fragment C-terminal aurait cependant une meilleure affinité pour le CpG que le TLR9 entier (Ewald et al, 2008) et il serait le seul à permettre l'induction de la signalisation TLR9 (Latz et al, 2007; Ewald et al, 2008). Ainsi, la présence d'un TLR9 clivé indépendamment d'une activation permettrait à la cellule d'avoir un récepteur plus affiné pour le ligand, déjà présent et fonctionnel. De plus, l'existence d'une affinité plus grande du TLR9 pour le CpG en pH acide (Rutz et al, 2004) soutiendrait aussi qu'un environnement acide, permettant le clivage du TLR9, serait favorable et devrait être déjà présent pour une meilleure liaison du ligand. Le fragment N-terminal aurait aussi un rôle, puisqu'il resterait attaché au fragment C-terminal et contribuerait à la liaison du ligand (Onji et al, 2013). D'autres études seront nécessaires pour établir le rôle de la maturation

endosomale et du clivage du TLR9, dans la liaison du ligand et la signalisation de ce récepteur.

L'implication des protéases de maturation du TLR9 dans l'infection par *L. major*

Le TLR9 étant exprimé dans différentes cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules B, les cellules dendritiques ou les macrophages, nous aurions voulu préciser l'importance du TLR9 dans ces différentes populations cellulaires. Les macrophages sont les cellules-hôtes de *L. major*, où les promastigotes se transforment en amastigotes avant de se répliquer. Les cellules dendritiques sont par excellence des cellules présentatrices d'antigènes. Ces cellules ayant des pH endosomaux différents, avec un pH plus acide dans les macrophages, et l'activation du TLR9 nécessitant un clivage préalable impliquant différentes protéases, nous avons pris en considération les protéases décrites pour intervenir dans le clivage du TLR9 et étudié la réponse immune dans l'infection par *L. major* des souris invalidées pour leur gène. Nous faisons l'hypothèse que le TLR9 serait activé de manière différente dans les macrophages ou les DCs.

Comme nous l'avons discuté précédemment, les souris invalidées pour l'AEP, responsable du clivage de TLR9 dans les DCs, et celles invalidées pour les cathepsines L et S, cystéine protéases supposées être impliquées dans le clivage du TLR9 dans les macrophages et la présentation antigénique via le CMH de classe II, se comportent comme les souris contrôles. En revanche, les souris invalidées pour la cathepsine B sont moins sensibles à l'infection du fait d'une réponse immune plus rapide et plus efficace.

La cathepsine B est une cystéine protéase, dont le précurseur est formée d'une seule chaîne (29 kDa) et la forme active composée de deux chaînes (25 et 4 kDa) reliées par un pont disulfure. La cathepsine B active, avec ses deux chaînes, est retrouvée dans les endosomes/lysosomes. Avec d'autres cathepsines comme la cathepsine D, elle peut être transloquée des endosomes/lysosomes vers le cytoplasme en cas de production de ROS pour activer l'inflammasome et contribuer à l'apoptose. Ainsi, la forme mature de la cathepsine D est sécrétée avec l'IL-18 et des composants de l'inflammasome comme ASC ou la caspase-1 dans les cellules stimulées par de l'ARN double-brin dans le cytoplasme (Rintahaka et al, 2011). Cette activation précède l'apoptose des macrophages ayant reconnu de l'ARN cytoplasmique. Dans ces résultats, bien que la cathepsine B ne soit pas été impliquée dans

l'apoptose, d'autres travaux ont montré son rôle dans l'induction de l'apoptose dans des cellules du système immunitaire (Blomgran, 2007 ; Pratt et al, 2009).

Si en absence de la cathepsine B, les DCs et les macrophages CatB^{-/-} étaient moins apoptotiques, les parasites pourraient survivre dans la cellule sans se disséminer. Alors que si les cellules entrent en apoptose, les parasites doivent infecter d'autres cellules pour survivre. C'est ce qui est observé *in vivo* puisque les parasites se développent davantage dans les ganglions des souris C57BL/6 que dans les souris CatB^{-/-}. *In vitro*, la survie plus longue de *L. major* constatée dans les cellules déficientes pour la cathepsine B pourrait donc être expliquée par un retard dans l'induction de l'apoptose. Dans les conditions de culture utilisées, les parasites des cellules C57BL/6 ne trouveraient plus de nouvel hôte et mourraient plus vite, la majorité des cellules ayant été infectée.

Implication de l'inflammasome dans l'infection par *L. major*

Par ailleurs, l'infection par *Leishmania amazonensis* active l'inflammasome NLRP3 (Lima-Junior et al, 2013). Cette activation est dépendante des cathepsines B et L, de potassium (K⁺) et des canaux potassiques. L'activation de l'inflammasome NLRP3 induit la maturation et la sécrétion de la caspase-1 dans les BMDCs infectés par *L. amazonensis*. L'internalisation du parasite est la même dans les macrophages dérivés de la moelle (BMDMs) de souris contrôles que dans ceux de souris déficientes pour l'inflammasome (Pycard^{-/-}NLRP3^{-/-}Casp^{-/-}Nos2^{-/-}). Dans ces dernières, on trouve un plus haut pourcentage de cellules infectées et plus d'amastigotes intracellulaires après 24, 48, 72 et 96h, suggérant leur réplication plus efficace. Ainsi, les animaux NLRP3^{-/-} ou caspase^{-/-} ont une augmentation de la lésion et du nombre de parasites. Dans les mutants de l'inflammasome Pycard^{-/-}Casp1^{-/-}, on constate l'absence d'IL-1β et l'addition d'IL-1β exogène engendre une activité leishmanicide dans les BMDMs de souris C57BL/6, qui est moindre que dans ceux des souris déficientes pour l'inflammasome. Ainsi, dans les BMDMs de ces souris, l'addition d'IL-1β restaure partiellement l'activité leishmanicide, par la production de NO, suggérant que l'inflammasome est impliqué dans un processus additionnel conduisant à la production d'IL-1β et à la résistance des macrophages. La production de NO est dose dépendante ou de l'IFNγ ou de l'IL-1β. De plus, les BMDMs de souris Casp1^{-/-} déficientes ont une expression altérée de Nos2 et d'IFNγ mais pas du TNFα, montrant que l'inflammasome est requis aussi pour l'expression d'IFN. Un traitement

IL-1 β + IFN γ restaure complètement la production de NO. L'inflammasome est donc nécessaire à la production de NO, à travers des mécanismes impliquant l'IL-1 β et l'IFN γ .

Dans ces travaux, le rôle de l'inflammasome n'a pas été mis en évidence dans l'infection à *L. major* (Lima-Junior et al, 2013). Il est cependant intéressant de noter que dans les souris CatB^{-/-} infectées par *L. major*, nous avons trouvé moins d'IFN γ et moins d'IL-1 β .

L'IL-1 β est impliquée dans la pathologie déclenchée par l'infection par *L. major* et elle pourrait jouer un rôle critique dans l'induction d'IL-17 (Gonzalez-Lombana et al, 2013). Alors que les souris IL1R^{-/-} développent une pathologie à l'infection par *L. major* identique à celle des souris contrôles C57BL/6, les souris C57BL/6 traitées avec des anticorps anti-IL-10R ont une pathologie augmentée et une infiltration de neutrophiles élevée. Ce n'est pas le cas dans les souris IL1R^{-/-} où ni la pathologie ni l'infiltration de neutrophiles n'est augmentée après traitement par des anti-IL-10R, et la sécrétion d'IFN γ n'est que partiellement affectée. Cependant, la production d'IL-17 est entièrement abrogée. Les auteurs en concluent que l'IL-1 β contrôle dans ce modèle l'expression d'IL-17 (Gonzalez-Lombana et al, 2013).

En résumé, lors de l'infection par *L. major*, en absence d'IL-10, on a un recrutement plus élevé de monocytes, une accumulation de neutrophiles et une augmentation de l'expression d'IL-1 β , d'IFN γ , d'IL-17 et d'iNOS (Gonzalez-Lombana et al, 2013). Si dans ces animaux dépourvus d'IL-10, on neutralise l'IFN γ , la pathologie s'aggrave encore, avec une augmentation accrue de neutrophiles et de l'expression d'IL-17. Ils en déduisent donc que l'expression d'IL-17 est contrôlée par l'IFN γ et par l'IL-1 β , mais non par l'IL-10.

Préalablement dans la leishmaniose, il avait été montré que l'absence d'IL-10 ou le blocage du récepteur avec des anticorps anti-IL-10R conduit à une meilleure clairance du parasite, aussi bien dans la leishmaniose viscérale que cutanée (Kane & Mosser, 2001 ; Belkaid, 2001 ; Nylén, 2007). Ici, les travaux de Gonzalez-Lombana décrivent une aggravation de la pathologie avec une forte augmentation de l'inflammation mais aussi avec une diminution de la charge parasitaire (Gonzalez-Lombana et al, 2013). L'aggravation de la pathologie n'avait pas été observée précédemment. Mais il s'agissait d'un modèle avec une inoculation de faible dose de parasites, contrairement au modèle de 2013 où l'on inocule une forte dose de parasites. Pour interpréter ces différences, il a été proposé que l'inoculation d'une faible dose est associée à une phase silencieuse de l'infection dans l'organisme, même en absence d'IL-

10, et qu'ainsi le parasite peut être totalement éliminé avant la mise en place de la réponse immune, ce qui ne serait pas le cas lorsqu'on inocule une forte dose de parasites.

Qu'en est-il dans notre modèle de souris *CatB*^{-/-} dans lesquels l'expression d'IL-1 β et d'IFN γ est beaucoup plus transitoire que dans les souris C57BL/6 ? Y a-t-il des différences au niveau de l'expression d'iNOS, d'IL-17, de NO et au niveau du recrutement cellulaire, notamment des neutrophiles, dans les coussinets plantaires et les ganglions ? Nous poursuivons actuellement l'étude de ces paramètres dans ce modèle.

Nous venons d'évoquer longuement le rôle de l'inflammasome et à juste titre puisque nous recherchons l'impact de la cathepsine B dans l'infection à *L. major* via l'inflammasome. Mais il nous faut aussi considérer les travaux de Dostert 2009 qui nie le rôle de la cathepsine B.

Le rôle de la cathepsine B dans l'activation de l'inflammasome NALP3 avait été mis en évidence suite aux travaux sur la phagocytose de matériel insoluble comme des cristaux de silice, des sels d'aluminium, des agrégats de peptides amyloïdes ou avec le parasite *Trypanosoma cruzi* (Hornung et al, 2008 ; Halle et al, 2008 ; Gonçalves et al, 2013). Elle peut s'accompagner d'une déstabilisation et d'une rupture des lysosomes qui libèrent alors leurs protéines. La cathepsine B ainsi libérée intervient à son tour dans l'activation de NALP3 et la maturation d'IL-1 β . En effet, l'infection par *T. cruzi* induit l'expression d'IL-1 β par une voie NLRP3 et caspase-dépendante. La cathepsine B est requise pour l'activation de NLRP3 comme le montre l'inhibition spécifique de celle-ci qui abroge la sécrétion d'IL-1 β . De façon intéressante, la neutralisation d'IL-1 β , d'IL-18 et la déficience en IL-1R démontre que ces cytokines ont un effet mineur sur la sécrétion de NO. Le contrôle de *T. cruzi* se fait donc par l'inflammasome NLRP-3, la production de NO est caspase-dépendante et IL-1R indépendante.

En revanche, les travaux de Dostert et al. (2009) montrent que dans les BMDMs ou BMDCs de souris déficientes pour la cathepsine B, il n'y a pas de différences ni dans la sécrétion d'IL-1 β ni dans le clivage par la caspase-1 en réponse à plusieurs activateurs, comme l'hémozoïne, la silice, l'alun, et que par conséquent cette nouvelle voie d'activation n'est pas toujours impliquée.

La présentation antigénique

La réponse immune plus rapide et plus efficace à *L. major* dans les souris *CatB*^{-/-} peut aussi indiquer un apprêtement des antigènes du parasite par les cellules présentatrices d'antigènes,

différent de celui des souris C57BL/6. L'implication de la cathepsine B dans la présentation antigénique est cependant controversée, certains ayant décrit sa participation dans la présentation par le CMH de classe II (Matsunaga et al, 1993), d'autres l'ayant contredit (Deussing et al, 1998). L'implication de la cathepsine B dans la présentation antigénique via le CMH de classe I a été moins étudiée. Il a cependant été démontré qu'avec un traitement inhibiteur de cathepsine B (Ca-074), des souris BALB/c infectées par *L. major* devenaient résistantes à l'infection en terme de taille des lésions, alors que le traitement n'affectait pas les souris déjà résistantes DBA/2. Selon la lignée murine étudiée la cathepsine B a donc un rôle différent dans l'infection par *L. major*. (Maekawa et al, 1998). Cet inhibiteur n'affectait pas directement les parasites, qui proliféraient normalement en sa présence. Cependant, les souris BALB/c infectées et traitées par l'inhibiteur montrait une diminution des anticorps IgG1 et IgE dans le sérum et de la production d'IL-4 dans les cellules de ganglions alors que celle d'IFN γ était augmentée. Cela suggérait l'implication de la cathepsine B dans la mise en place d'une réponse Th2 (Maekawa et al, 1998). La cathepsine B n'agit pas directement sur les lymphocytes T et leur production de cytokines mais sur la digestion des antigènes issus du parasite *Leishmania*, suggérant aussi son rôle dans l'apprêtement d'antigènes (Maekawa et al, 1998). Toutefois, certains pensent que l'orientation de la réponse Th2 pourrait être due au rôle de la cathepsine B dans l'activation du TGF β , qui réduit l'expression d'iNOS et d'IFN γ et par conséquent la réponse Th1 (Gantt et al, 2003).

Dans notre étude avec des souris dont le fond génétique est C57BL/6, nous observons que la déficience en cathepsine B induit très rapidement et efficacement une réponse immune, qui pourrait être due à un apprêtement particulier des antigènes du parasite. Il serait donc intéressant d'étudier si la présentation antigénique des souris CatB^{-/-} est différente de celle des souris contrôles.

Du fait de la redondance des protéases impliquées dans la maturation du TLR9, nous n'avons pu établir le rôle de TLR9 dans chaque population cellulaire au cours de l'infection par *L. major*. On constate que certaines protéases responsables de la maturation du TLR9, comme l'AEP dans les cellules dendritiques, ne semblent pas jouer un rôle *in vivo* dans la réponse immune à une infection qui met en cause le TLR9. Parmi les déficiences en protéases que nous avons étudié, aucune ne reflète celle du TLR9. En revanche, il est très enthousiasmant de constater et de comprendre comment la déficience dans l'une d'elles augmente la résistance à l'infection et de quel mécanisme précis la cathepsine B est responsable au cours de la réponse immune à l'infection.

BIBLIOGRAPHIE

Abou Fakher, F. H., N. Rachinel, et al. (2009). "TLR9-dependent activation of dendritic cells by DNA from *Leishmania major* favors Th1 cell development and the resolution of lesions." J Immunol **182**(3): 1386-1396.

Abu-Dayyeh, I., M. T. Shio, et al. (2008). "Leishmania-induced IRAK-1 inactivation is mediated by SHP-1 interacting with an evolutionarily conserved KTIM motif." PLoS Negl Trop Dis **2**(12): e305.

Afonso, L. C., T. M. Scharton, et al. (1994). "The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*." Science **263**(5144): 235-237.

Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, et al. (2002). "Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments." Eur J Immunol **32**(7): 1958-1968.

Akilov, O. E., R. E. Kasuboski, et al. (2007). "The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis." J Leukoc Biol **81**(5): 1188-1196.

Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **4**(7): 499-511.

Alexander, J., G. H. Coombs, et al. (1998). "Leishmania mexicana cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response." J Immunol **161**(12): 6794-6801.

Alexander, J., A. R. Satoskar, et al. (1999). "Leishmania species: models of intracellular parasitism." J Cell Sci **112 Pt 18**: 2993-3002.

Anderson, C. F., S. Mendez, et al. (2005). "Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice." J Immunol **174**(5): 2934-2941.

Andrade, W. A., C. Souza Mdo, et al. (2013). "Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice." Cell Host Microbe **13**(1): 42-53.

Artis, D., L. M. Johnson, et al. (2004). "Cutting edge: early IL-4 production governs the requirement for IL-27-WSX-1 signaling in the development of protective Th1 cytokine responses following *Leishmania major* infection." J Immunol **172**(8): 4672-4675.

Asagiri, M., T. Hirai, et al. (2008). "Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis." Science **319**(5863): 624-627.

Aseffa, A., A. Gumy, et al. (2002). "The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of

regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells." *J Immunol* **169**(6): 3232-3241.

Ashman, R. F., J. A. Goeken, et al. (2005). "Sequence requirements for oligodeoxyribonucleotide inhibitory activity." *Int Immunol* **17**(4): 411-420.

Assis, R. R., I. C. Ibraim, et al. (2012). "Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure." *PLoS Negl Trop Dis* **6**(2): e1543.

Ato, M., S. Stager, et al. (2002). "Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis." *Nat Immunol* **3**(12): 1185-1191.

Avalos, A. M. and H. L. Ploegh (2011). "Competition by inhibitory oligonucleotides prevents binding of CpG to C-terminal TLR9." *Eur J Immunol* **41**(10): 2820-2827.

Avalos, A. M., O. Kirak, et al. (2013). "Cell-specific TLR9 trafficking in primary APCs of transgenic TLR9-GFP mice." *J Immunol* **190**(2): 695-702.

Awasthi, A., R. Mathur, et al. (2003). "CD40 signaling is impaired in *L. major*-infected macrophages and is rescued by a p38MAPK activator establishing a host-protective memory T cell response." *J Exp Med* **197**(8): 1037-1043.

Babay, B. E., H. Louzir, et al. (2004). "Inbred strains derived from feral mice reveal new pathogenic mechanisms of experimental leishmaniasis due to *Leishmania major*." *Infect Immun* **72**(8): 4603-4611.

Bafica, A., H. C. Santiago, et al. (2006). "Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection." *J Immunol* **177**(6): 3515-3519.

Ballas, Z. K., W. L. Rasmussen, et al. (1996). "Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA." *J Immunol* **157**(5): 1840-1845.

Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* **392**(6673): 245-252.

Banuls, A. L., M. Hide, et al. (2007). "Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans." *Adv Parasitol* **64**: 1-109.

Bartholomeu, D. C., C. Ropert, et al. (2008). "Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*." *J Immunol* **181**(2): 1333-1344.

Barton, G. M., J. C. Kagan, et al. (2006). "Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA." *Nat Immunol* **7**(1): 49-56.

- Bates, P. A.** (2007). "Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies." Int J Parasitol **37**(10): 1097-1106.
- Bauer, S.,** C. J. Kirschning, et al. (2001). "Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9237-9242.
- Baumann, C. L.,** I. M. Aspalter, et al. (2010). "CD14 is a coreceptor of Toll-like receptors 7 and 9." J Exp Med **207**(12): 2689-2701.
- Bave, U.,** M. Magnusson, et al. (2003). "Fc gamma RIIa is expressed on natural IFN-alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) and is required for the IFN-alpha production induced by apoptotic cells combined with lupus IgG." J Immunol **171**(6): 3296-3302.
- Becker, I.,** N. Salaiza, et al. (2003). "Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2." Mol Biochem Parasitol **130**(2): 65-74.
- Beil, W. J.,** G. Meinardus-Hager, et al. (1992). "Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice." J Leukoc Biol **52**(2): 135-142.
- Belkaid, Y.,** B. Butcher, et al. (1998). "Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells." Eur J Immunol **28**(4): 1389-1400.
- Belkaid, Y.,** S. Mendez, et al. (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." J Immunol **165**(2): 969-977.
- Belkaid, Y.,** K. F. Hoffmann, et al. (2001). "The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania* major in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure." J Exp Med **194**(10): 1497-1506.
- Belkaid, Y.,** C. A. Piccirillo, et al. (2002). "CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity." Nature **420**(6915): 502-507.
- Belkaid, Y.,** E. Von Stebut, et al. (2002). "CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania* major." J Immunol **168**(8): 3992-4000.
- Berriman, M.,** E. Ghedin, et al. (2005). "The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*." Science **309**(5733): 416-422.
- Bertholet, S.,** R. Goldszmid, et al. (2006). "Leishmania antigens are presented to CD8⁺ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway *in vitro* and *in vivo*." J Immunol

177(6): 3525-3533.

Bhattacharyya, S., S. Ghosh, et al. (2001). "Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events." Infect Immun **69**(3): 1499-1507.

Bianchi, M. E. and A. A. Manfredi (2007). "High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity." Immunol Rev **220**: 35-46.

Bishop, J. S., J. K. Guy-Caffey, et al. (1996). "Intramolecular G-quartet motifs confer nuclease resistance to a potent anti-HIV oligonucleotide." J Biol Chem **271**(10): 5698-5703.

Blackwell, J. M., R. A. Ezekowitz, et al. (1985). "Macrophage complement and lectin-like receptors bind Leishmania in the absence of serum." J Exp Med **162**(1): 324-331..

Blanchette, J., N. Racette, et al. (1999). "Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation." Eur J Immunol **29**(11): 3737-3744.

Blank, C., H. Fuchs, et al. (1993). "Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with Leishmania major." J Infect Dis **167**(2): 418-425.

Blomgran, R., L. Zheng, et al. (2007). "Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization." J Leukoc Biol **81**(5): 1213-1223.

Blos, M., U. Schleicher, et al. (2003). "Organ-specific and stage-dependent control of Leishmania major infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase." Eur J Immunol **33**(5): 1224-1234.

Bogdan, C. and M. Rollinghoff (1998). "The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion." Int J Parasitol **28**(1): 121-134.

Bogdan, C., N. Donhauser, et al. (2000). "Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis." J Exp Med **191**(12): 2121-2130.

Borst, P. and R. Sabatini (2008). "Base J: discovery, biosynthesis, and possible functions." Annu Rev Microbiol **62**: 235-251.

Boule, M. W., C. Broughton, et al. (2004). "Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes." J Exp Med **199**(12): 1631-1640.

Bringaud, F., E. Ghedin, et al. (2006). "Evolution of non-LTR retrotransposons in the

trypanosomatid genomes: *Leishmania major* has lost the active elements." Mol Biochem Parasitol **145**(2): 158-170.

Bringaud, F., M. Muller, et al. (2007). "Members of a large retroposon family are determinants of post-transcriptional gene expression in *Leishmania*." PLoS Pathog **3**(9): 1291-1307.

Bringaud, F., E. Ghedin, et al. (2008). "Role of transposable elements in trypanosomatids." Microbes Infect **10**(6): 575-581.

Bringaud, F., M. Berriman, et al. (2009). "Trypanosomatid genomes contain several subfamilies of ingi-related retroposons." Eukaryot Cell **8**(10): 1532-1542.

Brinkmann, M. M., E. Spooner, et al. (2007). "The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling." J Cell Biol **177**(2): 265-275.

Brittingham, A., C. J. Morrison, et al. (1995). "Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis." J Immunol **155**(6): 3102-3111.

Brittingham, A., G. Chen, et al. (1999). "Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin." Infect Immun **67**(9): 4477-4484.

Brown, D. R., J. M. Green, et al. (1996). "Limited role of CD28-mediated signals in T helper subset differentiation." J Exp Med **184**(3): 803-810.

Brown, J. A., R. G. Titus, et al. (1996). "Blockade of CD86 ameliorates *Leishmania major* infection by down-regulating the Th2 response." J Infect Dis **174**(6): 1303-1308.

Bryson, K., S. Besteiro, et al. (2009). "Overexpression of the natural inhibitor of cysteine peptidases in *Leishmania mexicana* leads to reduced virulence and a Th1 response." Infect Immun **77**(7): 2971-2978.

Buffet, P., E. Rosenthal, et al. (2010). "Traitement des leishmanioses en France : proposition d'un référentiel consensuel." Presse Med **40**(2): 173-184.

Campbell, K. A., P. J. Owendale, et al. (1996). "CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*." Immunity **4**(3): 283-289.

Campos, M. A., M. Closel, et al. (2004). "Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88." J Immunol **172**(3): 1711-1718.

Carlsen, E. D., C. Hay, et al. (2013). "*Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms." Infect Immun **81**(11): 3966-3974.

Carvalho, C. M., J. Lu, et al. (2011). "Effects of selenite and chelating agents on mammalian thioredoxin reductase inhibited by mercury: implications for treatment of mercury poisoning." FASEB J **25**(1): 370-381.

Chakour, R., R. Guler, et al. (2003). "Both the Fas ligand and inducible nitric oxide synthase are needed for control of parasite replication within lesions in mice infected with *Leishmania major* whereas the contribution of tumor necrosis factor is minimal." Infect Immun **71**(9): 5287-5295.

Chandra, D. and S. Naik (2008). "Leishmania donovani infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism." Clin Exp Immunol **154**(2): 224-234.

Charmoy, M., S. Brunner-Agten, et al. (2010). "Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice." PLoS Pathog **6**(2): e1000755.

Charmoy, M., R. Megnekou, et al. (2007). "Leishmania major induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection." J Leukoc Biol **82**(2): 288-299.

Chen, D. Q., B. K. Kolli, et al. (2000). "Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages *in vitro*." Infect Immun **68**(1): 80-86.

Chockalingam, A., J. C. Brooks, et al. (2009). "TLR9 traffics through the Golgi complex to localize to endolysosomes and respond to CpG DNA." Immunol Cell Biol **87**(3): 209-217.

Chockalingam, A., W. A. Rose, 2nd, et al. (2012). "Cutting edge: a TLR9 cytoplasmic tyrosine motif is selectively required for proinflammatory cytokine production." J Immunol **188**(2): 527-530.

Choi, C. M. and E. A. Lerner (2001). "Leishmaniasis as an emerging infection." J Investig Dermatol Symp Proc **6**(3): 175-182.

Clayton, C. E. (2002). "Life without transcriptional control? From fly to man and back again." EMBO J **21**(8): 1881-1888.

Coban, C., K. J. Ishii, et al. (2005). "Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin." J Exp Med **201**(1): 19-25.

Colbert, J. D., S. P. Matthews, et al. (2009). "Diverse regulatory roles for lysosomal proteases in the immune response." Eur J Immunol **39**(11): 2955-2965.

Colmenares, M., A. Puig-Kroger, et al. (2002). "Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human

DCs, is a receptor for *Leishmania* amastigotes." J Biol Chem **277**(39): 36766-36769.

Colmenares, M., A. L. Corbi, et al. (2004). "The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*." J Immunol **172**(2): 1186-1190.

Cornelie, S., O. Poulain-Godefroy, et al. (2004). "Methylated CpG-containing plasmid activates the immune system." Scand J Immunol **59**(2): 143-151.

Corradin, S., A. Ransijn, et al. (1999). "MARCKS-related protein (MRP) is a substrate for the *Leishmania* major surface protease leishmanolysin (gp63)." J Biol Chem **274**(36): 25411-25418.

Corry, D. B., S. L. Reiner, et al. (1994). "Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis." J Immunol **153**(9): 4142-4148.

Cuervo, P., J. B. De Jesus, et al. (2009). "Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* promastigotes." J Proteomics **73**(1): 79-92.

Da Silva, R. P., B. F. Hall, et al. (1989). "CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania* major metacyclic promastigotes to human macrophages." J Immunol **143**(2): 617-622.

Dalpke, A. H., S. Zimmermann, et al. (2002). "Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides *in vitro* and *in vivo*." Immunology **106**(1): 102-112.

Das, S., A. K. Saha, et al. (1986). "Hydrolysis of phosphoproteins and inositol phosphates by cell surface phosphatase of *Leishmania donovani*." Mol Biochem Parasitol **20**(2): 143-153.

Das, L., N. Datta, et al. (2001). "Successful therapy of lethal murine visceral leishmaniasis with cystatin involves up-regulation of nitric oxide and a favorable T cell response." J Immunol **166**(6): 4020-4028.

De Freitas Balanco, J. M., M. E. Moreira, et al. (2001). "Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity." Curr Biol **11**(23): 1870-1873.

De Jong, S. D., G. Basha, et al. (2010). "The immunostimulatory activity of unmethylated and methylated CpG oligodeoxynucleotide is dependent on their ability to colocalize with TLR9 in late endosomes." J Immunol **184**(11): 6092-6102.

De Souza Leao, S., T. Lang, et al. (1995). "Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells." J Cell Sci **108** (Pt 10): 3219-3231.

De Trez, C., M. Brait, et al. (2004). "Myd88-dependent *in vivo* maturation of splenic dendritic cells

induced by *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species." Infect Immun **72**(2): 824-832.

De Veer, M. J., J. M. Curtis, et al. (2003). "MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling." Eur J Immunol **33**(10): 2822-2831.

Debierre-Grockiego, F., M. A. Campos, et al. (2007). "Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*." J Immunol **179**(2): 1129-1137.

Decuypere, S., M. Vanaerschot, et al. (2012). "Molecular mechanisms of drug resistance in natural *Leishmania* populations vary with genetic background." PLoS Negl Trop Dis **6**(2): e1514.

Deretic, V., T. Saitoh, et al. (2013). "Autophagy in infection, inflammation and immunity." Nat Rev Immunol **13**(10): 722-737.

Desjardins, M. and A. Descoteaux (1997). "Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan." J Exp Med **185**(12): 2061-2068.

Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **27**(5): 305-318.

Deussing, J., W. Roth, et al. (1998). "Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4516-4521.

Dostert, C., G. Guarda, et al. (2009). "Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal." PLoS One **4**(8): e6510.

Doumas, S., A. Kolokotronis, et al. (2005). "Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor." Infect Immun **73**(3): 1271-1274.

Downing, T., H. Imamura, et al. (2011). "Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance." Genome Res **21**(12): 2143-2156.

Drennan, M. B., B. Stijlemans, et al. (2005). "The induction of a type 1 immune response following a *Trypanosoma brucei* infection is MyD88 dependent." J Immunol **175**(4): 2501-2509.

Ehrchen, J. M., K. Roebrock, et al. (2010). "Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis." PLoS Pathog **6**(4): e1000871.

Ehrlich, M., M. A. Gama-Sosa, et al. (1982). "Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells." Nucleic Acids Res **10**(8): 2709-2721.

- Ekanayake, D. K.,** M. J. Cipriano, et al. (2007). "Telomeric co-localization of the modified base J and contingency genes in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*." Nucleic Acids Res **35**(19): 6367-6377.
- El-Sayed, N. M.,** P. J. Myler, et al. (2005). "The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease." Science **309**(5733): 409-415.
- El-Sayed, N. M.,** P. J. Myler, et al. (2005). "Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa." Science **309**(5733): 404-409.
- Elloso, M. M. and P. Scott** (1999). "Expression and contribution of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in the early immune response to *Leishmania major* infection." J Immunol **162**(11): 6708-6715.
- Ewald, S. E.,** B. L. Lee, et al. (2008). "The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor." Nature **456**(7222): 658-662.
- Faria, M. S.,** F. C. Reis, et al. (2011). "Leishmania inhibitor of serine peptidase 2 prevents TLR4 activation by neutrophil elastase promoting parasite survival in murine macrophages." J Immunol **186**(1): 411-422.
- Flandin, J. F.,** F. Chano, et al. (2006). "RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages." Eur J Immunol **36**(2): 411-420.
- Fukui, R.,** S. Saitoh, et al. (2009). "Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA- but against RNA-sensing." J Exp Med **206**(6): 1339-1350.
- Gabriel, C.,** W. R. McMaster, et al. (2010). "Leishmania donovani promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps." J Immunol **185**(7): 4319-4327.
- Gallego, C.,** D. Golenbock, et al. (2011). "Toll-like receptors participate in macrophage activation and intracellular control of *Leishmania (Viannia) panamensis*." Infect Immun **79**(7): 2871-2879.
- Gantt, K. R.,** S. Schultz-Cherry, et al. (2003). "Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages." J Immunol **170**(5): 2613-2620.
- Geissmann, F.,** M. G. Manz, et al. (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." Science **327**(5966): 656-661.
- Genest, P. A.,** B. Ter Riet, et al. (2007). "Telomeric localization of the modified DNA base J in the genome of the protozoan parasite *Leishmania*." Nucleic Acids Res **35**(7): 2116-2124.
- Gomes, I. N.,** L. C. Palma, et al. (2009). "The scavenger receptor MARCO is involved in *Leishmania major* infection by CBA/J macrophages." Parasite Immunol **31**(4): 188-198.

- Gomez, M. A.,** I. Contreras, et al. (2009). "Leishmania GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases." Sci Signal **2**(90): ra58.
- Gomez-Arreaza, A.,** H. Acosta, et al. (2011). "Leishmania mexicana: LACK (Leishmania homolog of receptors for activated C-kinase) is a plasminogen binding protein." Exp Parasitol **127**(4): 752-761.
- Gommers-Ampt, J. H.,** F. Van Leeuwen, et al. (1993). "beta-D-glucosyl-hydroxymethyluracil: a novel modified base present in the DNA of the parasitic protozoan *T. brucei*." Cell **75**(6): 1129-1136.
- Goncalves, V. M.,** K. C. Matteucci, et al. (2013). "NLRP3 controls *Trypanosoma cruzi* infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production." PLoS Negl Trop Dis **7**(10): e2469.
- Gonzalez-Aseguinolaza, G.,** S. Taladriz, et al. (1999). "Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*." Eur J Biochem **259**(3): 909-916.
- Gonzalez-Lombana, C.,** C. Gimblet, et al. (2013). "IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection." PLoS Pathog **9**(3): e1003243.
- Gordon, S.** (2002). "Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response." Cell **111**(7): 927-930.
- Gowda, N. M.,** X. Wu, et al. (2011). "The nucleosome (histone-DNA complex) is the TLR9-specific immunostimulatory component of *Plasmodium falciparum* that activates DCs." PLoS One **6**(6): e20398.
- Gregory, D. J.,** R. Sladek, et al. (2008). "Comparison of the effects of *Leishmania major* or *Leishmania donovani* infection on macrophage gene expression." Infect Immun **76**(3): 1186-1192.
- Gueirard, P.,** A. Laplante, et al. (2008). "Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages." Cell Microbiol **10**(1): 100-111.
- Guermonprez, P.,** L. Saveanu, et al. (2003). "ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells." Nature **425**(6956): 397-402.
- Guiducci, C.,** G. Ott, et al. (2006). "Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation." J Exp Med **203**(8): 1999-2008.
- Guimaraes-Costa, A. B.,** M. T. Nascimento, et al. (2009). "*Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(16): 6748-

6753.

Gursel, I., M. Gursel, et al. (2003). "Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation." J Immunol **171**(3): 1393-1400.

Haas, T., J. Metzger, et al. (2008). "The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation." Immunity **28**(3): 315-323.

Hacker, H., H. Mischak, et al. (1998). "CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation." EMBO J **17**(21): 6230-6240.

Hacker, H., R. M. Vabulas, et al. (2000). "Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6." J Exp Med **192**(4): 595-600.

Halle, A., V. Hornung, et al. (2008). "The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta." Nat Immunol **9**(8): 857-865.

Halpern, M. D., R. J. Kurlander, et al. (1996). "Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha." Cell Immunol **167**(1): 72-78.

Hanagata, N. (2012). "Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system." Int J Nanomedicine **7**: 2181-2195.

Hartmann, G., R. D. Weeratna, et al. (2000). "Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses *in vitro* and *in vivo*." J Immunol **164**(3): 1617-1624.

Hassani, K., E. Antoniak, et al. (2011). "Temperature-induced protein secretion by *Leishmania mexicana* modulates macrophage signalling and function." PLoS One **6**(5): e18724.

Hawn, T. R., A. Ozinsky, et al. (2002). "Leishmania major activates IL-1 alpha expression in macrophages through a MyD88-dependent pathway." Microbes Infect **4**(8): 763-771.

Heinzel, F. P., M. D. Sadick, et al. (1989). "Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets." J Exp Med **169**(1): 59-72.

Hemmi, H., O. Takeuchi, et al. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." Nature **408**(6813): 740-745.

Henault, J., J. Martinez, et al. (2012). "Noncanonical autophagy is required for type I interferon

secretion in response to DNA-immune complexes." Immunity **37**(6): 986-997.

Henri, S., J. Curtis, et al. (2002). "Hierarchy of susceptibility of dendritic cell subsets to infection by *Leishmania major*: inverse relationship to interleukin-12 production." Infect Immun **70**(7): 3874-3880.

Henri, S., L. F. Poulin, et al. (2010). "CD207⁺ CD103⁺ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells." J Exp Med **207**(1): 189-206.

Heras, S. R., M. C. Lopez, et al. (2007). "The L1Tc non-LTR retrotransposon of *Trypanosoma cruzi* contains an internal RNA-pol II-dependent promoter that strongly activates gene transcription and generates unspliced transcripts." Nucleic Acids Res **35**(7): 2199-2214.

Hermoso, T., Z. Fishelson, et al. (1991). "Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system." EMBO J **10**(13): 4061-4067.

Hespanhol, R. C., C. S. M. de Nazare, et al. (2005). "The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion." J Histochem Cytochem **53**(1): 35-44.

Honda, K., H. Yanai, et al. (2005). "IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses." Nature **434**(7034): 772-777.

Hondowicz, B. and P. Scott (1999). "Influence of host and parasite factors on the innate immune response and Th2 stability following infection with *Leishmania major*." Microbes Infect **1**(1): 65-71.

Honey, K. and A. Y. Rudensky (2003). "Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation." Nat Rev Immunol **3**(6): 472-482.

Hornung, V., F. Bauernfeind, et al. (2008). "Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization." Nat Immunol **9**(8): 847-856.

Ilgoutz, S. C. and M. J. McConville (2001). "Function and assembly of the *Leishmania* surface coat." Int J Parasitol **31**(9): 899-908.

Ivanov, S., A. M. Dragoi, et al. (2007). "A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA." Blood **110**(6): 1970-1981.

Ivens, A. C., C. S. Peacock, et al. (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*." Science **309**(5733): 436-442.

Ives, A., C. Ronet, et al. (2011). "*Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis." Science **331**(6018): 775-778.

- Iwasaki, A. and R. Medzhitov** (2010). "Regulation of adaptive immunity by the innate immune system." Science **327**(5963): 291-295.
- Jackson, S. H., C. R. Yu, et al.** (2004). "Dendritic cell maturation requires STAT1 and is under feedback regulation by suppressors of cytokine signaling." J Immunol **172**(4): 2307-2315.
- Jakob, T., P. S. Walker, et al.** (1998). "Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA." J Immunol **161**(6): 3042-3049.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov** (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- Jaouen, S., L. de Koning, et al.** (2005). "Determinants of specific binding of HMGB1 protein to hemicatenated DNA loops." J Mol Biol **353**(4): 822-837.
- Jensen, R. E. and P. T. Englund** (2012). "Network news: the replication of kinetoplast DNA." Annu Rev Microbiol **66**: 473-491.
- Ji, J., J. Sun, et al.** (2003). "Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*." Infect Immun **71**(8): 4278-4288.
- Kane, M. M. and D. M. Mosser** (2001). "The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis." J Immunol **166**(2): 1141-1147.
- Katakura, K. and A. Kobayashi** (1988). "Acid phosphatase activity of virulent and avirulent clones of *Leishmania donovani* promastigotes." Infect Immun **56**(11): 2856-2860.
- Kautz-Neu, K., M. Noordegraaf, et al.** (2011). "Langerhans cells are negative regulators of the anti-*Leishmania* response." J Exp Med **208**(5): 885-891.
- Kavoosi, G., S. K. Ardestani, et al.** (2009). "The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs)." Parasitology **136**(10): 1193-1199.
- Kavoosi, G., S. K. Ardestani, et al.** (2010). "*Leishmania major* lipophosphoglycan: discrepancy in Toll-like receptor signaling." Exp Parasitol **124**(2): 214-218.
- Kelly, B. L., D. B. Stetson, et al.** (2003). "*Leishmania major* LACK antigen is required for efficient vertebrate parasitization." J Exp Med **198**(11): 1689-1698.
- Kerkmann, M., S. Rothenfusser, et al.** (2003). "Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic

cells." J Immunol **170**(9): 4465-4474.

Killick-Kendrick, R. (1999). "The biology and control of phlebotomine sand flies." Clin Dermatol **17**(3): 279-289.

Kim, J., J. Huh, et al. (2013). "Acidic amino acid residues in the juxtamembrane region of the nucleotide-sensing TLRs are important for UNC93B1 binding and signaling." J Immunol **190**(10): 5287-5295.

Kim, Y. M., M. M. Brinkmann, et al. (2008). "UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes." Nature **452**(7184): 234-238.

Kima, P. E., L. Soong, et al. (1996). "Leishmania-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4⁺ T cells." Eur J Immunol **26**(12): 3163-3169.

Kima, P. E., S. L. Constant, et al. (2000). "Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis." J Exp Med **191**(6): 1063-1068.

Klinman, D. M., A. K. Yi, et al. (1996). "CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(7): 2879-2883.

Koblansky, A. A., D. Jankovic, et al. (2013). "Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*." Immunity **38**(1): 119-130.

Konecny, P., A. J. Stagg, et al. (1999). "Murine dendritic cells internalize *Leishmania major* promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary T cell proliferation *in vitro*." Eur J Immunol **29**(6): 1803-1811.

Korn, T., E. Bettelli, et al. (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol **27**: 485-517.

Krieg, A. M., A. K. Yi, et al. (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." Nature **374**(6522): 546-549.

Krieg, A. M., T. Wu, et al. (1998). "Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12631-12636.

Krieg, A. M. (2002). "CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects." Annu Rev Immunol **20**: 709-760.

Krieg, A. M. (2006). "Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation." Nat Rev Drug Discov **5**(6): 471-484..

- Kropf, P.,** M. A. Freudenberg, et al. (2004). "Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*." *Infect Immun* **72**(4): 1920-1928.
- Krug, A.,** S. Rothenfusser, et al. (2001). "Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells." *Eur J Immunol* **31**(7): 2154-2163.
- Kulkarni, M. M.,** W. R. McMaster, et al. (2006). "The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing." *Mol Microbiol* **62**(5): 1484-1497.
- Lande, R.,** J. Gregorio, et al. (2007). "Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide." *Nature* **449**(7162): 564-569.
- Lander, E. S.,** L. M. Linton, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* **409**(6822): 860-921.
- Laskay, T.,** G. van Zandbergen, et al. (2003). "Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?" *Trends Microbiol* **11**(5): 210-214.
- Latz, E.,** A. Schoenemeyer, et al. (2004). "TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome." *Nat Immunol* **5**(2): 190-198.
- Latz, E.,** A. Verma, et al. (2007). "Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9." *Nat Immunol* **8**(7): 772-779.
- Leadbetter, E. A.,** I. R. Rifkin, et al. (2002). "Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors." *Nature* **416**(6881): 603-607.
- Lee, B. L.,** J. E. Moon, et al. (2013). "UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs." *Elife* **2**: e00291.
- Leifer, C. A.,** M. N. Kennedy, et al. (2004). "TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation." *J Immunol* **173**(2): 1179-1183.
- Lemos, M. P.,** F. Esquivel, et al. (2004). "MHC class II expression restricted to CD8alpha⁺ and CD11b⁺ dendritic cells is sufficient for control of *Leishmania major*." *J Exp Med* **199**(5): 725-730.
- Lenert, P.,** L. Stunz, et al. (2001). "CpG stimulation of primary mouse B cells is blocked by inhibitory oligodeoxyribonucleotides at a site proximal to NF-kappaB activation." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **11**(4): 247-256.
- Leon, B.,** M. Lopez-Bravo, et al. (2007). "Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*." *Immunity* **26**(4): 519-531.

- Li, D. N.,** S. P. Matthews, et al. (2003). "Multistep autoactivation of asparaginyl endopeptidase *in vitro* and *in vivo*." J Biol Chem **278**(40): 38980-38990.
- Liese, J.,** U. Schleicher, et al. (2007). "TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis." Eur J Immunol **37**(12): 3424-3434.
- Liew, F. Y.,** Y. Li, et al. (1990). "Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide." J Immunol **145**(12): 4306-4310.
- Lima-Junior, D. S.,** D. L. Costa, et al. (2013). "Inflammasome-derived IL-1beta production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*." Nat Med **19**(7): 909-915.
- Liu, B.,** Y. Yang, et al. (2010). "Folding of Toll-like receptors by the HSP90 paralogue gp96 requires a substrate-specific cochaperone." Nat Commun **1**: 79.
- Lodge, R. and A. Descoteaux** (2005). "*Leishmania donovani* promastigotes induce periphagosomal F-actin accumulation through retention of the GTPase Cdc42." Cell Microbiol **7**(11): 1647-1658.
- Lodge, R.,** T. O. Diallo, et al. (2006). "*Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane." Cell Microbiol **8**(12): 1922-1931.
- Lopez Kostka, S.,** S. Dinges, et al. (2009). "IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice." J Immunol **182**(5): 3039-3046.
- Lorenzi, H. A.,** G. Robledo, et al. (2006). "The VIPER elements of trypanosomes constitute a novel group of tyrosine recombinase-encoding retrotransposons." Mol Biochem Parasitol **145**(2): 184-194.
- Maekawa, Y.,** K. Himeno, et al. (1998). "Switch of CD4⁺ T cell differentiation from Th2 to Th1 by treatment with cathepsin B inhibitor in experimental leishmaniasis." J Immunol **161**(5): 2120-2127.
- Manoury, B.,** D. Mazzeo, et al. (2003). "Asparagine endopeptidase can initiate the removal of the MHC class II invariant chain chaperone." Immunity **18**(4): 489-498.
- Marie, J. C.,** J. J. Letterio, et al. (2005). "TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells." J Exp Med **201**(7): 1061-1067.
- Marini, J. C.,** S. D. Levene, et al. (1982). "Bent helical structure in kinetoplast DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(24): 7664-7668.
- Marth, T. and B. L. Kelsall** (1997). "Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling." J Exp Med **185**(11): 1987-1995.

- Martinez-Calvillo, S.,** S. Yan, et al. (2003). "Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region." Mol Cell **11**(5): 1291-1299.
- Matsumoto, F.,** S. Saitoh, et al. (2008). "Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses." Biochem Biophys Res Commun **367**(3): 693-699.
- Matsunaga, Y.,** T. Saibara, et al. (1993). "Participation of cathepsin B in processing of antigen presentation to MHC class II." FEBS Lett **324**(3): 325-330.
- Mattner, F.,** K. Di Padova, et al. (1997). "Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against *Leishmania major*." Infect Immun **65**(11): 4378-4383.
- McFarlane, E.,** C. Perez, et al. (2008). "Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*." Infect Immun **76**(2): 532-541.
- McMahon-Pratt, D.** and J. Alexander (2004). "Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease?" Immunol Rev **201**: 206-224.
- Miles, S. A.,** S. M. Conrad, et al. (2005). "A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*." J Exp Med **201**(5): 747-754.
- Minning, T. A.,** D. B. Weatherly, et al. (2011). "Widespread, focal copy number variations (CNV) and whole chromosome aneuploidies in *Trypanosoma cruzi* strains revealed by array comparative genomic hybridization." BMC Genomics **12**: 139.
- Moll, H.,** H. Fuchs, et al. (1993). "Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells." Eur J Immunol **23**(7): 1595-1601.
- Moll, H.,** S. Flohe, et al. (1995). "Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response." Eur J Immunol **25**(3): 693-699.
- Moll, H.,** A. Scharner, et al. (2002). "Increased interleukin 4 (IL-4) receptor expression and IL-4-induced decrease in IL-12 production by Langerhans cells infected with *Leishmania major*." Infect Immun **70**(3): 1627-1630.
- Mosser, D. M. and P. J. Edelson** (1984). "Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages." J Immunol **132**(3): 1501-1505.
- Mosser, D. M. and P. J. Edelson** (1985). "The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes." J Immunol **135**(4): 2785-2789.

- Mosser, D. M. and A. Brittingham** (1997). "Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation." Parasitology **115 Suppl**: S9-23.
- Mougneau, E., F. Altare, et al.** (1995). "Expression cloning of a protective Leishmania antigen." Science **268**(5210): 563-566.
- Mukbel, R., C. A. Petersen, et al.** (2006). "Soluble factors from Leishmania major-specific CD4⁺T cells and B cells limit L. amazonensis amastigote survival within infected macrophages." Microbes Infect **8**(9-10): 2547-2555.
- Muller, K., G. van Zandbergen, et al.** (2001). "Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of Leishmania major infection in mice." Med Microbiol Immunol **190**(1-2): 73-76.
- Muraille, E., C. De Trez, et al.** (2003). "Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to Leishmania major infection associated with a polarized Th2 response." J Immunol **170**(8): 4237-4241.
- Naik, S., N. Bouladoux, et al.** (2012). "Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals." Science **337**(6098): 1115-1119.
- Ng, L. G., A. Hsu, et al.** (2008). "Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites." PLoS Pathog **4**(11): e1000222.
- Noben-Trauth, N., P. Kropf, et al.** (1996). "Susceptibility to Leishmania major infection in interleukin-4-deficient mice." Science **271**(5251): 987-990.
- Noben-Trauth, N., R. Lira, et al.** (2003). "The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to Leishmania major." J Immunol **170**(10): 5152-5158.
- Novais, F. O., R. C. Santiago, et al.** (2009). "Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against Leishmania braziliensis infection." J Immunol **183**(12): 8088-8098.
- Novais, F. O., L. P. Carvalho, et al.** (2013). "Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis." PLoS Pathog **9**(7): e1003504.
- Nylen, S., R. Maurya, et al.** (2007). "Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4⁺CD25⁺ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis." J Exp Med **204**(4): 805-817.
- O'Neill, L. A., D. Golenbock, et al.** (2013). "The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity." Nat Rev Immunol **13**(6): 453-460.
- Ogg, M. M., R. Carrion, Jr., et al.** (2003). "Short report: quantification of leishmanivirus RNA in

clinical samples and its possible role in pathogenesis." Am J Trop Med Hyg **69**(3): 309-313.

Olivier, M., V. D. Atayde, et al. (2012). "Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63." Microbes Infect **14**(15): 1377-1389.

Onji, M., A. Kanno, et al. (2013). "An essential role for the N-terminal fragment of Toll-like receptor 9 in DNA sensing." Nat Commun **4**: 1949.

Ozinsky, A., D. M. Underhill, et al. (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13766-13771.

Paila, Y. D., B. Saha, et al. (2010). "Amphotericin B inhibits entry of Leishmania donovani into primary macrophages." Biochem Biophys Res Commun **399**(3): 429-433.

Park, A. Y., B. Hondowicz, et al. (2002). "The role of IL-12 in maintaining resistance to Leishmania major." J Immunol **168**(11): 5771-5777.

Park, B., M. M. Brinkmann, et al. (2008). "Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9." Nat Immunol **9**(12): 1407-1414.

Park, B., L. Buti, et al. (2011). "Granulin is a soluble cofactor for toll-like receptor 9 signaling." Immunity **34**(4): 505-513.

Parroche, P., F. N. Lauw, et al. (2007). "Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(6): 1919-1924.

Peacock, C. S., K. Seeger, et al. (2007). "Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease." Nat Genet **39**(7): 839-847.

Pearson, R. D. and R. T. Steigbigel (1980). "Mechanism of lethal effect of human serum upon Leishmania donovani." J Immunol **125**(5): 2195-2201.

Peters, N. C., J. G. Egen, et al. (2008). "*In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies." Science **321**(5891): 970-974.

Pisetsky, D. S. and C. F. Reich (2000). "Inhibition of murine macrophage IL-12 production by natural and synthetic DNA." Clin Immunol **96**(3): 198-204.

Prajeeth, C. K., S. Haerberlein, et al. (2011). "Leishmania-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity." Infect Immun **79**(7): 2699-2708.

Pratt, M. R., M. D. Sekedat, et al. (2009). "Direct measurement of cathepsin B activity in the cytosol

of apoptotic cells by an activity-based probe." Chem Biol **16**(9): 1001-1012.

Prina, E., C. Jouanne, et al. (1993). "Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes." J Immunol **151**(4): 2050-2061.

Prina, E., S. Z. Abdi, et al. (2004). "Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation." J Cell Sci **117**(Pt 2): 315-325.

Puentes, S. M., D. L. Sacks, et al. (1988). "Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan." J Exp Med **167**(3): 887-902.

Puentes, S. M., R. P. Da Silva, et al. (1990). "Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9." J Immunol **145**(12): 4311-4316.

Reiner, N. E., W. Ng, et al. (1988). "Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(12): 4330-4334.

Reiner, S. L., S. Zheng, et al. (1994). "*Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4⁺ T cells during initiation of infection." J Exp Med **179**(2): 447-456.

Remaley, A. T., D. B. Kuhns, et al. (1984). "Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O-2 production." J Biol Chem **259**(18): 11173-11175.

Ribeiro-Gomes, F. L., A. C. Otero, et al. (2004). "Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection." J Immunol **172**(7): 4454-4462.

Ribeiro-Gomes, F. L., M. C. Moniz-de-Souza, et al. (2007). "Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase." J Immunol **179**(6): 3988-3994.

Rintahaka, J., N. Lietzen, et al. (2011). "Recognition of cytoplasmic RNA results in cathepsin-dependent inflammasome activation and apoptosis in human macrophages." J Immunol **186**(5): 3085-3092.

Ritter, U., A. Meissner, et al. (2004). "CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis." Eur J Immunol **34**(6): 1542-1550.

Roberts, T. L., M. J. Sweet, et al. (2005). "Cutting edge: species-specific TLR9-mediated recognition of CpG and non-CpG phosphorothioate-modified oligonucleotides." J Immunol **174**(2):

605-608.

Rogers, K. A., G. K. DeKrey, et al. (2002). "Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*." FEMS Microbiol Lett **209**(1): 1-7.

Rogers, M. B., J. D. Hilley, et al. (2011). "Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*." Genome Res **21**(12): 2129-2142.

Ronet, C., H. Voigt, et al. (2008). "*Leishmania major*-specific B cells are necessary for Th2 cell development and susceptibility to *L. major* LV39 in BALB/c mice." J Immunol **180**(7): 4825-4835.

Rosenthal, L. A., F. S. Sutterwala, et al. (1996). "*Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion." Infect Immun **64**(6): 2206-2215.

Rothenfusser, S., V. Hornung, et al. (2001). "Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/-beta." Eur J Immunol **31**(12): 3525-3534.

Rutz, M., J. Metzger, et al. (2004). "Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner." Eur J Immunol **34**(9): 2541-2550.

Sadick, M. D., F. P. Heinzl, et al. (1990). "Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism." J Exp Med **171**(1): 115-127.

Samulowitz, U., M. Weber, et al. (2010). "A novel class of immune-stimulatory CpG oligodeoxynucleotides unifies high potency in type I interferon induction with preferred structural properties." Oligonucleotides **20**(2): 93-101.

Sanabria, M. X., D. A. Vargas-Inchaustegui, et al. (2008). "Role of natural killer cells in modulating dendritic cell responses to *Leishmania amazonensis* infection." Infect Immun **76**(11): 5100-5109.

Sanderson, S. J., G. D. Westrop, et al. (2003). "Functional conservation of a natural cysteine peptidase inhibitor in protozoan and bacterial pathogens." FEBS Lett **542**(1-3): 12-16.

Sasai, M., M. M. Linehan, et al. (2010). "Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3." Science **329**(5998): 1530-1534.

Scharton, T. M. and P. Scott (1993). "Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice." J Exp Med **178**(2): 567-577.

Scharton-Kersten, T., L. C. Afonso, et al. (1995). "IL-12 is required for natural killer cell activation

and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis." J Immunol **154**(10): 5320-5330.

Schleicher, U., J. Liese, et al. (2007). "NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs." J Exp Med **204**(4): 893-906.

Scott, P., P. Natovitz, et al. (1986). "B lymphocytes are required for the generation of T cells that mediate healing of cutaneous leishmaniasis." J Immunol **137**(3): 1017-1021.

Scott, P. (1991). "Host and parasite factors regulating the development of CD4⁺ T-cell subsets in experimental cutaneous leishmaniasis." Res Immunol **142**(1): 32-36.

Sepulveda, F. E., S. Maschalidi, et al. (2009). "Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells." Immunity **31**(5): 737-748.

Shakarian, A. M., M. B. Joshi, et al. (2003). "Members of a unique histidine acid phosphatase family are conserved amongst a group of primitive eukaryotic human pathogens." Mol Cell Biochem **245**(1-2): 31-41.

Sharma, S., R. B. DeOliveira, et al. (2011). "Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the Plasmodium falciparum genome." Immunity **35**(2): 194-207.

Shimosato, T., T. Kimura, et al. (2006). "Strong immunostimulatory activity of AT-oligodeoxynucleotide requires a six-base loop with a self-stabilized 5'-C...G-3' stem structure." Cell Microbiol **8**(3): 485-495.

Shirahama-Noda, K., A. Yamamoto, et al. (2003). "Biosynthetic processing of cathepsins and lysosomal degradation are abolished in asparaginyl endopeptidase-deficient mice." J Biol Chem **278**(35): 33194-33199.

Shoda, L. K., K. A. Kegerreis, et al. (2001). "DNA from protozoan parasites Babesia bovis, Trypanosoma cruzi, and T. brucei is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide." Infect Immun **69**(4): 2162-2171.

Shweash, M., H. Adrienne McGachy, et al. (2011). "Leishmania mexicana promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression." Mol Immunol **48**(15-16): 1800-1808.

Silverman, J. M., J. Clos, et al. (2010). "An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from Leishmania and communication with macrophages." J Cell Sci **123**(Pt 6): 842-852.

Silvestre, R., A. M. Silva, et al. (2009). "The contribution of Toll-like receptor 2 to the innate

recognition of a *Leishmania infantum* silent information regulator 2 protein." Immunology **128**(4): 484-499.

Simpson, A. G., J. R. Stevens, et al. (2006). "The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates." Trends Parasitol **22**(4): 168-174.

Skrzeczynska-Moncznik, J., A. Wlodarczyk, et al. (2012). "Secretory leukocyte proteinase inhibitor-competent DNA deposits are potent stimulators of plasmacytoid dendritic cells: implication for psoriasis." J Immunol **189**(4): 1611-1617.

Soong, L., J. C. Xu, et al. (1996). "Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection." Immunity **4**(3): 263-273.

Spath, G. F., L. Epstein, et al. (2000). "Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 9258-9263.

Spath, G. F., L. A. Garraway, et al. (2003). "The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9536-9541.

Srivastav, S., S. Kar, et al. (2012). "*Leishmania donovani* exploits host deubiquitinating enzyme A20, a negative regulator of TLR signaling, to subvert host immune response." J Immunol **189**(2): 924-934.

Stacey, K. J., M. J. Sweet, et al. (1996). "Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA." J Immunol **157**(5): 2116-2122.

Stacey, K. J., G. R. Young, et al. (2003). "The molecular basis for the lack of immunostimulatory activity of vertebrate DNA." J Immunol **170**(7): 3614-3620.

Steigerwald, M. and H. Moll (2005). "*Leishmania major* modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity." Infect Immun **73**(4): 2564-2567.

Suffia, I., S. K. Reckling, et al. (2005). "A role for CD103 in the retention of CD4⁺CD25⁺ Treg and control of *Leishmania major* infection." J Immunol **174**(9): 5444-5455.

Sun, S., C. Beard, et al. (1997). "Mitogenicity of DNA from different organisms for murine B cells." J Immunol **159**(7): 3119-3125.

Svensson, M., A. Maroof, et al. (2004). "Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells." Immunity **21**(6): 805-816.

- Swihart, K.,** U. Fruth, et al. (1995). "Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4⁺ T cell response." J Exp Med **181**(3): 961-971.
- Sypek, J. P.,** C. L. Chung, et al. (1993). "Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response." J Exp Med **177**(6): 1797-1802.
- Szabo, S. J.,** B. M. Sullivan, et al. (2002). "Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells." Science **295**(5553): 338-342.
- Tacchini-Cottier, F.,** C. Zweifel, et al. (2000). "An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4⁺ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*." J Immunol **165**(5): 2628-2636.
- Taggart, C. C.,** S. A. Cryan, et al. (2005). "Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF-kappaB binding sites in monocytes and inhibits p65 binding." J Exp Med **202**(12): 1659-1668.
- Takahashi, K.,** T. Shibata, et al. (2007). "A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses." J Exp Med **204**(12): 2963-2976.
- Tarr, P. I.,** R. F. Aline, Jr., et al. (1988). "LR1: a candidate RNA virus of *Leishmania*." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9572-9575.
- Thomas, B. N. and L. U. Buxbaum** (2008). "FcgammaRIII mediates immunoglobulin G-induced interleukin-10 and is required for chronic *Leishmania mexicana* lesions." Infect Immun **76**(2): 623-631.
- Tian, J.,** A. M. Avalos, et al. (2007). "Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE." Nat Immunol **8**(5): 487-496.
- Titus, R. G.,** G. K. DeKrey, et al. (2001). "Interleukin-6 deficiency influences cytokine expression in susceptible BALB mice infected with *Leishmania major* but does not alter the outcome of disease." Infect Immun **69**(8): 5189-5192.
- Trieu, A.,** T. L. Roberts, et al. (2006). "DNA motifs suppressing TLR9 responses." Crit Rev Immunol **26**(6): 527-544.
- Turco, S. J. and A. Descoteaux** (1992). "The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites." Annu Rev Microbiol **46**: 65-94.
- Uccellini, M. B.,** L. Busconi, et al. (2008). "Autoreactive B cells discriminate CpG-rich and CpG-poor DNA and this response is modulated by IFN-alpha." J Immunol **181**(9): 5875-5884.
- Ueno, N.,** C. L. Bratt, et al. (2009). "Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal

fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum* chagasi promastigotes." Cell Microbiol **11**(12): 1827-1841.

Ueno, N. and M. E. Wilson (2012). "Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival." Trends Parasitol **28**(8): 335-344.

Uzonna, J. E., K. L. Joyce, et al. (2004). "Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8⁺ T cells." J Exp Med **199**(11): 1559-1566.

Van Leeuwen, F., E. R. Wijsman, et al. (1996). "The telomeric GGGTTA repeats of *Trypanosoma brucei* contain the hypermodified base J in both strands." Nucleic Acids Res **24**(13): 2476-2482.

Van Leeuwen, F., E. R. Wijsman, et al. (1997). "Localization of the modified base J in telomeric VSG gene expression sites of *Trypanosoma brucei*." Genes Dev **11**(23): 3232-3241.

Van Luenen, H. G., C. Farris, et al. (2012). "Glucosylated hydroxymethyluracil, DNA base J, prevents transcriptional readthrough in *Leishmania*." Cell **150**(5): 909-921.

Van Zandbergen, G., N. Hermann, et al. (2002). "*Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes." Infect Immun **70**(8): 4177-4184.

Vargas-Inchaustegui, D. A., W. Tai, et al. (2009). "Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice." Infect Immun **77**(7): 2948-2956.

Verma, N. K. and C. S. Dey (2004). "Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*." Antimicrob Agents Chemother **48**(8): 3010-3015.

Vester, B., K. Muller, et al. (1999). "Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*." Infect Immun **67**(6): 3155-3159.

Vinet, A. F., M. Fukuda, et al. (2009). "The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V." PLoS Pathog **5**(10): e1000628.

Vollmer, J., R. Weeratna, et al. (2004). "Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities." Eur J Immunol **34**(1): 251-262.

Vollmer, J. and A. M. Krieg (2009). "Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists." Adv Drug Deliv Rev **61**(3): 195-204.

Von Stebut, E., Y. Belkaid, et al. (1998). "Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the

initiation of anti-Leishmania immunity." J Exp Med **188**(8): 1547-1552.

Wanderley, J. L., M. E. Moreira, et al. (2006). "Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts." J Immunol **176**(3): 1834-1839.

Wang, Z. E., S. L. Reiner, et al. (1993). "Targeted activation of CD8 cells and infection of beta 2-microglobulin-deficient mice fail to confirm a primary protective role for CD8 cells in experimental leishmaniasis." J Immunol **151**(4): 2077-2086.

Wei, X. Q., I. G. Charles, et al. (1995). "Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase." Nature **375**(6530): 408-411.

Weinkopff, T., A. Mariotto, et al. (2013). "Role of Toll-like receptor 9 signaling in experimental *Leishmania braziliensis* infection." Infect Immun **81**(5): 1575-1584.

Whitaker, S. M., M. Colmenares, et al. (2008). "*Leishmania pifanoi* proteoglycolipid complex P8 induces macrophage cytokine production through Toll-like receptor 4." Infect Immun **76**(5): 2149-2156.

Wiese, M. (1998). "A mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue of *Leishmania mexicana* is essential for parasite survival in the infected host." EMBO J **17**(9): 2619-2628.

Wilson, M. E. and R. D. Pearson (1988). "Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes." Infect Immun **56**(2): 363-369.

Woelbing, F., S. L. Kostka, et al. (2006). "Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity." J Exp Med **203**(1): 177-188.

Wright, S. D., L. S. Craigmyle, et al. (1983). "Fibronectin and serum amyloid P component stimulate C3b- and C3bi-mediated phagocytosis in cultured human monocytes." J Exp Med **158**(4): 1338-1343.

Wright, S. D. and S. C. Silverstein (1983). "Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes." J Exp Med **158**(6): 2016-2023.

Wyler, D. J., J. P. Sypek, et al. (1985). "*In vitro* parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: possible role of fibronectin in parasite attachment." Infect Immun **49**(2): 305-311.

Xin, L., K. Li, et al. (2008). "Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes." Mol Immunol **45**(12): 3371-3382.

Xu, D., H. Liu, et al. (2003). "CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress differentiation and functions

of Th1 and Th2 cells, *Leishmania major* infection, and colitis in mice." J Immunol **170**(1): 394-399.

Yamamoto, S., T. Yamamoto, et al. (1992). "Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated natural killer activity." J Immunol **148**(12): 4072-4076.

Yanai, H., T. Ban, et al. (2009). "HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses." Nature **462**(7269): 99-103.

Yarovinsky, F., D. Zhang, et al. (2005). "TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein." Science **308**(5728): 1626-1629.

Yasuda, K., M. Rutz, et al. (2006). "CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal translocation of "natural" phosphodiester DNA." Eur J Immunol **36**(2): 431-436.

Yasuda, K., P. Yu, et al. (2005). "Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways." J Immunol **174**(10): 6129-6136.

Yi, A. K., R. Tuetken, et al. (1998). "CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species." J Immunol **160**(10): 4755-4761.

Zhang, D., G. Zhang, et al. (2004). "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria." Science **303**(5663): 1522-1526.

Zhao, Q., S. Matson, et al. (1993). "Comparison of cellular binding and uptake of antisense phosphodiester, phosphorothioate, and mixed phosphorothioate and methylphosphonate oligonucleotides." Antisense Res Dev **3**(1): 53-66.

Zijlstra, E. E., A. M. Musa, et al. (2003). "Post-kala-azar dermal leishmaniasis." The Lancet Inf Dis **3**: 87-98.

Zimmermann, S., O. Egeter, et al. (1998). "CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis." J Immunol **160**(8): 3627-3630.

Zufferey, R., S. Allen, et al. (2003). "Ether phospholipids and glycosylinositolphospholipids are not required for amastigote virulence or for inhibition of macrophage activation by *Leishmania major*." J Biol Chem **278**(45): 44708-44718.

**Rôle de l'ADN dans l'activation du TLR9 lors de l'infection par *Leishmania major* :
Propriétés des séquences génomiques et implication des facteurs protéiques**

Résumé :

La plus grande sensibilité des souris TLR9^{-/-} a révélé le rôle de ce récepteur dans l'infection par *Leishmania major*. Les cellules dendritiques (DCs) sont activées de manière TLR9-dépendante par l'ADN du *L. major* et d'autres *Trypanosomatidae* et non par l'ADN de vertébré. La nature de l'ADN capable d'activer le TLR9 reste controversée quant à la séquence/charpente de l'ADN et l'implication de cofacteurs se liant avec le TLR9 ou l'ADN. Nous avons démontré l'importance de la séquence d'ADN. Contrairement aux génomes de parasites, l'ADN de vertébré présente une contre-sélection des motifs activateurs du TLR9 au profit des motifs inhibiteurs. De plus, l'activation du TLR9 par l'ADN du parasite est augmentée en présence de la protéine HMGB1, qui se fixe mieux sur l'ADN de parasite que de vertébré.

La maturation du TLR9 requiert un clivage protéolytique par des protéases endosomales, dont les cathepsines (Cat) B, S, L et l'asparagine endopeptidase (AEP) qui interviennent différemment dans les macrophages et les DCs. Après infection par *L. major*, nous avons montré que les souris AEP^{-/-}, CatS^{-/-} et CatL^{-/-} ont une pathologie identique aux souris WT, ce qui peut être dû à la redondance de leur fonction. Étonnamment, les souris CatB^{-/-} sont plus résistantes. Leurs lésions et la charge parasitaire dans les ganglions se résolvent plus rapidement, reflétant une réponse immune plus précoce et un contrôle plus rapide de la réaction inflammatoire.

En conclusion, ces résultats contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes permettant au TLR9 de discriminer entre l'ADN de pathogène et de vertébré et soulèvent le rôle non protecteur de la cathepsine B dans l'infection par *L. major*.

Mots-clés : *Leishmania major* – TLR9 – génome de *Trypanosomatidae* – génome de vertébré - HMGB1 – Cathepsine

**Rôle de l'ADN dans l'activation du TLR9 lors de l'infection par *Leishmania major* :
Propriétés des séquences génomiques et implication des facteurs protéiques**

Abstract :

As TLR9-deficient mice are more sensitive to *Leishmania major* infection, we have shown previously that TLR9 receptor mediates this parasite infection. Dendritic cells (DCs) are activated by *L. major* and other *Trypanosomatidae* DNA and not by vertebrate DNA.

There is an ongoing controversy concerning the properties of DNA required for TLR9 activation, regarding the DNA sequence or backbone or the implication of a cofactor interacting with TLR9 or DNA. We have established the importance of DNA sequences. In contrast to parasite genome, vertebrate genome have counter-selected stimulatory sequences and over-represented inhibitory motifs for TLR9. In addition, host proteins contribute to TLR9-dependent DC activation. HMGB1 enhances TLR9 activation only in the presence of *L. major* DNA and, surprisingly, HMGB1 binds more abundantly *L. major* than vertebrate DNA.

TLR9 activation requires a proteolytic cleavage by endosomal proteases, as cathepsins (Cat) B, S and L and asparagine endopeptidase (AEP) that have a differential activity in macrophages and DCs. After *L. major* infection, we have showed that AEP^{-/-}, CatS^{-/-} and CatL^{-/-} mice have a similar pathology than WT mice, likely due to their functionally redundant activities. In contrast, CatB^{-/-} mice are more resistant to the infection. Their lesion sizes and the parasite burdens in lymph nodes are significantly decreased, reflecting an earlier immune response and a more rapid control of the inflammatory response.

In conclusion, our results bring further insights into how TLR9 discriminates between *Trypanosomatidae* and vertebrate DNA and reveal a non protective role of cathepsin B in *L. major* infection.

Keywords : *Leishmania major* – TLR9 – *Trypanosomatidae* genome – vertebrate genome - HMGB1 – Cathepsin