

KARIMA EL FADILI

**ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES ET PROTÉOMIQUES DE
LA RÉSISTANCE À L'ANTIMOINE ET DE SON MODE
D'ACTION CHEZ LA FORME AMASTIGOTE DU PARASITE
*LEISHMANIA INFANTUM***

Thèse présentée
à la faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en microbiologie-immunologie
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUEBEC

2007

Résumé

L'émergence de souches de *Leishmania* résistantes aux traitements à base d'antimoine pentavalent représente un problème particulièrement critique. Une compréhension des mécanismes impliqués dans cette résistance est alors primordiale. Le mode d'action de l'antimoine n'est pas encore bien défini mais serait multifactoriel.

Dans le laboratoire, la résistance à l'antimoine chez *Leishmania* a été étudiée exclusivement chez la forme promastigote in vitro. Maintenant grâce à des souches amastigotes axéniques qui ont été développées dans notre laboratoire, l'étude de la résistance chez ce stade du parasite est devenue possible. Nous avons caractérisé une souche résistante amastigote axénique Sb2000.1 qui est résistante à SbIII. De plus la résistance est stable et Sb2000.1 montre une résistance croisée au pentostam à l'intérieur des macrophages.

Dans le but d'identifier les gènes dont l'expression serait modifiée chez le mutant Sb2000.1, nous avons utilisé la technique des puces à ADN. Nous avons détecté la surexpression du transporteur MRPA et du gène S-adénosylehomocysteine hydrolase enzyme impliquée dans la biosynthèse du trypanothion (TSH) chez le mutant SbIII axénique amastigote. Le niveau de la cystéine mesurer par HPLC a été trouvé augmenté chez le mutant Sb2000.1. La transfection de MRPA confère la résistance au Pentostam chez les parasites intracellulaires. Cette résistance due à MRPA a été altérée par le buthionine sulfoximine, l'inhibiteur spécifique de γ -glutamylcystéine synthase. Il s'agit de la première explication moléculaire d'un mécanisme de résistance à l'antimoine chez le stade amastigote via MRPA.

Ces résultats nous ont incités à faire une comparaison plus détaillée de ce mutant axénique amastigote en utilisant une technique protéomique comparative de gels 2D. Notre analyse nous a révélé l'expression différentielle de plusieurs protéines et une de ces protéines qui est sous-exprimée chez le mutant est kinetoplastid membrane protein 11. Le recours à la transfection ou à l'inactivation de KMP-11 chez l'isolat promastigote sensible montre que le rôle de KMP-11 est complexe.

Pour comprendre la contribution du macrophage dans le mode d'action de SbV contre *Leishmania*, nous avons étudié l'expression différentielle des gènes des cellules THP-1 traitées avec le Pentostam par les puces Affymetrix. L'analyse nous a suggéré l'implication de quelques gènes dans le mode d'action de SbV dont hème oxygénase.

À ma famille

Avant-propos

Remerciements

Premièrement, je tiens à remercier Dr Marc Ouellette qui m'a offert l'opportunité d'exécuter mes études graduées dans son laboratoire. Je le remercie tout particulièrement pour la grande confiance dont il m'a fait part ; à partir de mes premiers pas dans le monde de la recherche jusqu'à aujourd'hui. Il m'a toujours supporté dans mes projets en me laissant toute la latitude nécessaire dont j'avais besoin. Nos discussions m'ont permis d'entretenir un esprit critique et m'ont également beaucoup enseigné sur le fascinant monde de la recherche. Je retiens du Dr Marc Ouellette un être généreux, passionné, et aussi impressionnant de par sa grande culture, tant scientifique que générale.

Je remercie les Dr Laurence Lachaud, Dr Michel. J. Tremblay, Dr Jaques Corbeil et Dr Marc Ouellette qui ont examiné et corrigé cette thèse.

Je remercie ma sœur Amal et son mari Christoph pour leur présence, leur soutien et leur encouragement tout le long de mes études. Je leur souhaite tout le bonheur du monde avec ma belle nièce Sophia.

Merci également à tous les membres de l'équipe qui ont fait ce bout de chemin avec moi : Gaétan Roy ; Danielle Légaré ; Jolyne Drummelsmith ; Suzanne Avoine ; Nadine Messier ; Isabelle Girard ; Marie Christine Bretherton Philippe Leprohon, Amin. A. Ouamer, Wilfried Moreira, Larbi Dridi, Jean Michel Ubeda ; Jie Feng, Fani Fereshteh ; Angana Mukherjee et Gina Racine ainsi que tous ceux qui nous ont quittés et spécialement Hafid Soualhine et Vicky Brochu. Un remerciement spécial à Gaétan Roy pour son aide technique inestimable. Merci également à tous les autres membres du centre de Recherche in Infectiologie pour leur chaleureuse compagnie.

Je remercie également tous les gens qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation des travaux de recherche de cette thèse. Une pensée spéciale à l'organisme qui m'a supporté financièrement pendant ces années : Institut de Recherche en Santé du Canada (IRSC).

Je tiens spécialement à remercier mes parents Mohamed et Zahra, mes sœurs Aïcha, Amal et Mouna, mon frère Imad, mes deux nièces préférées Oumaima et Sophia et mon neveu Taha. Ils sont les premiers responsables de la réussite de mes études, tout d'abord en me donnant la chance de faire des études et par la suite en me poussant à aller jusqu'au bout malgré la distance qui nous sépare.

Un grand merci à Yasser, qui comprend tellement ce que je vis. Il a été d'un support incroyable durant la durée de la rédaction de ma thèse, avec ses compliments, et ces mots doux. Il est mon réconfort dans les moments de doute. Il est toujours présent pour moi, à chaque instant de ma vie. Merci, merci, merci...

Finalement je dédie cette thèse à tous les membres de ma famille, je vous remercie infiniment pour votre soutien, présence et la confiance que vous avez su me redonner, c'est grâce à vous que cette thèse voit son aboutissement, merci pour tout.

Contributions

La présente thèse est produite sous forme de thèse-article. Conséquemment, elle inclut de façon intégrale un article publié, et deux autres qui vont être soumis dans des journaux scientifiques. La publication de ces derniers en langue anglaise justifie la nature bilingue de cette thèse. De plus, la contribution détaillée de chacun des auteurs à la réalisation de nos travaux de recherche est explicitement décrite pour chacun des chapitres.

Chapitre II

Karima El Fadili, Nadine Messier, Philippe Leprohon, Gaétan Roy, Chantal Guimond, Nathalie Trudel, Nancy G. Saravia, Barbara Papadopoulou, Danielle Légaré and Marc Ouellette. The role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. Publié dans Antimicrob Agents Chemother. 2005 May; 49(5):1988-93

J'ai réalisé la grande partie des expériences présentées dans ce chapitre. La caractérisation du mutant et la génération du révertant ont été effectués en totalité par moi-même ainsi que la préparation des échantillons pour les puces à ADN et les analyses par Northern, Southern et HPLC. L'expérience des puces à ADN ainsi que l'analyse ont été effectués par moi-même sous la supervision de Nathalie Trudel. La microscopie confocale a été faite par Philippe Leprohon. L'HPLC par Gaétan Roy. Toutes les expériences des infections ont été effectuées par Nadine Messier sous ma direction. L'analyse des résultats et la rédaction de l'article ont été effectués sous la supervision de mon directeur de recherche.

Chapitre III

Karima El Fadili, Jolyne Drummelsmith, Isabelle Girard, Gaétan Roy, Armando Jardim and Marc Ouellette. Down regulation of KMP-11 in *Leishmania infantum* axenic antimony resistant amastigotes as revealed by a proteomic screen. En voie de soumission

J'ai réalisé la grande partie des expériences présentées dans ce chapitre. La caractérisation du mutant et la génération du révertant ont été effectués en totalité par moi-même. La préparation des échantillons pour gels 2D a été effectuée par Gaétan Roy. La migration des échantillons par Vicky Brochu. La coloration, le scan et l'analyse avec l'aide d'Isabelle Girard et Jolyne Drummelsmith. Toutes les expériences de transfections, d'inactivation, de Western, Southern et Northern blot ont été effectuées par moi-même. L'analyse des résultats et la rédaction de l'article ont été effectués sous la supervision de mon directeur de recherche.

Chapitre IV

Karima El Fadili, Michaël Imbeault, Nadine Messier, Gaétan Roy, Benjamin Gourbal, Marc Bergeron, Michel J Tremblay, Danielle Légaré and Marc Ouellette.

J'ai réalisé la quasi totalité des expériences présentées dans ce chapitre. La préparation des échantillons pour les puces à ADN et les analyses Western et HPLC ont été effectués en totalité par moi-même. L'expérience des puces à Affymetrix a été effectuée en totalité par moi-même. L'analyse des résultats des puces a été effectuée avec l'aide de Michael Imbeault. L'HPLC par Gaétan Roy. Toutes les expériences des infections ont été effectuées par moi-même. Les cellules MDMs nous ont été procurées par Marc Bergeron. Les expériences faisant appel à la technique du PCR à temps réel ont été effectuées en totalité par moi-même. L'analyse des résultats et la rédaction de l'article ont été effectuées sous la supervision de mon directeur de recherche.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	I
AVANT-PROPOS	III
REMERCIEMENTS	III
CONTRIBUTIONS	V
TABLE DES MATIÈRES	VIII
Liste des tableaux	X
Liste des figures	XI
CHAPITRE I	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1. LE PARASITE LEISHMANIA.....	2
1.1. <i>Taxonomie</i>	2
1.2. <i>Le cycle de vie</i>	4
1.3. <i>Épidémiologie</i>	7
1.4. <i>Traitements</i>	12
2. MÉCANISMES DE RÉSISTANCE À L'ANTIMOINE.....	20
2.1. <i>Généralités</i>	20
2.2. <i>La résistance aux métaux</i>	26
3. RÉSISTANCE À L'ANTIMOINE CHEZ LEISHMANIA.....	33
3.1. <i>Pénétration intracellulaire de l'antimoine</i>	37
3.2. <i>Réduction du métal</i>	38
3.3. <i>Efflux du médicament</i>	40
3.4. <i>Métabolisme des thiols</i>	42
3.5. <i>Autres mécanismes de résistance</i>	46
4. L'APPORT DES TECHNIQUES GÉNOMIQUES ET PROTÉOMIQUES POUR L'ÉTUDE DE LA RÉSISTANCE.....	47
5. OBJECTIFS.....	50
CHAPITRE II	52
THE ROLE OF THE ABC TRANSPORTER MRPA (PGPA) IN ANTIMONY RESISTANCE IN LEISHMANIA INFANTUM AXENIC AND INTRACELLULAR AMASTIGOTES	52
RÉSUMÉ.....	53
ABSTRACT.....	55
INTRODUCTION.....	56
MATERIALS AND METHODS.....	58
RESULTS.....	60
DISCUSSION.....	63
ACKNOWLEDGEMENTS.....	65
REFERENCES.....	66
CHAPITRE III	76
DOWN REGULATION OF KMP-11 IN LEISHMANIA INFANTUM AXENIC ANTIMONY RESISTANT AMASTIGOTES AS REVEALED BY A PROTEOMIC SCREEN	76
RÉSUMÉ.....	77
ABSTRACT.....	79
INTRODUCTION.....	80
MATERIALS AND METHODS.....	82
RESULTS.....	86
DISCUSSION.....	89

ACKNOWLEDGMENTS	91
REFERENCES	92
CHAPITRE IV.....	106
MODULATION OF GENE EXPRESSION IN HUMAN MACROPHAGES TREATED WITH THE ANTI- LEISHMANIA PENTAVALENT ANTIMONIAL DRUG PENTOSTAM.....	106
RÉSUMÉ	107
ABSTRACT.....	109
INTRODUCTION	110
MATERIAL AND METHODS	112
RESULTS	115
DISCUSSION.....	119
ACKNOWLEDGMENTS	123
REFERENCES	124
CHAPITRE V	143
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	143
V.1. DISCUSSION	144
V.1.1. <i>Caractérisation du phénotype de résistance chez le mutant L. infantum amastigote axénique Sb2000.1</i>	145
V.1.2. <i>Étude de la résistance par puces à ADN chez le mutant L. infantum amastigote axénique Sb2000.1 ...</i>	145
V.1.3. <i>Analyses protéomiques de la résistance chez le mutant amastigote axénique L. infantum Sb2000.1 ...</i>	150
V.1.4. <i>Mode d'action de l'antimoine pentavalent à l'intérieur du macrophage</i>	152
V.2. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	156
BIBLIOGRAPHIE.....	158

Liste des tableaux

Tableau 1. Les différents médicaments utilisés pour la leishmaniose.

Liste des figures

Figure 1. Taxonomie de *Leishmania*

Figure 2. Les deux formes morphologiques du parasite *Leishmania*.

Figure 3. Diagramme schématique du cycle de vie du parasite *Leishmania*.

Figure 4. Distribution géographique des leishmanioses cutanées, mucocutanées et viscérales.

Figure 5. Structure des principaux médicaments utilisés contre les leishmanioses.

Figure 6. Principaux mécanismes de résistance aux médicaments.

Figure 7. Les trois différents transporteurs impliqués dans l'export de As et Sb.

Figure 8. Mécanismes de résistance à l'arsenate et à l'arsénite chez *E. coli*, *S. cerevisiae* et les mammifères.

Figure 9. Les différentes voies de signalisation provoquées par les métalloïdes.

Figure 10. Représentation schématique du mécanisme proposé de la résistance à l'antimoine chez le parasite *Leishmania*.

Figure 11. Tableau périodique partiel.

Figure 12. Voie de biosynthèse du trypanothion chez *Leishmania*.

Liste des abréviations

ABC	ATP binding cassette
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNi	RNA interference (RNAi)
BSO	L-buthionine-(SR)-sulfoximine
BT1	transporteur de la biopérine 1
cMOAT	canicular multispecific organic anion transporter
DFMO	DL- α -Difluorométhyl-ornithine
DHFR	dihydrofolate réductase
DHFR-TS	dihydrofolate réductase - thymidylate synthase
DNP	2,4-dinitrophénol
ERK	extracellular signal regulated kinase
γ -GCS	γ -glutamylcystéine synthase
GS	glutathion synthase
GSH	glutathion
GST	glutathion-S-transférase
HTM1	homologous to mannosidase I
LPG	lipophosphoglycan
MAPKs	mitogen-activated protein kinases
MRP	multidrug resistance-associated protein
MTX	méthotrexate
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NER	réparation par excision de nucléotides
ODC	ornitine décarboxylase
PTPase	protéine tyrosine phosphatase
PTR1	ptérine réductase 1
SbV	antimoine pentavalent
SHP-1	Src homology PTPase
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1

Tet	tetracycline (tet) resistance genes
TSH	trypanothion
YCF1	Yeast cadmium factor

Chapitre I

Introduction générale

1. LE PARASITE *LEISHMANIA*

1.1. Taxonomie

Le parasite *Leishmania* fut découvert par Sir William Leishman en 1900 dans des frottis de la rate d'un soldat mort de fièvre à Dum-Dum en Inde. Alors qu'il publiait ses résultats en 1903, Charles Donovan identifia le même parasite dans une biopsie de rate. Le parasite fut nommé *Leishmania donovani* en leur honneur et la forme amastigote du parasite est communément appelée corps de Leishman-Donovan (233). Ce protozoaire flagellé est transmis par un vecteur arthropode, la mouche des sables ou phlébotome et infecte les vertébrés, principalement les mammifères, dont l'humain. Il est du phylum Euglenozoa, sous-phylum Kinetoplasta, de la classe des Trypanosomatida, de l'ordre des Trypanosomatida et de la famille des Trypanosomatidae (selon (54, 127, 233)). Bien qu'il n'y ait qu'un genre appelé *Leishmania*, on différencie deux sous-genres, *Leishmania* et *Viannia*, selon que le parasite se développe dans la partie centrale ou postérieure de l'intestin du vecteur respectivement. La taxonomie du genre *Leishmania* est très complexe (Fig.1). Impossibles à différencier par leur morphologie, les *Leishmania* ont nécessité pour leur identification l'utilisation de critères extrinsèques (forme clinique, distribution géographique, nature de l'hôte), puis de critères intrinsèques (phénotypiques ou génotypiques). L'identification par électrophorèse des isoenzymes, pratiquée depuis 1981, représente encore à l'heure actuelle la technique de choix, même si les méthodes moléculaires tendent à se développer.

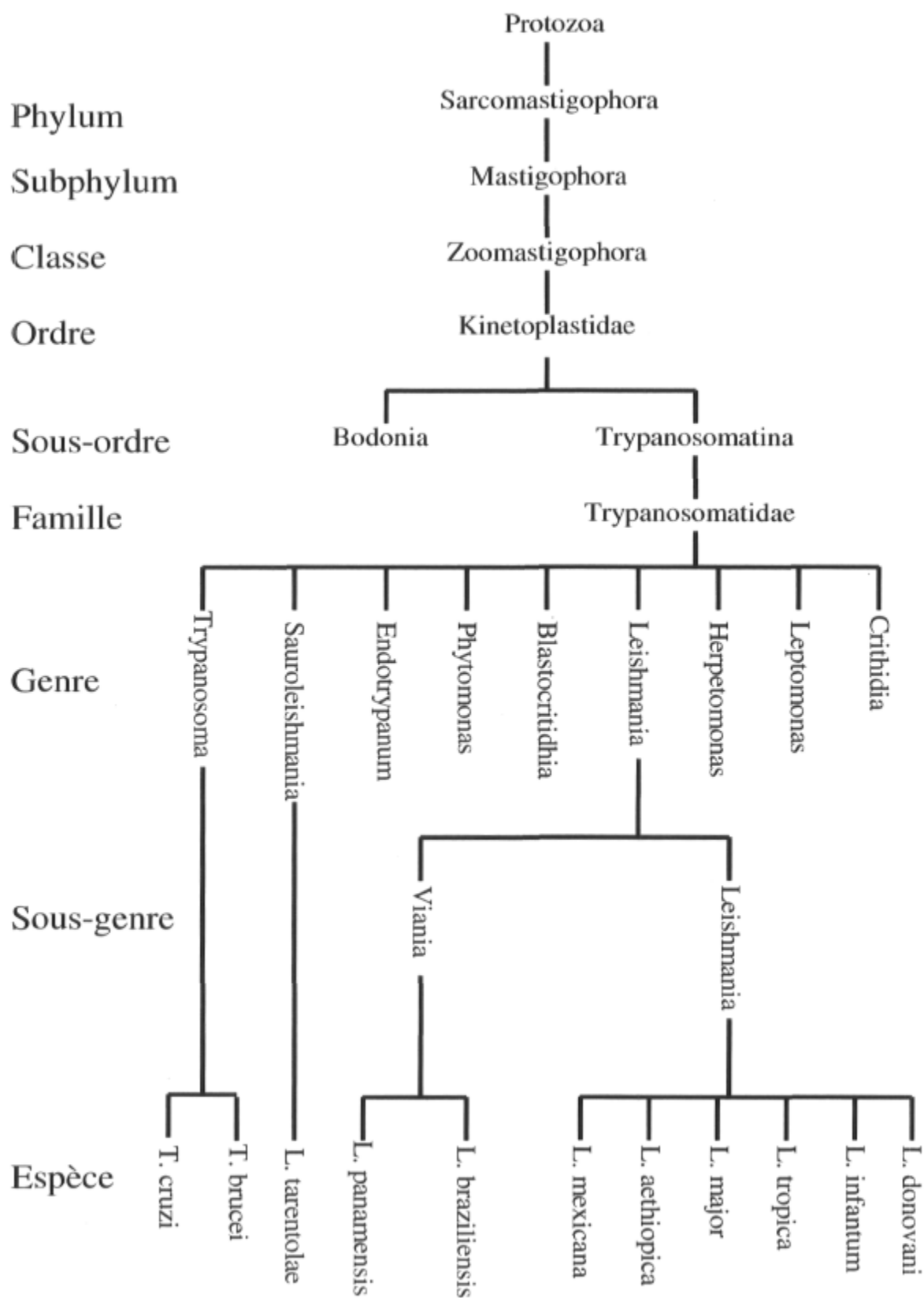


Figure 1. Taxonomie de Leishmania.

1.2. Le cycle de vie

Le parasite *Leishmania* se présente sous deux formes principales, soit promastigote et amastigote (Fig.2) qui nécessite deux hôtes la mouche des sables et un mammifère. Son cycle de vie est dimorphique (Fig.3). Le stade amastigote est un petit corpuscule arrondi ou ovalaire de 2 à 6 μm de diamètre, possédant un noyau, un kinétoplaste et un flagelle interne. L'amastigote est situé à l'intérieur des cellules du système de phagocytes mononuclés du vertébré mammifère dans un milieu hostile avec une température de 32 à 37 °C et un pH variant de 4,5 à 6,0. Le stade promastigote à corps long (15-25 μm) et mince (2 μm), avec un noyau central, un kinétoplaste et un long flagelle libre antérieur. Ce stade flagellé est libre dans le tube digestif du phlébotome vecteur où l'environnement est neutre ou légèrement alcalin (pH 7,0-7,5).

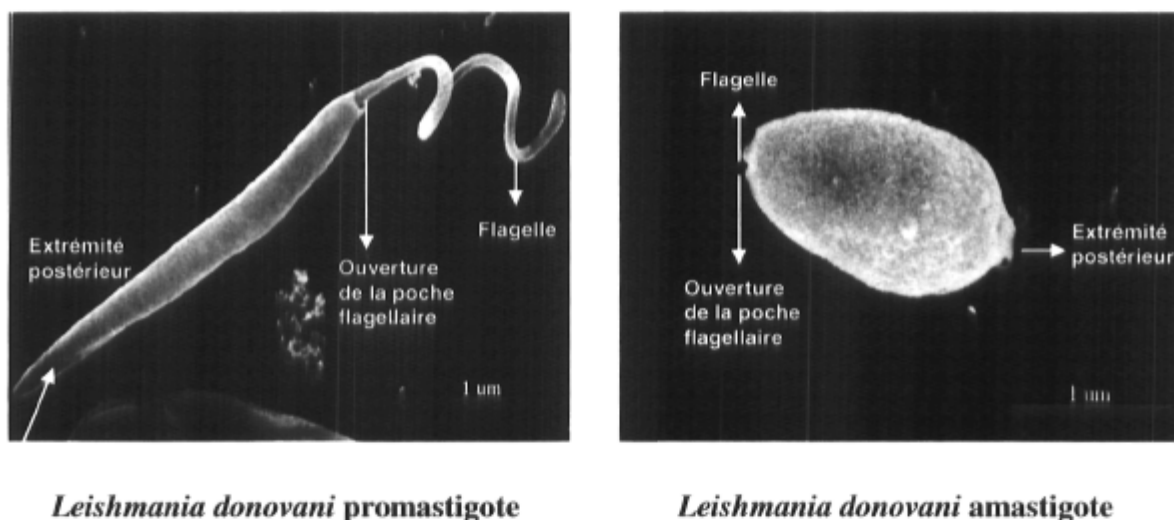


Figure 2. Les deux formes morphologiques du parasite *Leishmania*. La forme promastigote est flagellée, extracellulaire et se développe chez l'insecte vecteur. La forme amastigote est non flagellée, sphérique et intracellulaire

(http://www.hhmi.ucla.edu/parasite_course/leish_files/introduction1.htm)

Le cycle évolutif du parasite correspond au passage alterné du vecteur (stade promastigote) au vertébré (stade amastigote) (Fig.3). Ce passage induit l'expression de plusieurs gènes stade-spécifiques (130, 162, 163, 187) favorisant les changements morphologiques et biochimiques nécessaires, ainsi qu'une réponse au stress impliquant notamment des protéines de choc thermique (106).

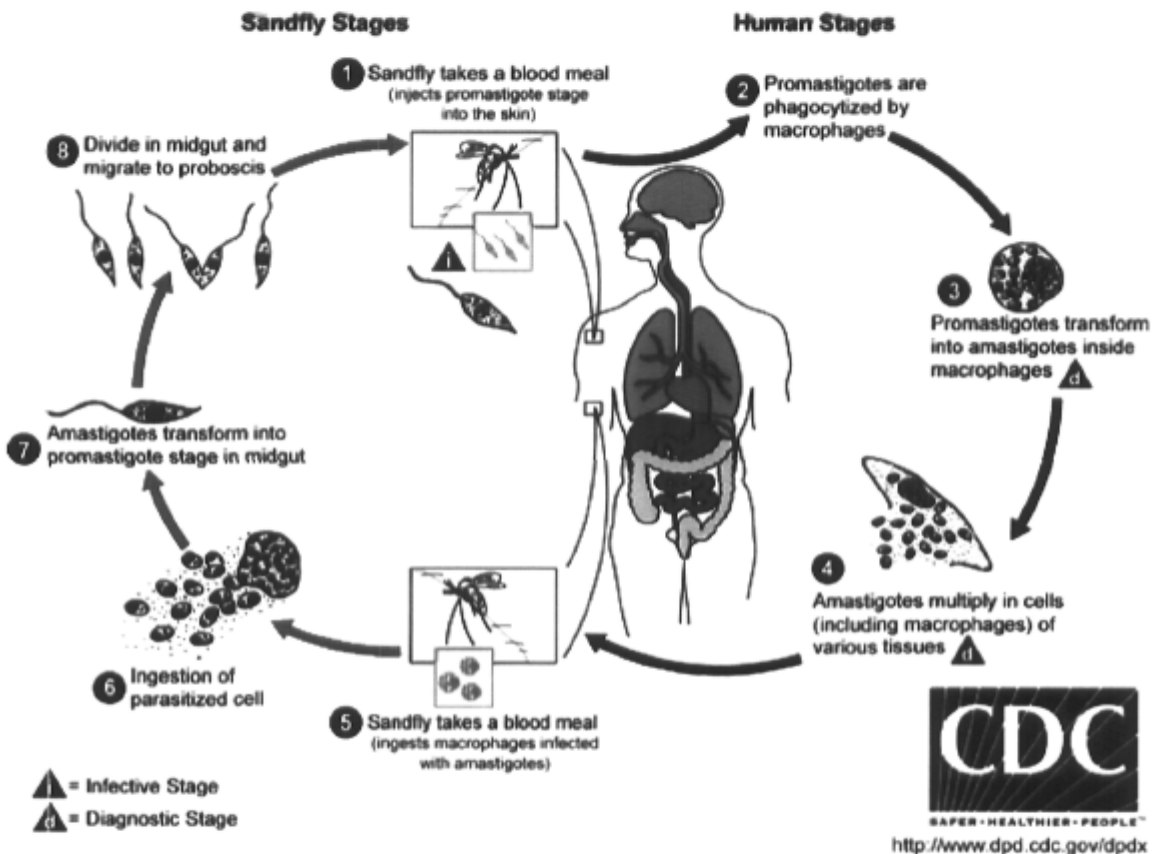


Figure 3. Diagramme schématisé du cycle de vie du parasite *Leishmania*. Il est digénétique, alternant entre deux stades morphologiquement distincts soit la forme promastigote chez l'insecte (partie gauche) et la forme amastigote chez l'hôte vertébré (partie droite).

(<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>)

Les promastigotes métacycliques, virulents, sont inoculés dans la peau des sujets à l'occasion de la piqûre du phlébotome. La multiplication intracellulaire des amastigotes reste en général localisée aux macrophages et aux cellules dendritiques du site d'inoculation, et entraîne le développement d'une lésion cutanée localisée. Dans d'autres cas, les parasites diffusent à l'ensemble des organes du système des phagocytes mononuclées, donnant lieu à la leishmaniose viscérale. Plus rarement, les parasites peuvent être transportés aux ganglions lymphatiques drainants et diffusés à d'autres sites cutanés comme dans la leishmaniose cutanée diffuse (LCD), éventualité rare en général liée à un défaut de l'immunité cellulaire de l'hôte.

Lorsqu'une mouche des sables femelle (le phlébotome) infectée prend un repas sanguin chez un hôte mammifère, elle salive au site de piqûre et régurgite par la même occasion le parasite sous sa forme promastigote. Il est alors allongé et très mobile grâce à un flagelle situé en position antérieure. *Leishmania* infecte ensuite un phagocyte (principalement les monocytes/macrophages (MØ)) du système réticulo-endothélial et se transforme en amastigote. Cette transformation se produit dans un environnement acide suite à la fusion du phagosome contenant le parasite avec le lysosome où le pH est acide, ce qui forme un phagolysosome. Le parasite devient ovoïde ou sphérique, de 2.5 à 5 µm de diamètre avec un très court flagelle et n'est plus motile. S'en suit une multiplication du parasite par fission binaire dans le phagolysosome du phagocyte qui est finalement lysé. Les parasites ainsi libérés sont phagocytés par des cellules avoisinantes où le processus se poursuit. Le cycle est complété lorsqu'une mouche prend un repas sanguin au site d'infection et aspire des phagocytes contenant *Leishmania*. De retour dans le tube digestif de l'arthropode, les parasites se différencient à nouveau en promastigotes après 12 à 18 heures.

Les différents stades du parasite *Leishmania* peuvent être identifiés selon leur morphologie ou leur emplacement dans le tube digestif du vecteur mais également selon les molécules qui composent leur surface. Les promastigotes sont recouverts d'un glycocalyx variant entre 7nm chez les procycliques et 17nm pour les métacycliques alors que les amastigotes en sont presque complètement dépourvus (225). Ce manteau est constitué de composés glycosylés et de protéines ayant tous une ancre de glycosylphosphatidylinositol (GPI).

Chez les promastigotes, la molécule de surface la plus abondante est le lipophosphoglycan (LPG). Sa structure varie d'une espèce de *Leishmania* à l'autre mais est principalement composée d'unités répétées d'un disaccharide et d'un phosphate suivant l'ancre GPI. Les espèces se différencient par la présence de chaînes latérales de glycans, ainsi que par la composition et la situation de celles-ci sur la structure de base du LPG. Le LPG de *L. major*, par exemple, est très ramifié alors que celui de *L. donovani* ne l'est pas (183). Cette molécule de surface est très importante dans l'infection des mouches des sables et joue un rôle dans l'interaction avec les MØ de l'hôte mammifère. La deuxième molécule en importance chez le promastigote est la glycoprotéine gp63. C'est une métalloprotéinase qui requiert la présence de zinc et qui a une grande variété de substrats tels la caséine, la gélatine, l'albumine, l'hémoglobine et le fibrinogène (185). Elle est environ 10 fois moins abondante que le LPG mais tout comme lui, elle recouvre l'entière surface du parasite. Étant moins abondante, la gp63 semble ensevelie sous le LPG (183). Une autre classe de glycolipides ayant une ancre GPI est le phospholipide de glycosylinositol (GIPL). Ces molécules sont 10 fois plus abondantes que le LPG et de petit poids moléculaire (182). Ayant une longue demi-vie, elles joueraient un rôle de protection de la surface du promastigote puisque le LPG est éliminé continuellement (226). Il existe également d'autres protéines de surface du parasite comme celles du complexe gp46/PSA-2 qui possèdent une ancre GPI. Finalement, certaines molécules peuvent être sécrétées par le parasite telles les phosphatases acides et les protéophosphoglycans (PPG). Les phosphatases acides sont des enzymes hydrolytiques qui semblent jouer un rôle dans la résistance du parasite aux réponses de son hôte de même que dans sa pathogénicité et sa nutrition (172). Par contre, on ne les retrouve pas chez *L. major* (173).

Pour ce qui est des molécules retrouvées à la surface des amastigotes, on observe deux différences majeures : une diminution marquée de l'expression du LPG (182) et une diminution (moindre que celle du LPG) de la gp63 (249).

1.3 Épidémiologie

Les leishmanioses représentent un enjeu important en santé publique. Les éléments fondamentaux de la pathogénicité des *Leishmania* résident dans leur faculté de survie à l'intérieur

des macrophages non activés, et leur diffusion dans les éléments du système des phagocytes mononuclés. Tout défaut d'activation des macrophages lié à l'immunodépression entraîne l'installation des parasites et favorise le développement de l'infection en provoquant soit le déclenchement d'une infection, soit l'aggravation d'une forme évolutive. Aussi les leishmanioses sont-elles de plus en plus fréquemment associées à un déficit acquis ou induit du système immunitaire. Toutes les causes d'immunodépression, qu'elles soient d'origine infectieuse ou iatrogène favorisent le développement des leishmanioses, en particulier de la leishmaniose viscérale. Dans les foyers d'endémie, le nombre d'infections inapparentes à *Leishmania* est très nettement supérieur au nombre de cas cliniques détectés. D'où le risque d'extension et d'augmentation de l'endémicité relié à l'augmentation des causes d'immunodépression.

Leishmania est une parasitose des zones intertropicales (hormis l'Océanie) et tempérées chaudes (Fig. 4), signalée dans 88 pays avec approximativement 400.000 nouveaux cas par an (13) répartis en 6 foyers : Méditerranéen, moyen orient, chinois, indien, africain et centre- et sud-américain. La prévalence de la maladie est estimée à 12 millions et l'incidence à 2 millions (1.5 millions de leishmanioses cutanées dont 90% en Algérie, Afghanistan, Arabie Saoudite, Brésil, Iran, Pérou, Syrie et 500.000 leishmanioses viscérales dont 90% en Inde, Népal, Bangladesh, Brésil et le Soudan (79).

L'association de la Leishmaniose avec le VIH a été aussi rapportée dans 35 pays, avec la plupart des cas dans l'Europe du sud, où 25-70% des patients adultes atteints de la leishmaniose viscérale (LV) sont co-infectés par le VIH (79). Il a été estimé que 1.5-9% des patients infectés par le VIH vont développer la *Leishmaniose*. Les interactions des deux maladies aggravent chacune d'elles en accélérant l'apparition du SIDA et en raccourcissant l'espérance de vie des personnes infectées par le VIH (107, 206, 297).



Figure 4. Distribution géographique des leishmanioses cutanées, mucocutanées et viscérales (124).

De plus, l'attention a été attirée par un certain nombre de cas survenant suite à des transplantations d'organes (23). Cette dernière observation est d'autant plus préoccupante que les transplantations d'organes tendent à se multiplier dans les pays d'Europe, en particulier la transplantation rénale.

L'épidémiologie est très diverse: 20 espèces de *Leishmania* sont pathogènes pour l'homme, et 30 espèces de la mouche des sables peuvent servir de vecteurs. Il y a 2 entités épidémiologiques:

- ❖ Zoonotique, où l'animal est le réservoir et est impliqué dans le cycle de la transmission.
- ❖ Anthroponotique, où l'homme constitue le réservoir de l'infection. Pour contrôler l'infection, la priorité a été accordée aux foyers anthroponotiques et ces foyers sont la source de sévères LV épidémiques.

La localisation du parasite dans les divers organes du patient est directement liée au tropisme des espèces de *Leishmania*. On peut globalement distinguer 3 types de la leishmaniose :

La leishmaniose viscérale (LV), appelée également *kala azar*, est la forme la plus grave de la maladie, avec une mortalité de presque 100% en l'absence de traitement. La forme viscérale de la maladie est causée par différents complexes dont *L. donovani* dans le sub-continent indien et en Afrique de l'Est et *L. infantum* dans le bassin méditerranéen (*L. infantum*) et dans le Nouveau Monde (*L. chagasi*) (115). Cette forme ne se présente pas par un ulcère cutané. En effet, les parasites injectés lors du repas sanguin du phlébotome sont ingérés par les phagocytes du système réticulo-endothélial mais ne restent pas au site de piqûre. Ils migrent plutôt vers les organes lymphoïdes tels le foie, la rate et la moelle osseuse via les systèmes sanguin et lymphatique. La période d'incubation est d'une durée variable mais prend habituellement de 2 à 4 mois. Les symptômes sont la fièvre, les frissons, la nausée, l'œdème facial, le saignement des muqueuses, la diarrhée et les difficultés respiratoires. La diminution du nombre de phagocytes due à l'infection provoque la surproduction de phagocytes au détriment de la production de globules rouges dans la rate et la moelle, ce qui entraîne l'anémie et l'émaciation. À l'opposé, le foie et la rate augmentent en volume (hépatosplénomégalie). La mort survient chez les patients

non-traités de 6 mois à quelques années suivant l'infection. La mort peut également être causée par des infections secondaires que le corps affaibli ne peut contrôler.

La leishmaniose mucocutanée (LM), appelée espundia est principalement causée par le complexe *L. braziliensis* et se retrouve partout entre le centre du Mexique et le nord de l'Argentine en excluant les régions montagneuses (sauf le versant sud des Andes). Les manifestations cliniques peuvent varier d'une région à l'autre mais de façon générale, une petite papule rouge apparaît au site de piqûre et se transforme en ulcère comme pour la leishmaniose cutanée ou alors, comme au Vénézuéla et au Paraguay, les lésions sont plutôt plates, ulcérées et suintantes. Cette première lésion finit par se résorber mais l'infection se propage à des zones mucocutanées telle la région nasopharyngée. Cette seconde infection peut s'installer avant la guérison de la première lésion ou apparaître plusieurs années plus tard. On observe alors une dégénérescence des tissus avec une possibilité de nécrose ou d'infections bactériennes. Le tout peut engendrer une grande difformité due à la perte des lèvres, nez, palais et pharynx des patients avec parfois une atteinte du larynx et de la trachée qui résulte en la perte de la voix. La mort du patient peut également survenir à cause d'infections secondaires ou de problèmes respiratoires (233).

La Leishmaniose cutanée (LC), dans l'Ancien Monde, la forme cutanée de la maladie était autrefois appelée bouton d'Orient, furoncle de Jéricho, d'Aleppo et de Delhi. Elle est principalement due aux complexes *L. tropica* et *L. major* et se retrouve en Afrique de l'Ouest, au Moyen-Orient et de l'Asie mineure jusqu'en Inde. Le complexe *L. mexicana* (233) et *L. peruviana* (complexe *L. braziliensis*) (9) causent la leishmaniose cutanée dans le Nouveau Monde, principalement dans le sud de l'Amérique du Nord (Texas et Mexique), en Amérique centrale, au Vénézuéla, au Pérou, dans le bassin amazonien et au Brésil. La période d'incubation peut durer de quelques jours à plusieurs mois. Puis, une petite papule rouge apparaît au site de piqûre. Elle se développe habituellement en ulcère qui se propage sous une mince croûte. D'autres lésions peuvent se former et s'unir pour provoquer un ulcère de grande dimension. Le tout se résorbe généralement de lui-même après quelques mois voir un an. Il reste malheureusement une cicatrice sous forme de dépression non-pigmentée. Les espèces de *Leishmania* peuvent causer des lésions cutanées de différentes formes et envergures. Une forme

particulière est la forme pseudospirotrichosique lymphangitique, forme à dissémination lymphatique, due à *L. braziliensis*, mais aussi à *L. major* (Tunisie), qui doit être différencier de la sporotrichose. La leishmaniose cutanée chez les patients infectés par le VIH est rare et caractérisée par son polymorphisme clinique : forme cutanée diffuse; autres aspects : formes papuleuses en nappes diffuses ou disséminées, formes ulcérées, formes pseudo-lépromateuses. Dans le cas de *L. mexicana*, les lésions guérissent spontanément sauf lors d'une infection de l'oreille. La faible irrigation du cartilage de l'oreille fait en sorte que la réponse immunitaire y est faible et les lésions deviennent alors chroniques et durent plusieurs années (certaines datent de 40 ans). Finalement, l'immunité acquise suite au traitement ou à la résorption naturelle de la leishmaniose cutanée de l'Ancien Monde semble presque parfaite. C'est pourquoi certains habitants des régions endémiques ont l'habitude d'infecter leurs enfants sur une région cachée par les vêtements afin d'éviter les cicatrices au visage ou sur d'autres parties exposées de leur anatomie (233).

1.4 Traitements

L'absence de vaccins et les difficultés liées au contrôle du vecteur du parasite font que la seule approche thérapeutique repose actuellement sur la chimiothérapie. Les molécules utilisées de nos jours possèdent cependant de nombreuses limitations de part leur coût et leur toxicité, mais aussi de part l'émergence de phénomènes de résistance à travers le monde, principalement à l'antimoine qui reste la molécule principale pour traiter la leishmaniose depuis près de 70 ans. Trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour développer des nouveaux médicaments est donc crucial pour ces parasitoses que l'OMS classe désormais parmi les infections prioritaires (catégorie 1 : infections réémergentes ou incontrôlées).

Les médicaments de choix utilisés aujourd'hui (Tableau 1 et Fig.5) sont parfois les mêmes composés utilisés depuis 1900 et leurs mécanismes d'action ne sont pas complètement connus. Ils sont tous très toxiques et les patients doivent être bien suivis au cours du traitement.

Type de leishmaniose	Statut du médicament	Médicament
Viscérale	Première indication	Sodium stibogluconate (Pentostam); antimoine de méglumine (Glucantime) Amphotéricine B (Fungizone) Amphotéricine B liposomale (AmBisome) Pentamidine
	Essais cliniques	Miltefosine (oral, phase IV) Paromomycine (phase III) Sitamaquine (oral, phase II) Autres formules d' amphotericine B
Cutanée	Première indication	Sodium stibogluconate (Pentostam); antimoine de méglumine (Glucantime) Amphotéricine B (Fungizone) Pentamidine Paromomycine (formules topiques avec chlorure de méthylbenzethonium ou urée)
	Essais cliniques	Miltefosine (oral, phase III; inscrit en Colombia in 2005) Paromomycine (formules topiques avec gentamicine et surfactants, phase II) Imiquimod (immunomodulateur topique, phase II) Azoles antifongiques (ketoconazole, fluconazole, itraconazole)

Tableau 1. Les différents médicaments utilisés pour la leishmaniose. (67)

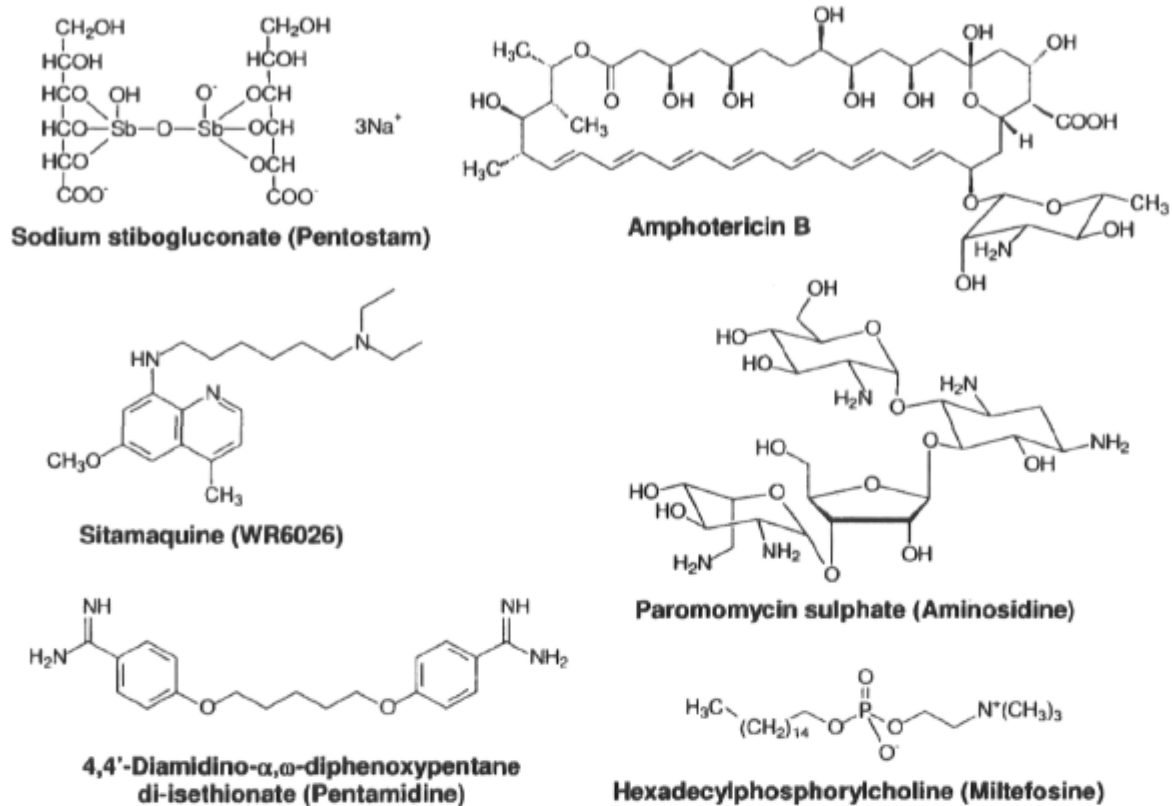


Figure 5. Structure des principaux médicaments utilisés contre les leishmanioses. (67).

1.4.1. Antimoniés pentavalent

Les premiers médicaments utilisés dans le traitement des différentes formes de leishmanioses sont composés d'antimoine pentavalent qui sont encore largement utilisés de nos jours. Déjà, en 1905, le tartrate de sodium et de potassium antimoné était utilisé pour le traitement des trypanosomiasés en Afrique. Puis, en 1913, l'antimoine trivalent a été utilisé en Italie, par Macado et Vianna, pour traiter des leishmanioses cutanées et, en 1915 en Inde, par Rogers, pour traiter les infections viscérales. Des dérivés d'antimoine pentavalent moins toxiques pour l'homme ont été développés par la suite. C'est en 1945 que des Britanniques ont développé le stibogluconate de sodium (Pentostam[®]), suivi peu après par un groupe de Français qui ont développé l'antimoniate de méglumine (Glucantime[®]) (68). En raison de leur efficacité, de leur relative faible toxicité et de leur relatif faible coût, ces deux médicaments sont encore les plus utilisés de nos jours. Le Glucantime[®] est constitué d'un ensemble de plusieurs structures basées sur l'association de l'antimoine et du N-méthyl-D-glucamine (235). Il existe d'autres formules générales contenant jusqu'à 4 atomes de Sb et 5 molécules de N-méthyl-D-glucamine (NMG), toujours sous une formulation (NMG-Sb)_n-NMG. Une hypothèse quant à la structure et à la masse moléculaire du Pentostam[®] a toutefois été proposée. Tout comme pour le Glucantime[®], le Pentostam[®] pourrait aussi être constitué d'un mélange de plusieurs molécules. Il faut noter la présence de deux atomes d'antimoine liés par un atome d'oxygène pour le Pentostam[®], contre un seul atome pour le Glucantime[®]. La variabilité et l'instabilité de l'antimoine en solution, la concentration de l'antimoine sous sa forme trivalente plus toxique (10 à 15 % selon le lot pour le Glucantime[®]) ainsi que l'utilisation d'un préservatif toxique pour le parasite, le m-chlorocresol (pour le Pentostam[®]), peuvent rendre l'utilisation de ces médicaments plus difficile pour la recherche car plus difficilement standardisés. Une formulation générique de stibogluconate de sodium (Albert Davis Ltd, Inde) est maintenant disponible. Les résultats obtenus indiquent que cette nouvelle formulation serait aussi efficace que le Pentostam[®], tout en étant beaucoup moins dispendieuse (25).

Ces agents chimiothérapeutiques à base d'antimoine présentent de nombreux effets secondaires indésirables, tels que des pancréatites, des arthralgies, des myalgies, des nausées et

des vomissements, en plus de présenter une certaine toxicité cardiaque. De plus, des phénomènes de résistance à ces produits ont été observés, phénomènes qui seront discutés en détails plus loin.

Après 60 ans d'utilisation, le mécanisme d'action de l'antimoine pentavalent est pratiquement inconnu quoique des hypothèses plausibles puissent être avancées. L'interprétation des différents travaux sur le mode d'action et le degré de sensibilité à l'antimoine est compliqué du fait que les formulations liquides du sodium stibogluconate contiennent l'agent de conservation m-chlorocresol, qui est lui-même un agent antileishmanial potentiel (232). Malheureusement, la plupart de ces articles ne spécifient pas si la forme utilisée est du liquide ou de la poudre sans additif. Néanmoins, il est maintenant généralement accepté que tous les antimoines pentavalents sont des pro-médicaments qui nécessitent une réduction biologique en la forme trivalente Sb(III) pour leur activité antileishmania. Le site de la réduction (macrophage ou parasite) et aussi le type de la réduction (enzymatique ou non enzymatique) ne sont pas claires. Sa cible moléculaire précise est inconnue mais il est probable que le macrophage puisse être impliqué directement ou indirectement dans l'activité de Sb(V). Un des mécanismes biochimiques impliqué serait celui d'une inhibition de l'activité bioénergétique des parasites : en inhibant l'activité glycolytique et l'oxydation des acides gras, l'antimoine réduirait la capacité du parasite à phosphoryler l'ADP en ATP (29). De plus, l'antimoine trivalent inhiberait la trypanothion-réductase, empêchant ainsi le recyclage du trypanothion, important agent antioxydant chez le parasite (69).

Cependant, des résultats plus récents ont démontré que Sb(V) inhibe des protéines tyrosines phosphatases (SHP-1, SHP-2, et PTP1B) *in vitro* et augmente la signalisation des cytokines et leur réponse chez des lignés cellulaires (220), suggérant ainsi le rôle des phosphatases et possiblement autres voies de signalisation de transduction. De plus, il a été observé dans d'autres études que le sodium stibogluconate (SSG) et spécifiquement l'INF- α agissent en synergie pour tuer des lignées cellulaires humaines cancéreuses résistantes à l'INF- α , et ce en activant STAT1 (292). Aussi Sb(V) peut cibler l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), la protéine C kinase (PKC) et les protéines kinases MAPKs couplés avec l'activation du mécanisme microbicide du macrophage, ce qui conduira à la fin à l'élimination des parasites (193).

Plusieurs études ont rapporté que Sb(V) pourra induire un effet protecteur *in vivo* contre la diminution de l'activité du phagocyte induit par *Leishmania*, cette activité semble être induite lors du contact direct de Sb(V) avec les phagocytes. Suite à cette interaction, l'initiation pour générer ROS et l'activité de la NADPH oxydase (l'enzyme qui génère le superoxyde) auront lieu (229). D'autre part, des travaux ont montré que l'antimoine a un double effet aussi bien sur la concentration des thiols que sur le potentiel redox du thiol, constituant ainsi selon ces auteurs le mode d'action primaire de l'antimoine (282).

Des travaux récents ont rapporté des phénomènes d'apoptose chez des amastigotes traités à l'antimoine trivalent Sb(III). Ceci impliquerait une fragmentation de l'ADN et une externalisation de la phosphatidylserine sur la surface externe de la membrane plasmique (252, 259). Toutefois, ces effets n'impliquent pas la voie classique des caspases (252) et ne concordent pas avec la définition récente de l'apoptose (143).

1.4.2. Amphotéricine B

L'amphotéricine B est un antibiotique polyène produit par *Streptomyces nodocus* et il est utilisé comme traitement de deuxième ligne contre la leishmaniose depuis les années 60. Ce composé a une activité sélective contre les champignons ainsi que contre *Leishmania* et *Trypanosoma cruzi*. Cette sélectivité est due à la forte affinité que l'amphotéricine B a pour l'ergostérol, le stérol majeur entrant dans la composition de la membrane cytoplasmique de *Leishmania* (26, 126). L'interaction de l'amphotéricine B avec l'ergostérol induit la formation de canaux transmembranaires qui rendent la membrane de la cellule perméable. Ces canaux permettent une fuite vers l'extérieur de plusieurs composés cytoplasmiques, ce qui provoque la mort de la cellule.

Ce médicament est toutefois toxique, notamment pour les reins. Il existe cependant de nouvelles formes liposomales très efficaces et beaucoup moins toxiques. Celles-ci étaient jusqu'à tout récemment trop dispendieuses dans plusieurs endroits du globe où les leishmanioses sont endémiques (25). Récemment, un traitement plus abordable d'une seule dose massive d'Amphotéricine B sous forme liposomale (7,5mg/kg) a toutefois été suggéré pour un traitement

de la leishmaniose viscérale en Inde, où la résistance aux médicaments à base d'antimoine est considérable (261).

1.4.3. Pentamidine

La pentamidine (1-5-bis-4'-aminophénoxy-pentane) est utilisée comme traitement pour les différents types de la leishmaniose (LV, LC et LMC) depuis plus de 40 ans. Ce médicament n'est pas largement utilisé comme un antileishmanial puisque son utilisation a été révisée dans les années 90, il est utilisé surtout dans les cas de la leishmaniose zoonotique, ce qui suggère que le développement de la résistance chez les espèces de *Leishmania* cutanée ne pose pas un problème.

Les mécanismes antiparasitaires de la pentamidine qui incluent possiblement l'inhibition de la biosynthèse des polyamines (qui entrent dans la composition du trypanothion, ce dernier étant lui-même impliqué dans la défense du parasite contre le stress oxydatif (93)), la liaison à l'ADN, et ces effets sur le potentiel de la membrane mitochondriale, sont toujours mal définis (39).

1.4.4. Miltefosine

La miltefosine (hexadécylphosphocholine), un analogue de phospholipide, a été tout d'abord développée comme traitement anticancéreux. Son activité a été comparée avec un autre analogue de phospholipide aussi développé initialement comme un anticancéreux, soit l'edelfosine (ET-18-OCH₃). Lors de récents essais cliniques, le produit s'est cependant montré très efficace pour traiter les leishmanioses et est commercialisé sous le nom d'Impavido[®] par la société Zentaris, filiale des Laboratoires Aeterna de Québec. En plus de son efficacité, ce médicament possède les avantages d'être administré par voie orale, d'être peu dispendieux et d'entraîner des effets secondaires moins graves que ceux qui sont associés aux autres traitements. Une variation de la sensibilité au médicament chez la forme promastigote et amastigote des espèces *L. donovani*, *L. major*, *L. aethiops*, *L. mexicana* et *L. panamensis* a été observée. Cependant, la miltefosine étant tératogène, son utilisation est contre-indiquée pour les femmes enceintes. Le mode d'action de la miltefosine n'est pas clairement défini, mais il impliquerait une perturbation du métabolisme des alkylipides et de la biosynthèse des phospholipides ainsi

que des dommages aux membranes cellulaires (168, 175, 244). Il a été toutefois démontré qu'il est facile de générer *in vitro* des mutants résistants à la miltefosine (224, 250), suggérant ainsi que l'utilisation conjointe d'un second médicament pourrait prévenir l'apparition de souches résistantes. La résistance s'expliquerait par une diminution de l'accumulation intracellulaire du médicament, possiblement due à une dysfonction du transporteur *LdMT* (pour *Leishmania donovani* putative Miltefosine Transporter). Ce dernier pourrait aussi jouer un rôle dans le transport des glycérophospholipides (221, 222).

1.4.5. Autres médicaments

D'autres médicaments possèdent aussi une efficacité relative contre le *Leishmania*. Ils sont cependant peu utilisés en clinique ou encore en phase de développement, les principaux traitements aujourd'hui utilisés étant ceux précédemment décrits.

Parmi les médicaments peu utilisés en clinique, il y a la paromomycine. Cet antibiotique aminoglycoside (aminosidine) a été utilisé pour traiter la leishmaniose viscérale sous sa formulation parentérale en phase clinique III et pour traiter la leishmaniose cutanée sous les deux formulations topicales et parentérales. Cependant, quelques variations de la sensibilité ont été observées. Son mode d'action et de résistance est très connu chez la bactérie et il a été caractérisé en relation avec la diminution de l'accumulation chez les pathogènes gram négatif, l'altération de la liaison ribosomale et la modification des groupements amines ou hydroxyles en inactivant les N-acétyltransférases, O-phosphotransférases ou O-nucleotidyl transférases (71). Par contre, il n'a pas de description similaire des mécanismes d'action de la paromomycine chez *Leishmania*.

La voie de la biosynthèse de l'ergostérol, le stérol majeur chez les champignons, *Leishmania* et *Trypanosoma cruzi* semble être une cible pour la plupart des antifongiques. Deux classes de ces médicaments, les allylamines (par exemple, terbinafine) qui inhibe l'époxidase de squalène et les azoles (par exemple, ketoconazole et itraconazole) qui inhibent la C14 α -deméthylase, ont des activités des plus intéressantes contre *Leishmania*. Il n'y a pas des études expérimentales publiées sur la résistance chez *Leishmania* à ces molécules. Par contre la résistance au fluconazole a été observée, et elle semble être rapidement induite chez le parasite *Trypanosoma cruzi* (43).

Contrairement aux mammifères, *Leishmania* est auxotrophe pour les purines, ouvrant ainsi la voie à l'élaboration d'outils thérapeutiques spécifiques dirigés contre le parasite. L'allopurinol, un analogue des purines, possède effectivement une certaine activité *in vitro* contre *L. donovani*. Cependant, *in vivo*, il doit être utilisé en combinaison avec le SbV, car il ne représente pas une monothérapie efficace (68, 179). Le mode d'action de l'allopurinol semble impliqué la transformation en analogues triphosphate ribonucleosides et l'incorporation dans l'ARN, perturbant ainsi la biosynthèse des macromolécules (178).

D'autres médicaments prometteurs ne sont pas encore sur le marché. Par exemple, la sitamaquine (4-methyl-6-methoxy-8-aminoquinoline) (leoidine) connu aussi sous le nom de WR6026. Il est en phase II pour le traitement de leishmaniose viscérale. Ce médicament semble avoir un large spectre d'action comme antiprotozoaire (291) mais avec une utilisation clinique limitée et sans cas déclaré de résistance. Le mode d'action du sitamaquine n'est pas connu mais il peut être impliqué dans le cycle redox comme la primaquine.

2. MÉCANISMES DE RÉSISTANCE À L'ANTIMOINE

Les médicaments contenant des métalloïdes sont utilisés pour combattre les maladies infectieuses causées par les parasites pathogènes (Pentostam et Melarsoprol) comme pour les thérapies anti cancéreuses (contre la leucémie aigue promyélocytaire : arsenic trioxyde et melphalan (24). Toutefois, l'émergence de la résistance à ce type de médicament est une menace réelle pour la performance du traitement médical. De ce fait, il est hautement désirable d'identifier la cause de ce phénomène de résistance.

2.1. Généralités

Il existe plusieurs mécanismes permettant aux cellules de déjouer l'action des diverses substances thérapeutiques utilisées. Les principaux sont illustrés à la figure 6 et seront discutés plus en détail. Je me concentrerai particulièrement sur ce qui est connu chez les parasites.

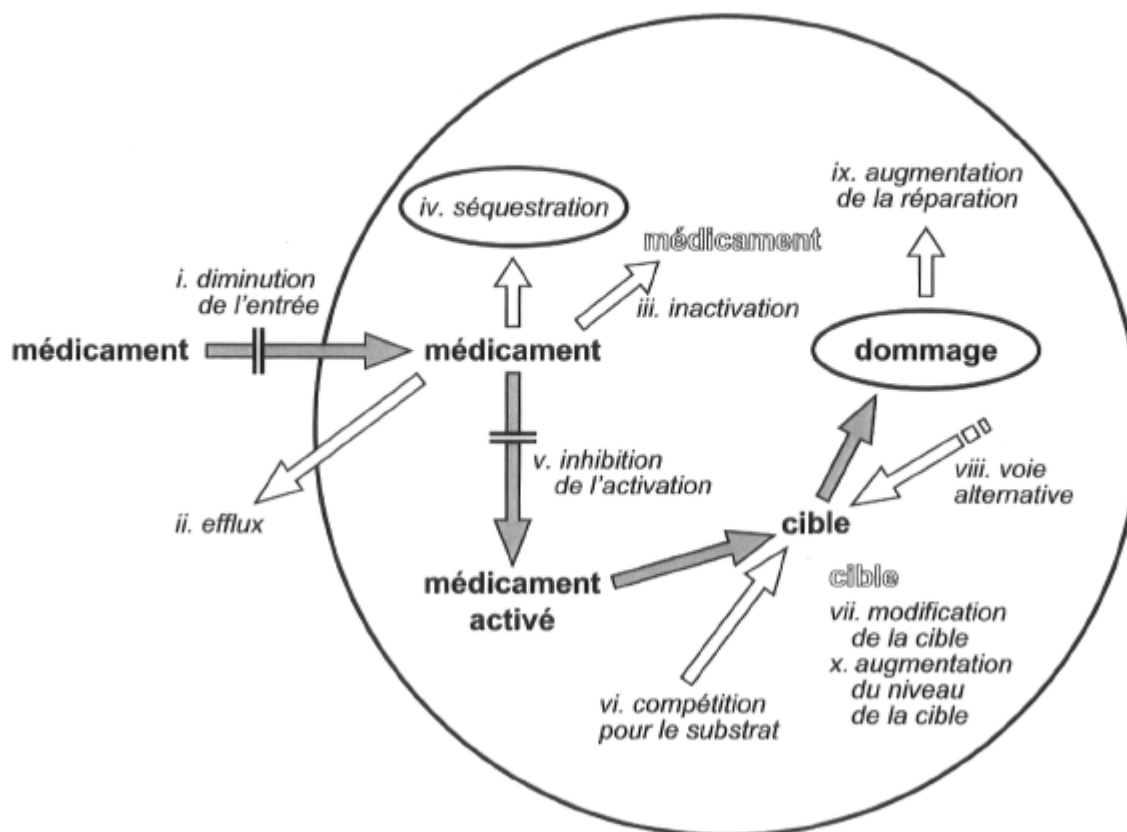


Figure 6. Principaux mécanismes de résistance aux médicaments. Inspiré de (36)

2.1.1 Diminution de l'entrée du médicament

Afin d'atteindre sa cible thérapeutique, le médicament doit tout d'abord pénétrer la cellule. Celle-ci peut par exemple bloquer cette étape en modifiant ou en éliminant le transporteur impliqué. Ce mécanisme est observé chez *Trypanosoma*, en ce qui concerne la résistance aux diamines ainsi qu'aux traitements à base d'arsenic (53, 102, 180), ainsi que chez *Leishmania*, pour ce qui est de la résistance aux antifolates (151). De façon similaire, plusieurs bactéries peuvent changer la composition de leur membrane cellulaire de façon à modifier la perméabilité à certains médicaments, comme la tétracycline et certains aminoglycosides (184). Un autre exemple chez *Leishmania* est la diminution de l'expression de l'aquaglycéroporine AQP1, le transporteur de la forme active de l'antimoine trivalent (SbIII). Une diminution de l'expression ce transporteur a comme conséquence de diminuer l'entrée de SbIII dans le parasite (111) ce qui conduit à la résistance.

2.1.2 Efflux du médicament

La diminution de l'accumulation intracellulaire d'un médicament peut être due à une diminution du niveau d'entrée du médicament, ou encore à une augmentation de l'efflux de ce médicament hors de la cellule. Cet efflux implique une pompe transmembranaire, énergie-dépendante, capable d'expulser le médicament contre un gradient de concentration. Deux principaux systèmes existent : ceux qui utilisent la force proton motrice, et ceux qui utilisent l'ATP (5). Deux exemples du premier type de système est premièrement la protéine Tet (246), qui transporte la tétracycline chez les bactéries gram négatif (164) et gram positif (186), et deuxièmement, la protéine Mef qui transporte les macrolides (296). La seconde classe est celle des transporteurs ABC, dont plusieurs membres sont directement impliqués dans la résistance à de nombreux médicaments et métaux lourds. Plusieurs pompes GS-X qui reconnaissent des médicaments ou métaux liés à un thiol, principalement le glutathion, jouent un rôle direct dans la résistance (138). Plusieurs exemples de tels transporteurs impliqués dans la résistance à certains métaux chez les mammifères et à l'arsénite chez *E. coli* et chez la levure seront décrits plus loin. Chez les parasites, l'efflux du médicament est impliqué notamment dans la résistance à la

méfloquine chez *Plasmodium* (278), à l'émétine chez *Entamoeba histolytica* (78) et à l'arsénite et à l'antimonite chez *Leishmania* (81).

2.1.3 Inactivation du médicament

Il s'agit ici de situations où les médicaments sont modifiés et/ou inactivés, soit par phosphorylation, adénylation ou acétylation, ou encore hydrolysés de façon à les rendre inactifs (146). Les bactéries exploitent fréquemment ce mode de résistance, par exemple les *Staphylococcus* résistants à la pénicilline G, qui produisent une β -lactamase (176) pouvant détruire l'agent antibiotique (184) et *P. aeruginosa* qui produisent AmpC en grande quantité pour hydrolyser les antibiotiques de types β -lactames comme le cefoxitin (144). Cependant, aucun exemple de ce type de résistance n'a encore été observé chez les parasites.

2.1.4 Séquestration du médicament

Le médicament peut être séquestré grâce à l'intervention d'un transporteur à l'intérieur d'une vacuole intracellulaire, ce qui l'empêche d'atteindre sa cible thérapeutique. Par exemple, YCF1 et HTM1 sont des pompes vacuolaires impliquées dans la résistance au cadmium chez la levure (165, 208, 262) et chez *Leishmania* MRPA peut aussi séquestrer dans une vacuole l'AsIII ou le SbIII conjugué au trypanothion, procurant ainsi une résistance à ces métaux (161).

2.1.5 Inhibition au niveau de l'activation du médicament

Dans certains cas, la molécule thérapeutique se présente sous la forme d'un pro-médicament qui nécessite une modification afin de devenir fonctionnel. Le métronidazole, utilisé notamment contre *Trichomonas vaginalis* et *Giardia duodenalis*, en est un exemple. Ce médicament a besoin d'être activé par une réduction de son groupe nitro à l'aide de la ferredoxine. Une diminution de l'activité de la ferredoxine ou de la voie métabolique associée à cette enzyme empêche donc l'activation du médicament et entraîne ainsi la résistance à ce médicament (36, 146). Un autre exemple est celui de l'inhibition de la réduction de l'antimoine pentavalent (SbV) en sa forme trivalente active SbIII chez le parasite *Leishmania* (41). Aussi la

baisse du niveau de polyglutamylation du MTX (un antifolate) chez des mutants *Leishmania* a été observé (88, 89), grâce à l'enzyme FPGS et à une activité hydrolase qui vont altérer la chaîne glutamique des MTX-polyglutamates. Ceci entraînera une rétention moindre du médicament.

2.1.6 Compétition pour le substrat

Dans l'éventualité où le médicament mime un substrat impliqué dans une voie métabolique, la cellule peut alors augmenter la production ou l'accumulation de ce même substrat de façon à créer une compétition métabolique avec le médicament. Elle peut aussi se procurer le substrat désiré dans son environnement immédiat. Un exemple de ce mécanisme de résistance chez *Leishmania* est la surexpression du gène codant pour le transporteur de la biopéridine BT1, ce qui assure une augmentation de l'entrée de folates à l'intérieur de la cellule, s'opposant ainsi à l'action du méthotrexate, un antifolate (151).

2.1.7 Modification de la cible du médicament

Il est aussi possible pour une cellule de modifier la cible thérapeutique, notamment par mutation, de façon à la rendre insensible à l'action du médicament, tout en maintenant son activité. Par exemple, suite à une méthylation de l'ARN ribosomal 23S, il y a modification du site récepteur à l'érythromycine situé sur la sous-unité 50S du ribosome des bactéries résistantes. Citons aussi le cas déjà mentionné de la résistance à l'Amphotéricine B, où une modification de la composition en stérols de la membrane cellulaire mène à la résistance. Chez *P. falciparum*, l'agent de la malaria, où une mutation dans la DHFR procure une résistance aux antifolates (135) et chez le parasite *Leishmania* aussi le changement d'une base à la position 158 permet la substitution de la méthionine en position 53 par l'arginine, ce qui conduit à la résistance au MTX par altération de DHFR (12).

2.1.8 Utilisation d'une voie métabolique alternative

Si l'utilisation d'une voie métabolique importante pour la cellule-cible est compromise par l'action du médicament, cette cellule peut alors remplacer la voie métabolique concernée par

une seconde voie, lui permettant d'obtenir malgré tout le produit désiré. Par exemple, certaines bactéries résistantes aux sulfonamides, un analogue de l'acide p-aminobenzoïque (PABA), utilisent l'acide folique plutôt qu'une source extracellulaire de PABA (146). Chez *Leishmania*, suivant une inhibition de la DHFR-TS par le méthotrexate, il y a amplification de *PTR1* (21, 156, 218, 219). Normalement impliqué dans une seconde voie métabolique, ce dernier peut ainsi suppléer à la DHFR et ainsi réduire les folates.

2.1.9 Augmentation de la réparation au niveau de l'ADN

Plusieurs médicaments causent des dommages à l'ADN. En augmentant le niveau d'activité des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN, une cellule peut alors déjouer l'effet de ces médicaments. Un des aspects de la résistance à la cisplatine, qui est utilisé comme traitement contre certains types de cancers, est un exemple de la stimulation de la réparation de l'ADN endommagé par le médicament (38, 57). Ce mécanisme n'est toutefois pas observé chez *Leishmania*, puisqu'aucun médicament actuellement utilisé ne possède la capacité de s'attaquer à l'ADN du parasite.

2.1.10 Augmentation du niveau de la cible

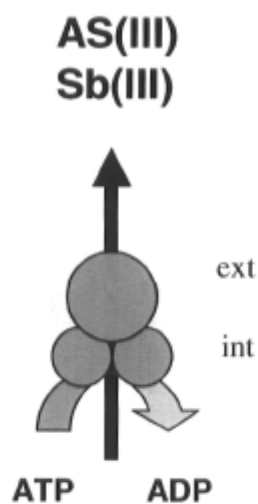
L'objectif visé par ce mécanisme de résistance est d'augmenter la concentration intracellulaire de la cible thérapeutique de façon à toujours en assurer un certain niveau de disponibilité. La cible peut alors accomplir sa fonction métabolique, malgré qu'une certaine portion soit inhibée par le médicament. Par exemple, chez *Plasmodium* et *Leishmania*, une augmentation de l'expression du gène codant pour la DHFR conduit à la résistance aux antifolates (58, 91, 137, 264).

2.2 La résistance aux métaux

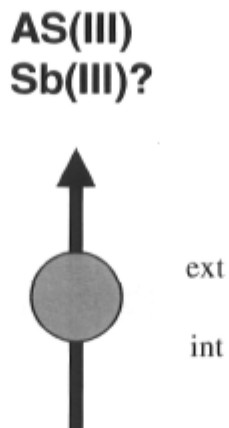
2.2.1 Résistance chez les mammifères

Il existe trois différentes familles de transporteurs qui sont impliqués dans la détoxification des métalloïdes (Fig. 7) : (1) la famille ArsB des protéines d'efflux chez les procaryotes, (2) la famille Acr2p avec des membres identifiés chez la levure et la bactérie et (3) la sous-famille ABCC (MRP) de la superfamille des transporteurs ABC.

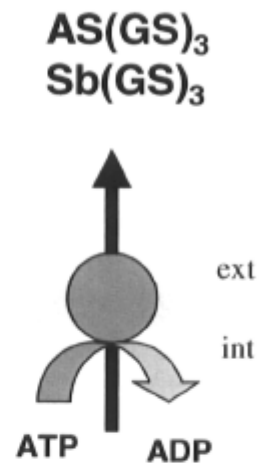
Le principal mécanisme de détoxification des métalloïdes chez différents mammifères implique la réduction d'As (V) en As (III) suivie d'une biométhylation (148, 149). As(III) est premièrement méthylé en acide monométhylarsonique et successivement en acide diméthylarsénique. Plusieurs enzymes de même que le glutathion et le s-adénosylméthionine sont associés au processus de méthylation (148, 294) qui se produit principalement dans le foie. Toutefois, des études récentes montrent que les métabolites de l'arsenic trivalent méthylé ont une activité biologique significative et peuvent être toxiques comme les espèces inorganiques.

***E. coli* ArsAB**

AS(III)
Sb(III)

***S. cerevisiae* Acr3p**

AS(III)
Sb(III)?

MRP1 Humain

AS(GS)₃
Sb(GS)₃

Figure 7. Les trois différents transporteurs impliqués dans l'export de As et Sb. Tiré de (263)

Ainsi selon ce qui a été supposé, la méthylation peut donc augmenter la toxicité au lieu de jouer le rôle de détoxification (148).

Les composés de l'arsenic absorbés par les mammifères sont excrétés dans l'urine (113, 228). Cependant, le transport de As(III) sous la forme de arsenic-triglutathione et méthyl-arsenic-diglutathione dans la bile est réalisé par MRP2/cMOAT, un transporteur ABC fortement exprimé chez les hépatocytes (145). Toutefois, l'excrétion rénale de l'arsenic peut aussi dépendre du transporteur de type ABC (MRP1) ou bien de MRP2.

MRP1 humain fonctionne normalement comme un transporteur actif des anions amphiphiliques et il est aussi exprimé fortement dans les cellules cancéreuses (74). MRP1 est impliqué dans la tolérance à l'arsenate, l'arsénite et les deux types d'antimoine trivalent et pentavalent, probablement en exportant les métalloïdes sous la forme conjuguée tri-glutathione $\text{As}(\text{GS})_3$ et $\text{Sb}(\text{GS})_3$ (62, 272, 295) (Fig. 8).

Les cellules répondent à la présence des métalloïdes en activant différentes voies de signalisation et l'expression de différents gènes (Fig. 9). Toutefois peu de chose est connu sur les éléments et le mécanisme impliqués. Chez les mammifères, la présence des métalloïdes entraîne l'activation des voies de signalisation des protéines kinase (MAP). Par exemple, l'arsénite de sodium active la MAP kinase p38 qui à son tour active la transcription d'une variété de gènes impliqués dans la réponse au stress probablement via le facteur de transcription AP-1 (Fig. 9). Quelques uns de ces gènes induits par le stress aux métalloïdes sont aussi induits par un choc thermique et un stress oxydatif (31).

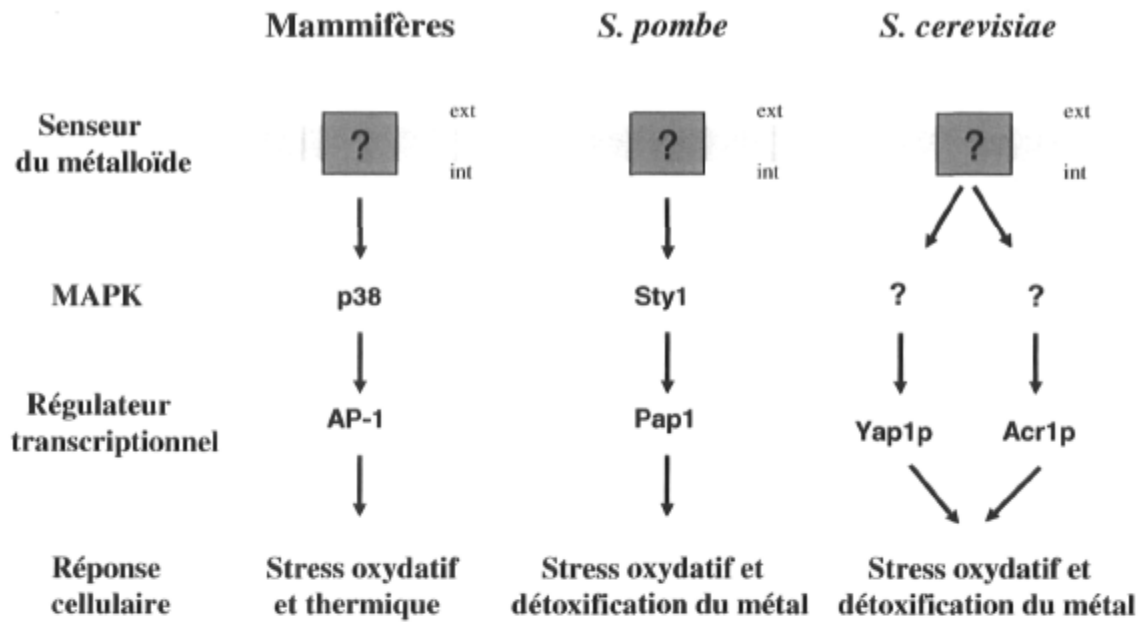


Figure 9. Les différentes voies de signalisation provoquées par les métalloïdes. Tiré de (263).

2.2.2 Résistance chez les bactéries

Les pompes ATPase de type P (P-type ATPase) constituent une famille de transporteurs assurant le contrôle de la concentration intracellulaire de plusieurs métaux en ajustant leur efflux. Elles peuvent être classées en deux groupes, selon qu'elles transportent des métaux monovalents, tel le cuivre (Cu^{1+}) (pour être transporté par la pompe CopA, le Cu^{2+} doit être réduit en Cu^{1+}) ou l'argent (Ag^{1+}), ou divalents, comme le zinc (Zn^{2+}), le cadmium (Cd^{2+}) et le plomb (Pb^{2+}). Ces pompes ne sont pas exclusives aux bactéries, puisque nous en retrouvons chez les mammifères, permettant l'efflux du cuivre. Les homologues de cette dernière chez les bactéries sont CopA et CopB, que l'on retrouve chez *Enterococcus hirae* (204, 205), *Helicobacter pylori* (CopA) (19) et *E. coli* (CopA) (230). Une perturbation de l'activité d'un de ces transporteurs mène ainsi à une sensibilisation au cuivre, les bactéries ne pouvant plus contrôler la concentration intracellulaire du métal. D'autres transporteurs de cette famille permettent le transport de métaux divalents comme CadA chez *Staphylococcus aureus* (203), ZntA chez *E. coli* (20) et PbrA chez *Ralstonia metallidurans* (34). Leur inhibition conduit respectivement à une sensibilisation au cadmium, au zinc et au plomb.

Le mécanisme de résistance à l'arsenate (AsV) chez *E. coli* (Fig. 8) est très bien étudié et présente une grande similarité avec celui de la levure et de *Leishmania*. Comme l' AsV est similaire au phosphate, il pénètre la cellule par le système de transport spécifique de ce dernier comme PstABC ATPases. Deux transporteurs de phosphate sont ainsi exploités, soit Pit et Pst (125, 277). L' AsV est par la suite réduit en sa forme trivalente, qui est davantage toxique. La réductase assurant la réduction de l' AsV en AsIII est la protéine ArsC, qui fait partie d'un opéron contenant cinq gènes, soit *arsR*, *arsD*, *arsA*, *arsB* et *arsC* (239). ArsC a cependant besoin de co-facteurs, le glutathion ainsi que la glutaredoxine, pour effectuer la réduction de l' AsV . L' AsIII peut aussi pénétrer directement la cellule via GlpF, qui permet également l'entrée du SbIII (Fig. 8). Ce transporteur fait partie de la famille des aquaglycéroporines, qui permettraient aussi l'entrée de l' AsIII et du SbIII chez les mammifères. Par la suite, l' AsIII peut être expulsé hors de la cellule (238). L'efflux de l' AsIII et du SbIII se fait par la pompe ArsAB, un transporteur ATPase composé de deux sous-unités, soit ArsA et ArsB (240). La sous-unité ArsA est la partie catalytique qui lie l'ATP, alors qu'ArsB est la partie transmembranaire du transporteur. Récemment, des travaux ont montré l'implication du chaperon ArsD dans l'extrusion de

l'arsénite. ArsD est codé par l'opéron arsRDABC chez E-coli, il transfère les métalloïdes trivalents à la sous-unité ArsA, ce qui augmente l'affinité de ArsA pour l'arsénite même à faible concentration de l'arsénite et ainsi son extrusion (166, 167). Par contre, chez *Sinorhizobium meliloti* un nouveau transporteur a été identifié (290). AqpS qui est une aquaglycéroporine qui permet d'expulser l'arsénite hors de la cellule à la place de la sous-unité ArsB chez E-coli (290).

La réponse de la bactérie en présence des métalloïdes est contrôlée par le répresseur ArsR en réponse à As(III) et Sb(III). ArsR contrôle l'expression du gène de résistance codant pour arsABC. L'attachement de As(III) au répresseur induit un changement conformationnel conduisant ainsi à la dissociation de ArsR du promoteur en laissant place à la transcription (256, 257). D'où la possibilité que ArsR pourrait jouer le rôle d'un capteur de métalloïde intracellulaire.

2.2.3 Résistance chez la levure

Le mécanisme de résistance à l'arsénite observé chez *S. cerevisiae* est passablement similaire à celui d'*E. coli*. La levure posséderait plusieurs transporteurs de phosphates permettant l'entrée de l'AsV dans la cellule comme Pho84p (44). Tout comme chez la bactérie, *S. cerevisiae* possède un système de réductases capable de réduire le AsV en AsIII. Cependant, malgré leur profil d'activité semblable, les réductases de *E. coli* et de la levure, soit Acr2, ne sont pas homologues. Acr3p le transporteur membranaire de *S. cerevisiae* effectue l'efflux de As(III) probablement comme un oxyanion (108, 284). L'entrée du SbIII ainsi que de l'AsIII se fait par l'intermédiaire de Fps1, un homologue des aquaglycéroporines AQP7 et AQP9 chez les mammifères, et de GlpF chez *E. coli* (285). Par la suite, le métal trivalent est expulsé hors de la cellule par Acr3, ACR3 (arsenic compounds resistance) est une copie d'un locus de 3 gènes localisé sur le chromosome XVI qui sont ACR1, ACR2 et ACR3 (33). Le métal peut être également séquestré à l'intérieur d'une vacuole sous forme d'un complexe As(GS)₃ par l'action du transporteur ABC YCF1, un homologue de la protéine humaine de résistance multiple aux médicaments, MRP1 (Fig. 8) (108, 284). YCF1 est aussi responsable de la résistance au cadmium par le même procédé de séquestration du cadmium lié à deux molécules de GSH (262).

Les homologues de MAP kinase p38 existent aussi chez différentes espèces de la levure. Par exemple la MAP kinase Sty1 chez *Schizosaccharomyces pombe* est activée par différentes conditions de stress incluant le choc thermique, osmotique et le stress oxydatif, alors que chez *cerevisiae* la MAP kinase Hog1p semble être spécialement induite par le stress osmotique (15, 117) et récemment il a été démontré que cette MAP kinase module l'entrée de l'arsénite dépendante de Fps1p (266). Sty1 contrôle la transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif et à la résistance multiple aux médicaments, ceci est produit via le facteur de transcription Pap1 (AP-1-like) (Fig. 9).

Le génome de *S. cerevisiae* contient une famille de 8 facteurs apparentés à AP1 (95). Yap1p a été montré comme étant un régulateur de l'expression de nombreux gènes impliqués dans le stress oxydatif (14, 169, 286). Il semble que As(III) active Yap1p par la génération des ROS et ainsi il stimulera la transcription des gènes codant pour les protéines antioxydantes. Par contre, Yap8p contrôle l'expression des gènes spécifiques de la détoxification de l'arsenic ACR2 et aussi ACR3 (189, 286).

L'assimilation du sulfure est essentielle pour tous les organismes. Chez la levure, le sulfate extracellulaire est métabolisé via la voie d'assimilation du sulfate et où le sulfite est le dernier produit réduit (265). Met4p est un activateur de la transcription des gènes impliqués dans l'assimilation du sulfure et dans la biosynthèse de GSH. Il a été observé que Met4p joue un rôle central dans la tolérance au cadmium en contrôlant l'expression des gènes impliqués dans l'assimilation du sulfure et la biosynthèse de GSH (94). Récemment, une étude a montré l'implication de Yap1p et de Met4p dans ce processus chez des cellules exposées à l'arsénite (267).

3. RÉSISTANCE À L'ANTIMOINE CHEZ *LEISHMANIA*

Le mécanisme primaire de résistance chez *Leishmania* est la diminution de la concentration de la forme active du médicament à l'intérieur du parasite. Le parasite peut diminuer ce niveau par une variété de mécanismes incluant la diminution de l'accumulation, l'augmentation de l'efflux, l'inhibition de l'activation du médicament, l'inactivation de la forme

active du médicament par métabolisme ou séquestration et finalement en développant un mécanisme de pompe-efflux. Le mécanisme de résistance à l'antimoine a donc été démontré comme étant un mécanisme multifactoriel (Fig. 10).

Le mécanisme de résistance à l'antimoine chez les souches de terrains commence à être mieux connu, et la plupart de notre compréhension des différents types de mécanismes utilisés découlent des travaux faits sur des mutants générés en laboratoire portant sur la résistance à l'arsénite et à SbIII chez *L. tarentolae*. Ces travaux nous ont servi de paradigme à l'étude de la résistance à l'antimoine chez *Leishmania*. Ces deux métaux, l'As et le Sb, présentent des propriétés physicochimiques et biologiques similaires, puisqu'ils sont membres d'une même famille, tel que souligné dans le tableau périodique partiel de la figure 11. De plus, il a été démontré que les mutants générés pour la résistance à l'un ou l'autre des métaux présentent aussi une résistance croisée à l'autre métal (41, 120), et que les mutants résistants à l'antimoine peuvent aussi excréter l'AsIII (81). Il a donc été suggéré que les mécanismes de résistance exploités par le parasite contre ces métaux soient semblables

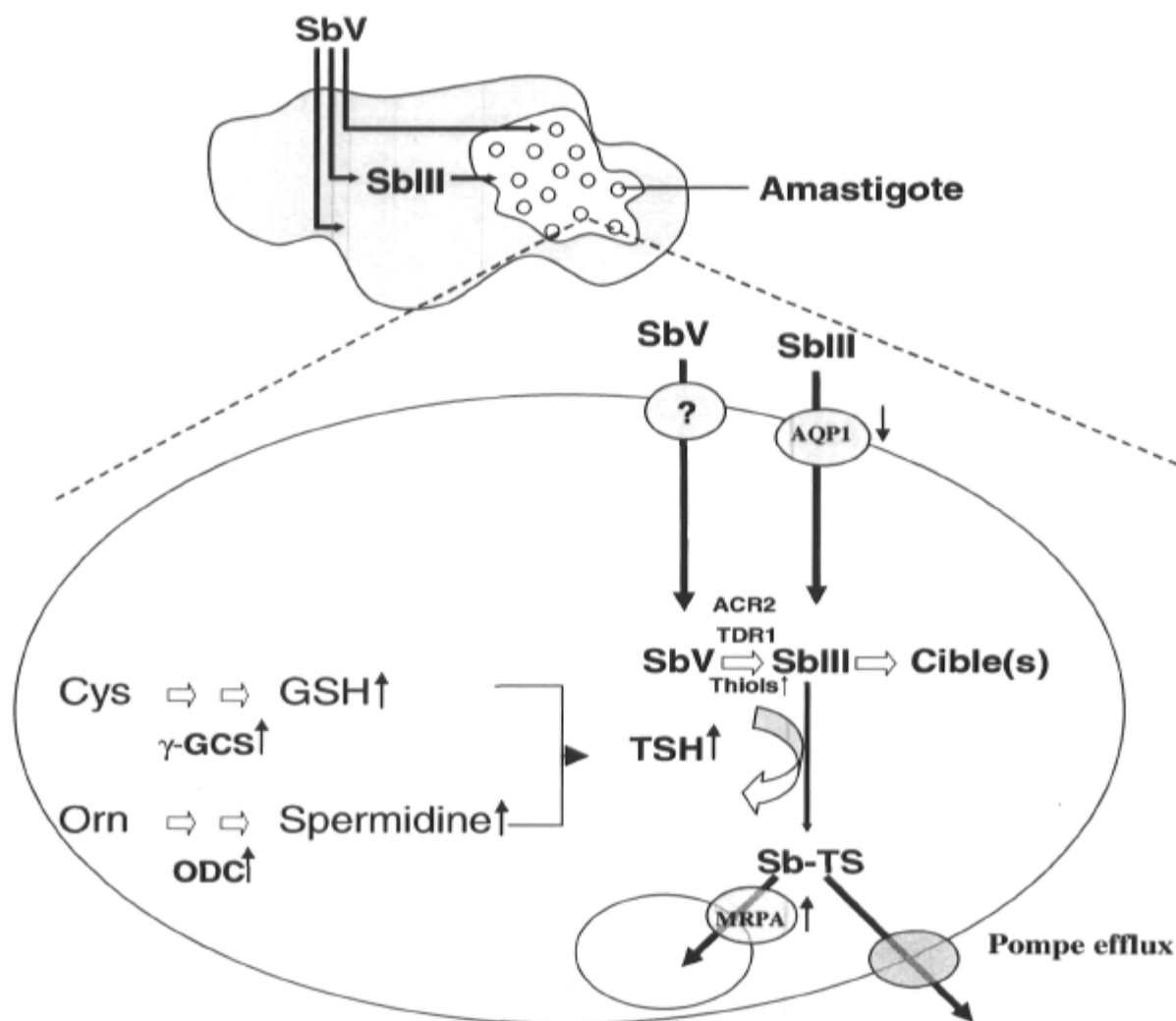


Figure 10. Représentation schématique du mécanisme proposé de la résistance à l'antimoine chez le parasite *Leishmania*. Les parasites amastigotes se retrouvent à l'intérieur du phago-lysosome du macrophage. L'entrée de SbV à l'intérieur du parasite se fait par un transporteur inconnu, et l'entrée de SbIII se fait via AQP1. Chez les cellules résistantes le niveau de TSH (trypanothion) est augmenté due à l'augmentation de l'activité de l'ornithine décarboxylase (ODC) et de γ -glutamylcystéine synthase (γ -GCS), des enzymes impliquées dans la biosynthèse de TSH. La détoxification se fait par la formation du complexe SbIII avec TSH et ensuite la séquestration via le transporteur MRPA qui est amplifié ou/et par une pompe efflux inconnue. Cys, cystéine; Orn, ornithine; GSH, glutathion; AQP1, aquaglycéroporine 1; ACR2, réductase d'arsenate; TDR1, réductase dépendante des thiols, Sb-TS, complexe formé par SbIII et TSH. Inspiré de (36).

IVB	VB	VIB	VIIIB
C	N	O	F
Si	P	S	Cl
Ge	As	Se	Br
Sn	Sb	Te	I
Pb	Bi	Po	At

Figure 11. Tableau périodique partiel.

3.1 Pénétration intracellulaire de l'antimoine

Pour qu'il soit actif contre *Leishmania*, l'antimoine doit entrer dans la cellule hôte puis traverser la membrane phagolysosomale et enfin pénétrer dans le parasite.

La voie d'entrée de l'antimoine pentavalent (SbV) à l'intérieur du parasite (ou dans le macrophage) n'est pas complètement connue, par contre l'arsénite pentavalent (AsV), un autre métal relié à Sb(V), est connu pour entrer via un transporteur de phosphate (238).

Le transport de l'antimoine a été premièrement étudié en utilisant le Pentostam radioactif [$^{125}\text{Sb(V)}$] chez les deux espèces du parasite *Leishmania mexicana* et *Leishmania donovani* (28, 66). Plus récemment, des approches par spectrométrie de masse ont été utilisées pour démontrer l'accumulation des deux formes de l'antimoine, Sb(V) et Sb(III), chez les deux stades de vie du parasite. Chez de nombreuses espèces, l'accumulation de Sb(V) est plus élevée chez la forme amastigote axénique que chez la forme promastigote (41, 66). Des spéculations sur le mode d'entrée du Sb(V) ont été faites, elles supposent que Sb(V) pourrait entrer via une protéine qui reconnaît la partie saccharide puisque le gluconate a été démontré comme inhibiteur compétitif de l'accumulation de Sb(V) chez la forme amastigote axénique (41).

De plus, ni As (V) ni le phosphate ne peuvent inhiber l'entrée du Pentostam, ce qui rend improbable l'entrée du SbV via le transporteur de l'As (V). Aussi le Sb(V) est accumulé par les deux stades de vie du parasite, mais à des concentrations pharmacologiques, il n'y avait aucune activité antileishmaniale (234, 236, 251, 253). Par contre, dans certaines études, les amastigotes axéniques ont été trouvés sensibles à Sb(V) comme parasites intracellulaires (47, 92, 255). Cette contradiction nécessite des travaux supplémentaires. En effet, des facteurs importants, comme l'espèce, le statut d'axénisation, le pH et la concentration des thiols peuvent affecter la voie de réduction de Sb(V) (49, 97). La forte activité antileishmaniale de Sb(III) contre les deux formes du parasite *Leishmania* et l'activité sélective de Sb(V) contre le parasite intracellulaire supportent l'hypothèse que la réduction de Sb(V) en Sb(III) est nécessaire pour son activité.

Sb(III) est accumulé aussi bien chez la forme amastigote que promastigote du parasite *Leishmania*. La différence d'accumulation entre Sb(III) et Sb(V) chez les deux stades suggère que les deux formes de l'antimoine n'entrent pas par la même voie. L'accumulation de Sb(III) semble être inhibée compétitivement par le métal As(III), alors que celle de Sb(V) ne l'est pas (41).

Aussi bien chez les procaryotes que les eucaryotes (levure et mammifères), les aquaglycéroporines (AQPs) sont connues comme transporteurs des métalloïdes trivalents (268, 269, 285). Récemment, une AQP (AQP1) a été identifiée chez *Leishmania* et démontrée comme responsable de l'entrée de l'antimoine trivalent Sb(III) à l'intérieur du parasite (111). La surexpression d'AQP1 est aussi capable de sensibiliser la souche de terrain résistante à Sb(V) isolée de patient infecté par *L. donovani* au sodium stibogluconate (SAG). Cette sensibilisation est due à une augmentation de l'accumulation de Sb(III) et As(III), ce qui montre leur rôle dans la résistance normale à l'antimoine. Aussi la transfection d'AQP1 rend les parasites hypersensibles à Sb(III). Cette observation a été confirmée par une étude récente de l'expression différentielle de gènes, pour laquelle l'expression de AQP1 est diminuée chez les deux stades de vie du parasite promastigote et amastigote intracellulaire chez des souches cliniques résistantes à l'antimoine au Népal (73). La diminution de l'abondance de l'ARNm d' AQP1 a été aussi démontrée chez des mutants résistants à l'antimoine chez plusieurs espèces de *Leishmania* (177).

3.2 Réduction du métal

Le Sb(III) est très actif contre les deux stades de vie du parasite, mais le Sb(V) est actif contre la forme amastigote intracellulaire (et dans certains cas contre les amastigotes axéniques). Généralement, il est convenu que le Sb(V) a besoin d'être activé en Sb(III). En outre le site (macrophage ou amastigote) et le mécanisme exact de la réduction (enzymatique ou non enzymatique) sont jusqu'à maintenant inconnus. Une étude a montré que les amastigotes axéniques et non les promastigotes réduisent Sb(V) en Sb(III) (255), alors que d'autres études ont suggéré que la réduction va se produire dans le macrophage (236, 251). D'autre part, Sb (V) à une concentration plus élevée que 1 mg/ml n'a pas d'effet sur la croissance et la viabilité des macrophages, par contre Sb(III) même à ~25µg/ml tue 50% des macrophages THP-1 (283). Mais

puisque la EC_{50} des amastigotes axéniques varie de 3.2 à 100 $\mu\text{g Sb(III) /ml}$ dépendement de l'espèce de *Leishmania*, les macrophages ne peuvent pas réduire Sb(V) en Sb(III) à un niveau significatif, et cette conversion se déroulera donc dans les deux sites (macrophage et parasite), générant ainsi une concentration mortelle de Sb(III) à l'intérieur du parasite. De plus, une proportion de Sb(V) peut être convertie en Sb(III) chez l'humain (45, 112) ainsi que chez le modèle animal (174).

Deux réducteurs le GSH et le TSH semblent être responsable de la réduction non-enzymatique de Sb(V) en Sb(III) (97, 101, 288, 289). De plus, les conditions à l'intérieur du phagolysosome dans lesquelles *Leishmania* réside (le pH acide (pH5) et la température élevée (37°C)) favorisent cette conversion non enzymatique. D'autre part, tout l'antimoine est réduit quand le ratio molaire de GSH : Sb(V) est égal ou supérieur à 5 : 1, ce qui indique une stochiométrie de 5 : 1 de la réaction entre GSH et Sb(V). Par contre, puisque le niveau de la réduction est très bas, la pertinence physiologique de cette conversion reste questionnable. De plus, les promastigotes contiennent une concentration plus élevée de TSH et GSH par rapport aux amastigotes (11, 282), et les deux stages maintiennent un pH intracellulaire presque neutre.

Récemment, un enzyme spécifique du parasite, nommé "thiol-dependent reductase" (TDR) 1 a été identifié. Apparemment il catalyse la réduction enzymatique des antimoniés pentavalent en trivalent (76). Cet enzyme est une protéine tétramère qui contient des domaines de la classe des glutathione S- transferases (GSTs) omégas, et utilise le GSH comme réducteur. Aussi, TDR1 a été trouvé en abondance chez la forme amastigote du parasite.

Les réductases d'arsenate sont omniprésentes aussi bien chez les procaryotes que les eucaryotes, et sont essentiellement présentes pour conférer la résistance à l'arsenate (198). ScAcr2p est une réductase chez *Saccharomyces cerevisiae* qui réduit l'arsenate en arsénite, in vivo et in vitro (199-201). Récemment, la réductase de l'arsenate homologue LmACR2 de *Leishmania major* a été identifiée et caractérisée. L'enzyme est connu pour sa capacité à catalyser la réduction de Sb(V), ce qui augmente la sensibilité de *Leishmania* à Sb(V) (298). Et comme ScAcr2p, LmACR2 a besoin de GSH et de glutaredoxine comme cofacteurs pour son activité et il est inhibé aussi par As(III), Sb(III) et l'oxyde de phénylarsine. LmACR2 purifié a aussi la

capacité de réduire As(V) et Sb(V). Par contre, la structure de LmACR2 est monomère. De plus, la délétion du gène *arsC* chez *Escherichia coli* ou ScACR2 chez *S. cerevisiae* est complétée par le gène LmACR2 en conférant le phénotype de sensibilité à l'arsenate, ce qui confirme son rôle dans la réduction. Et plus important, la transfection de LmACR2 chez *Leishmania infantum* promastigotes augmente la sensibilité au Pentostam chez les amastigotes intracellulaires, confirmant ainsi son importance physiologique. Il est possible aussi que plus d'un mécanisme soit responsable de l'activation du médicament.

Puisque les macrophages ne peuvent réduire complètement Sb(V) en Sb(III) (283), les parasites ne seront pas exposés à une quantité mortelle de Sb(III) à l'intérieur des macrophages. Ainsi, la réduction de l'antimoine pentavalent devient un événement critique et la perte de l'activité réductrice chez le parasite peut conduire à la résistance. Mais, ceci reste à démontrer chez les souches cliniques.

3.3 Efflux du médicament

Comme mécanisme de résistance, l'efflux du médicament ou de son dérivé actif est très commun chez la bactérie, la levure, les champignons et une variété de protozoaires pathogènes (*Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Trypanosoma cruzi* et *Trichomonas vaginalis*). Ceci peut être le cas aussi chez *Leishmania*. Il y a trois types de transporteur de la famille ABC connus pour être responsable de la résistance multiple aux médicaments (MDR) chez les cellules cancérigènes : la P-glycoprotéine (PGP), la protéine de résistance multiple aux médicaments (MRP) et ABCG. La P-gp est codé par le gène *mdr1* qui confère la résistance à plusieurs médicaments hydrophobes (MDR) et qui est caractérisé par réversion avec le verapamil et la cyclosporine A.

Chez *Leishmania*, les trois classes des transporteurs ABC ont été aussi reportés comme étant amplifiés dans différentes espèces en réponse à différents médicaments en conditions de laboratoire (155, 214). Le MDR1 de *Leishmania* confère la résistance aux médicaments comme par exemple la daunorubicin et la vinblastine, mais il n'y a aucune évidence de l'existence d'une relation entre la protéine MDR1 et la résistance à l'antimoine (150, 214). Par contre, récemment

des travaux ont montré que la surexpression du gène *LtrMDR1* augmente l'efflux de la miltefosine, ce qui conduit à la diminution de son accumulation à l'intérieur du parasite *Leishmania* et ainsi à la résistance (223).

L'analyse complète du génome de *Leishmania* (<http://www.genedb.org>) a révélé la présence de 8 protéines putatives homologues appartenant à la famille des MRP (163) connus pour être impliqués dans l'efflux associé aux thiols et dans la résistance chez les cellules de mammifères (35, 121). Deux de ces 8 protéines semblent être impliquées dans la résistance à l'antimoine chez le parasite. La première protéine est MRPA. Le gène a été trouvé amplifié chez de nombreux mutants de laboratoire d'espèces de *Leishmania* sélectionnées pour la résistance à Sb(III), Sb(V) et As(III) (46, 96, 120, 161, 214). Son rôle dans la résistance à l'antimoine a été confirmé par des études de transfection (46, 159, 217). Toutefois, ce transporteur n'est pas responsable du phénomène d'efflux du médicament à travers la membrane plasmique. Plutôt, il confère la résistance par séquestration du conjugué métal-thiol, un mode de détoxification des métaux chez les cellules de la levure (161, 241, 263). MRPA est localisé dans la membrane des vésicules qui sont proches de la poche flagellaire, le site de l'endo- et exocytose chez le parasite (161). La surexpression de MRPA a montré qu'elle diminue l'influx de l'antimoine plutôt que d'augmenter l'efflux (48), et ceci peut être dû à un effet négatif dominant à travers l'interaction avec d'autres protéines membranaires. Ainsi, MRPA est un transporteur intracellulaire plutôt qu'un transporteur d'efflux, suggérant que MRPA peut jouer un rôle dans la résistance à l'antimoine (274, 275).

Récemment, une seconde protéine de la famille des transporteurs ABC, PRP1, impliquée dans la résistance a été isolée par clonage fonctionnel en sélectionnant pour la résistance à la pentamidine (59). Ce gène confère aussi la résistance à l'antimoine. La localisation de cette protéine est intracellulaire comme MRPA (60, 61) et le mécanisme par lequel elle confère la résistance semble être le même que celui de MRPA par séquestration du complexe métal-thiol à l'intérieur d'une vacuole (60).

Un autre transporteur qui confère la résistance à l'antimoine par extrusion active à système indépendant de MRPA est aussi présent chez les mutants de laboratoire de *L. tarentolae*

(81). En utilisant les vésicules inversées et enrichies pour la membrane plasmique, il a été démontré qu'une pompe efflux de métal est présente dans la membrane plasmique de *Leishmania*. Comme MRPA, cette pompe à efflux reconnaît aussi le métal conjugué aux thiols comme GSH et TSH (80) et nécessite de l'ATP. L'identité de cette pompe efflux reste inconnue, même 10 ans passés après sa découverte. Cependant, il apparaît que ce système d'efflux ne joue pas un rôle significatif dans la résistance à l'antimoine puisque les résultats de transport cinétique des vésicules préparées à partir des parasites sensibles et résistants sont similaires (80).

3.4 Métabolisme des thiols

Le métabolisme des thiols a un rôle central dans le maintien de l'environnement de réduction intracellulaire pour que la cellule puisse se défendre contre les dommages causés par le stress oxydatif à l'intérieur du macrophage, les oxydants, certains métaux lourds et possiblement des xénobiotiques (188). Et puisque l'antimoine cause du stress oxydatif (157), l'environnement réducteur dans la cellule et la présence des thiols deviennent des facteurs importants pour la résistance à l'antimoine.

Chez toutes les espèces de *Leishmania*, les mutants de laboratoire résistants à l'antimoine ou à l'arsénite démontrent une augmentation significative des niveaux des thiols intracellulaires, incluant la cystéine, le GSH et le TSH. Cela suggère un rôle des thiols dans la résistance (120, 159, 197). Le TSH, qui constitue le thiol majeur de la cellule, est retrouvé exclusivement chez les trypanosomatides, et il est formé de deux molécules de GSH et d'une spermidine (93) (Fig. 12). La synthèse de ces deux précurseurs détermine le niveau de TSH. Le gène γ -GCS, codant pour la γ -glutamylcystéine synthase qui catalyse la dernière étape de la biosynthèse de GSH, a été trouvé amplifié chez *L. tarentolae* résistant à l'arsénite (114) et à l'antimoine (116, 120), alors que le gène ODC codant pour l'enzyme ornithine décarboxylase impliquée dans la régulation de la biosynthèse de la spermidine, est aussi surexprimé (122). Ceci nous suggère qu'une faible concentration intracellulaire des thiols peut résulter d'une atténuation du phénotype de résistance. Cette hypothèse a effectivement été confirmée par des études avec des inhibiteurs. En effet, l'inhibition des gènes γ -GCS et ODC par leurs inhibiteurs spécifiques, L-buthionine-(SR)-sulphoximine (BSO) et DL- α -difluorométhylornithine (DFMO) respectivement, induit la

réversion du phénotype de la résistance à l'antimoine ou l'arsénite chez des mutants de laboratoire (8, 114, 161). Quoique la combinaison de BSO et de DFMO sensibilise les cellules résistantes, le niveau résiduel de la résistance demeure plus élevé que celui des cellules sauvages, suggérant ainsi que GSH et TSH seuls ne sont pas suffisants pour conférer la résistance au métal. La surexpression aussi bien du gène ODC que de γ -GCS chez *L. tarentolae sauvage* induit l'augmentation du niveau des thiols, qui est quasi équivalent à celui des cellules résistantes, mais les transfectants ne montrent aucun phénotype de résistance à l'arsénite (114). La co-transfection du gène ODC et de γ -GCS avec MRPA chez certains types de cellules induit une résistance synergique aux métaux (120, 122). Ceci, nous permet de déduire que MRPA et l'augmentation de la concentration de TSH agissent en synergie, et que la disponibilité de TSH est un facteur limitant dans le transport des conjugués (métal-TS) et de la résistance à l'antimoine (212). Par contre, chez *Leishmania tropica* et *Leishmania mexicana*, l'augmentation de TSH n'est pas associée avec l'amplification de γ -GCS (159). Des études avec des puces à ADN ont montré que l'expression d'autres gènes du sentier métabolique de la biosynthèse du TSH (Fig.12) pourrait également être augmentée chez des parasites résistants à l'antimoine (116).

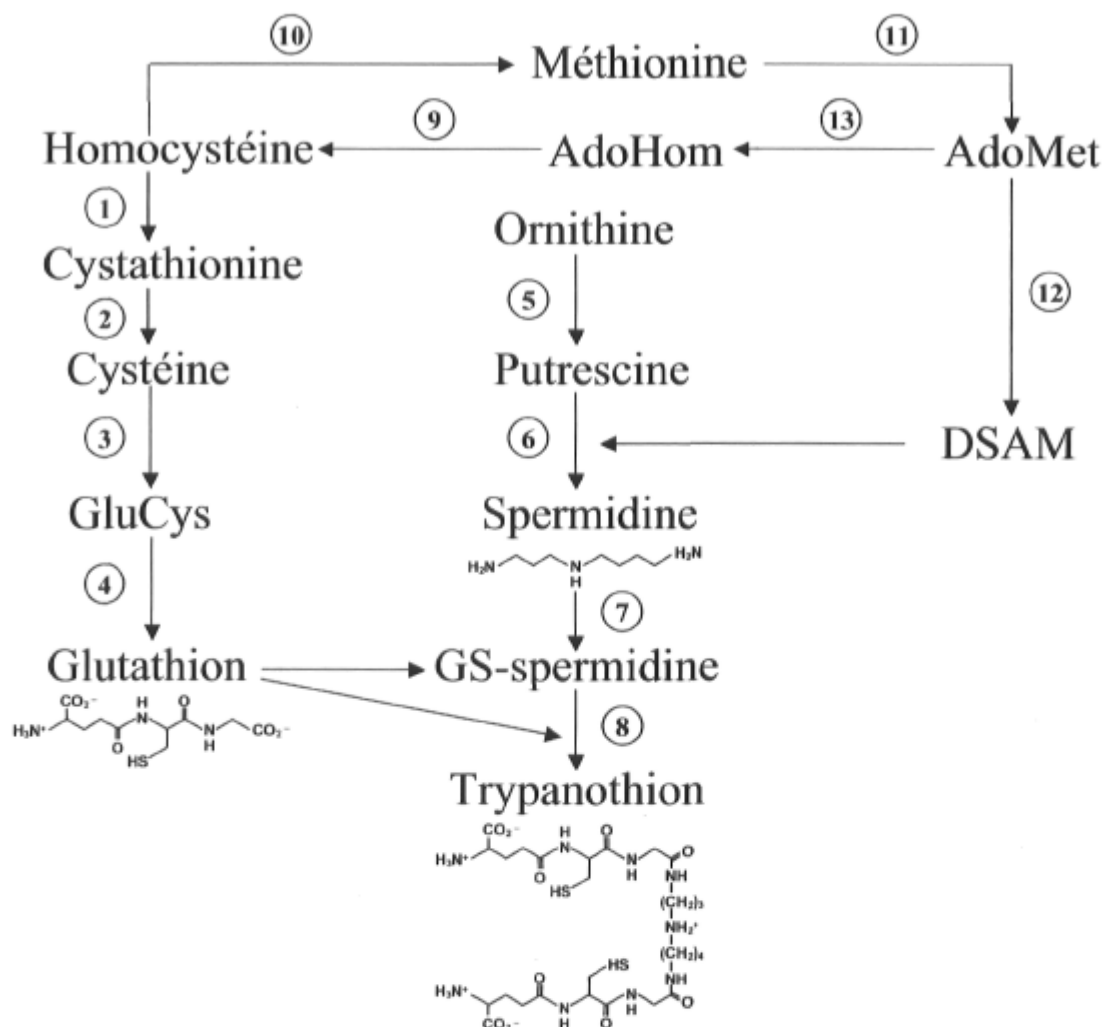


Figure 12. Voie de biosynthèse du trypanothion chez *Leishmania*.

GluCys, γ -glutamylcystéine; GS-spermidine, glutathionylspermidine; AdoMet, S-adénosylméthionine; DSAM, S-adénosylméthionine décarboxylée; AdoHom, S-adénosylhomocystéine. 1. Cystathionine β -synthase; 2. Cystathionine γ -lyase; 3. γ -Glutamylcystéine synthase; 4. Glutathion synthase; 5. Ornithine décarboxylase; 6. Spermidine synthase; 7. Glutathionylspermidine synthase; 8. Trypanothion synthase; 9. S-adénosylhomocystéine hydrolase; 10. Méthionine synthase; 11. S-adénosylméthionine synthase; 12. S-adénosylméthionine décarboxylase; 13. Méthylases.

Plus intéressant encore, la résistance à Sb(V) chez des isolats clinique de *L. donovani* a été contrée chez le modèle animal par traitement avec le BSO (50, 52). Il a été noté que chez ces isolats résistants, le niveau d'expression de γ -GCS est aussi augmenté significativement. Par contre, dans une autre étude sur des isolats du Népal de *L. donovani* le niveau d'expression des deux gènes est diminué significativement chez les isolats résistants (73). Ceci contraste avec une étude récente sur des souches indiennes qui montrent clairement une surexpression de GSH1 et ODC chez des parasites résistants (196). Des études supplémentaires seront nécessaires pour déterminer le rôle des thiols dans la résistance naturelle à l'antimoine. Récemment, des études ont montré que des isolats résistants à l'antimoine diminuent le niveau d'expression de γ -GCS des macrophages (51, 191), probablement en sous régulant NF κ B de la cellule hôte, qui est connu pour sa capacité à réguler l'expression de γ -GCS (140). Ceci pourra induire la réduction du niveau intracellulaire de GSH et initier un environnement oxydatif intracellulaire (283), ainsi minimisant la réduction intramacrophagique de Sb(V) à sa forme toxique Sb(III). Ces résultats suggèrent que la résistance à SAG chez *L. donovani* est associée à une manipulation des niveaux des thiols aussi bien dans la cellule hôte que dans le parasite.

La formation spontanée de Sb(III) combinée à GSH ou TSH ou les deux, a été déjà démontré par spectroscopie de proton nucléaire à résonance magnétique (260, 287) et par spectrométrie de masse (197). Et puisque l'activité GST (Glutathion-S-Transferase) est élevée chez les cellules mammifères sélectionnées pour leur résistance à l'arsénite (170), il a été proposé que GST induit aussi la formation des substrats de la pompe de thiol métalloïde chez les espèces de *Leishmania*. Par contre, l'activité GST est non détectable chez *Leishmania*, mais une activité trypanothione S-transferase a été observée (273). Ce TST complexe a été identifié comme étant un facteur d'élongation type 1B (eEF1B) qui est impliqué dans la synthèse des protéines et qui a comme substrat le TSH et la glutathionylspermidine (273).

Ainsi, les thiols ont un double rôle dans la résistance : la sensibilisation du parasite en réduisant l'antimoine pentavalent en trivalent et l'initiation de la résistance en formant des conjugués avec l'antimoine trivalent pour son efflux ou séquestration.

3.5 Autres mécanismes de résistance

Les niveaux d'expressions des protéines de choc thermique possédant différentes masses moléculaires sont augmentés en présence d'arsénite (154). La surexpression de Hsp70 est capable d'induire une protection contre le stress induit par le peroxyde (190). Récemment, Hsp70 et Hsc70 ont été identifiées par clonage fonctionnel (40). Dans ce cas, la transfection d'une HSP ne confère pas la résistance directement, mais par contre augmente la tolérance de la cellule au métal. On ignore, cependant comment Hsp70 confère cette tolérance et si ce mécanisme est aussi présent chez des isolats cliniques.

Il est connu que l'antimoine tue *Leishmania* en inhibant les enzymes des voies de la glycolyse et par son effet sur le potentiel redox du thiol, la fragmentation de l'ADN et la mort programmée de la cellule (27, 30, 252, 282). Il semble que les modes d'action de l'antimoine et du NO soient très liés, parce que les deux agissent par stress oxydatif, déplétion des enzymes des voies de l'énergie et éventuellement par apoptose (131). Et comme l'antimoine, le NO induit également l'expression des protéines de stress (Hsp70, Hsp81 et Hsp65), et ceci semble être un mécanisme protecteur contre son effet toxique (2). Plus intéressant, les *Leishmania* amastigotes résistants à Sb(III) sont aussi résistants à NO quand NO est ajouté comme supplément extracellulaire par un donneur de NO ou intracellulaire via l'activation du macrophage (132). Par ailleurs, une analyse protéomique de souches du terrain résistantes *L. donovani* a révélé l'expression différentielle de deux protéines HSP83 et SKCRP14.1. La SKCRP14.1 (small kinetoplastid calpain-related protein) ainsi que HSP83 semblent être impliquées dans le phénomène de la mort cellulaire programmée (270). Le parasite altère le phénomène de mort cellulaire programmée en augmentant la production de la protéine SKCRP14.1 qui empêche la dépolarisation du potentiel mitochondrial et prévient ainsi la mort cellulaire par fragmentation de l'ADN et induisant la résistance aux médicaments.

D'autres études faites sur des promastigotes de *L. tarentolae* sélectionnés pour leur résistance à SAG et aussi à d'autres composés d'antimoine et à l'arsénite, ont démontré l'amplification d'un locus contenant un ORF de 770 aa. Par contre cet ORF n'a pas d'homologie significative avec d'autres séquences (123), et son rôle reste à préciser.

4. L'APPORT DES TECHNIQUES GÉNOMIQUES ET PROTÉOMIQUES POUR L'ÉTUDE DE LA RÉSISTANCE

La résistance aux médicaments chez *Leishmania* est souvent due à une amplification génique (7, 8, 90, 96, 120, 195, 196). Cependant, on retrouve aussi des exemples où les ARNs spécifiques sont modulés (augmentation ou diminution) sans changement dans le nombre de copies de leur gènes respectifs (90, 116, 122, 177, 196). Plusieurs techniques ont été développées pour mettre en évidence les gènes différentiellement exprimés chez *Leishmania* (55, 153, 227, 281) et une technique des plus prometteuse est l'analyse par puces à ADN. L'ADNc des gènes cibles, des fragments géniques de 1kb, des fragments de PCR ou encore des oligonucléotides de 70-mer sont imprimés sur des lames et suite à une hybridation ont montré des résultats utiles pour l'étude de l'expression différentielle des gènes entre différents stades de vie de différentes espèces de *Leishmania* (3, 6, 130, 162, 187, 243, 247). Pendant que la technique des puces à ADN a été largement utilisée pour mettre en évidence des changements de niveau d'expression des gènes ciblés par les antibiotiques et les antimicrobiens (109, 202, 279), son application dans l'étude de la résistance aux médicaments a émergé. Cette technique a été utilisée dans différentes études de la résistance, incluant le contrôle de l'expression génique chez *C. albicans* sélectionné in vitro pour la résistance au fluconazole ou l'amphotéricine B (17, 65), chez les cellules de *Leishmania* résistantes à différentes classes de médicaments in vitro (90, 116, 163) et chez de nombreuses espèces de bactéries (98, 118, 192). Les puces ont montré leur utilité dans l'étude de la résistance et conséquemment, nous avons récemment généré une puce du génome complet de *Leishmania* avec des oligonucléotides de 70-mer qui devrait être utile pour analyser la résistance au niveau global de l'expression de l'ARN. Manifestement les changements d'expression au niveau de l'ARN ne sont pas toujours en corrélation avec les changements des niveaux des protéines (187) mais dans le cas de la résistance il reste que plusieurs ARNs sont différentiellement exprimés. Par exemple, dans une étude de la résistance aux MTX chez *Leishmania*, on a trouvé une bonne corrélation entre la surexpression des protéines et de l'ARN en utilisant des puces à faible densité (85, 116).

Comme la technique des puces à ADN, l'utilisation de la protéomique pour l'étude de la résistance aux antimicrobiens a émergé (216). Un des avantages de l'analyse protéomique sur les puces à ADN est le fait que les protéines sont plus proches de la fonction que l'ARN. L'analyse

protéomique a permis aussi la détection de modifications post- traductionnelles (MPT) (84) et un récent rapport chez *T. brucei* suggère que la résistance aux composés arsenicaux peut être liée à des MPT (99). Un autre avantage des techniques protéomiques inclut la possibilité d'obtenir des définitions des fonctions comme, par exemple la localisation cellulaire (100). Par contre, un des désavantages des expériences de protéomique est qu'elles sont habituellement plus laborieuses que l'utilisation des puces à ADN due à l'augmentation de la variabilité structurale et à l'écart dynamique de la concentration cellulaire montré par les protéines comparativement aux molécules d'ARN. Des techniques spécialisées sont requises pour observer des classes particulières de protéines, comme celles en faible abondance ou les protéines hydrophobes. Pour ces raisons, la combinaison de plusieurs techniques et d'approches de fractionnement semblent être importantes pour une bonne représentation du protéome (231).

Les techniques de protéomiques ont prouvé leur utilité dans l'étude de la résistance comme pour trouver une alkyl hydroxyperoxyde réductase possiblement impliqué dans la résistance au metronidazole chez *Helicobacter pylori* (181), une protéine impliquée dans la biosynthèse de l'ergostérol chez des cellules de *C. albicans* résistantes (133, 134) et la surexpression du transporteur ABC du phosphate chez *S. pneumoniae* résistantes à la pénicilline (258). D'autres exemples concernant nos travaux avec le parasite *Leishmania* ont permis de montrer la surproduction de la pteridine réductase PTR1 (84) et de l'adénosyle méthionine transférase MAT (85) chez des parasites résistants aux MTX. Ce type de phénotype est difficile à isoler par des méthodes traditionnelles. D'autre part, une analyse protéomique de souches du terrain résistantes à l'antimoine *L. donovani* a révélé l'expression différentielle de deux protéines HSP83 et SKCRP14.1. SKCRP14.1 (small kinetoplastid calpain-related protein) semble être impliquée dans le phénomène de la mort cellulaire programmée ainsi que HSP83 (270).

L'approche protéomique comparative par migration différentielle par des gels à 2D peut aussi être utile pour la détection de quelques mutations ponctuelles. En effet, des travaux sur *S. pneumoniae* ont permis de détecter plusieurs mutations ponctuelles (résultats du laboratoire non publiés). Toutefois ces travaux intensifs ne peuvent pas être effectués facilement pour des études plus larges. Une nouvelle technique de spectrométrie de masse comme l'iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantitation) (276) où de multiples peptides par protéine sont identifiés et

quantifiés, peut aussi servir pour augmenter les chances de détection de mutations ponctuelles au niveau de la protéine. Ainsi la protéomique présentement peut être une technique qui permettra de détecter les mutations ponctuelles mais le reséquençage du génome entier est une alternative qui peut être possible prochainement.

La disponibilité des séquences du génome de plusieurs espèces de *Leishmania* (139) (www.genedb.org) est un événement important dans les recherches sur *Leishmania*. Ceci devrait accélérer la découverte de nouvelles cibles des médicaments puisque les technologies de la génomique fonctionnelle ont un bon potentiel pour la découverte du mode d'action et des mécanismes de la résistance aux médicaments anti-*Leishmania*.

5. OBJECTIFS

La résistance à l'antimoine représente un phénomène fort complexe. Un modèle de mécanisme de résistance a été proposé, utilisant l'arsénite comme paradigme. Il est cependant important de s'assurer que ce même mécanisme de résistance est bien présent chez les mutants résistants au SbIII et au SbV, ainsi que d'affiner notre compréhension du mécanisme de résistance à l'antimoine chez *Leishmania*. Mes recherches visaient donc les objectifs suivants:

Dans le laboratoire, la résistance à l'antimoine chez *Leishmania* a été étudiée exclusivement chez la forme promastigote *in vitro*. Maintenant grâce à des souches amastigotes axéniques qui ont été développées dans notre laboratoire, l'étude de la résistance chez ce stade du parasite est devenue possible. L'objectif général de mon projet de doctorat sera donc d'étudier la résistance à l'antimoine chez la forme amastigote axénique en utilisant à la fois des approches transcriptomiques et protéomiques. Nous voulons vérifier d'une part si les mécanismes de résistance trouvés chez les amastigotes sont semblables à ceux retrouvés chez les promastigotes et surtout identifier de possibles nouveaux mécanismes de résistance afin de mieux comprendre le mode d'action de l'antimoine. Un deuxième objectif consiste à déterminer quels sont les gènes de l'hôte où l'expression est modulée en présence de SbV. Une approche transcriptomique sera utilisée dans l'espoir de trouver des gènes impliqués dans l'activation du SbV.

1) Analyse comparative du niveau d'expression des gènes par puces à ADN :

Beaucoup d'études ont montré l'utilité de la méthode des puces à ADN comme un important outil pour étudier l'effet des médicaments sur plusieurs microorganismes tels que *Saccharomyces cerevisiae* (77, 271), *Pseudomonas aeruginosa* (110, 280) et les kinetoplastids (87). Nous avons récemment démontré l'utilité d'une telle technologie dans notre laboratoire, et montré l'implication de nombreux gènes dans la résistance (116, 163). L'expression des gènes était augmentée soit par amplification génique soit par une augmentation de la stabilité des ARN. Encouragée par ces études, mon travail consistera à utiliser cette technique afin de détecter la modulation de l'expression génique chez les amastigotes en comparant la souche sauvage au mutant résistant à SbIII. Le mutant Sb2000.1 résistant au SbIII a été étudié par les puces à ADN et les résultats seront présentés au chapitre II. Une attention spéciale a été portée aux éléments

identifiés comme directement impliqués dans la résistance, soit les gènes *MRPA* et *SAHH*, ainsi qu'au niveau des thiols chez les mutants. Ce niveau a été quantifié par HPLC.

2) Analyse comparative du niveau d'expression des protéines par gels 2D:

La résistance aux métaux n'est pas toujours due à une surexpression génique et de plus l'abondance de l'ARNm et le niveau de protéines produites ne sont pas toujours corrélés (187). Comme approche complémentaire à la technique des puces à ADN, nous avons opté pour la technique des gels à deux dimensions (2D) à différents intervalles de pH, afin de réaliser un profil protéomique des différentes protéines exprimées différemment chez la souche sauvage croissant en amastigote par comparaison avec le mutant Sb2000.1. Les protéines susceptibles d'être impliquées dans la résistance à SbIII seront identifiées par spectrométrie de masse (MS-MS ou MALDI-TOF). Le rôle des gènes qui seront identifiés sera étudié grâce à des transfections chez les amastigotes axéniques et intracellulaires de type sensible et résistant au SbIII. Ceci ce fera par surexpression et/ou inactivation des gènes en question. Nous espérons aussi pouvoir identifier de nouveaux éléments potentiellement impliqués dans le mécanisme de résistance à l'antimoine. Ce travail sera présenté au chapitre III.

3) Étude des mécanismes du mode d'action de l'antimoine pentavalent

L'expertise développée avec les puces à ADN ouvre la voie à un projet qui permettra de comprendre l'apport de la cellule hôte dans le mode d'action du Pentostam. En effet, il y a plusieurs travaux dans la littérature qui montrent que celui-ci à des activités immunomodulatrices (16, 70, 193, 220, 229, 292). Grâce à des puces Affymetrix, nous étudions l'effet du SbV chez des macrophages humains (THP-1) infectés ou non par le parasite résistant ou non au Pentostam.

Les études proposées pourront nous aider à mieux comprendre les mécanismes de résistance et possiblement le mode d'action des métaux. Ces connaissances pourront être exploitées d'une part dans le développement de nouvelles drogues pour un traitement efficace contre la leishmaniose et d'autre part, pour contourner les obstacles de la résistance rencontrés lors du traitement de la maladie. Les résultats seront présentés dans le chapitre IV.

Chapitre II

The role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in
Leishmania infantum axenic and intracellular amastigotes.

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2005 dans la revue
Antimicrobial agents and chemotherapy :

RÉSUMÉ

On présente ici notre étude des parasites *L. infantum* amastigotes sélectionnés pour leur résistance à l'antimoine trivalent (SbIII). À l'intérieur des macrophages, les cellules sélectionnées pour SbIII montrent une résistance croisée au Pentostam. Les niveaux d'expression de plus de 40 gènes ont été comparés entre le sensible et le résistant axéniques amastigotes en utilisant les puces à ADN. L'expression de 3 gènes codant pour le transporteur ABC MRPA, la S-adénosylhomocystéine hydrolase et la folylpolyglutamate synthase ont été trouvée augmentée. Le niveau de la cystéine est également augmenté chez le mutant. La transfection de MRPA provoque la résistance au Pentostam à l'intérieur des parasites. Cette résistance via MRPA peut être révertée par le buthionine sulfoximine, l'inhibiteur de la biosynthèse du glutathion. Ces résultats mettent en évidence pour la première fois le rôle de MRPA dans la résistance à l'antimoine chez le stade amastigote du parasite et suggèrent une stratégie pour sa réversion.

The role of the ABC transporter MRPA(PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes.

Karima El Fadili, Nadine Messier, Philippe Leprohon, Gaétan Roy, Chantal Guimond, Nathalie Trudel, Nancy G. Saravia, Barbara Papadopoulou, Danielle Légaré and Marc Ouellette.

Centre de Recherche en Infectiologie du Centre de Recherche du CHUL and Division de Microbiologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Canada.

Corresponding author:

Marc Ouellette
Centre de Recherche en Infectiologie
CHUQ, pavillon CHUL
2705 boul. Laurier
Ste-Foy, Québec
Canada, G1V 4G2
tel.: 418-654 2705
fax: 418-654 2715
E-mail: marc.ouellette@crchul.ulaval.ca

ABSTRACT

Antimonial compounds are the mainstay for the treatment of the protozoan parasite *Leishmania*. We present our studies on *L. infantum* amastigote parasites selected for resistance to potassium antimonyl tartrate (SbIII). Inside macrophages, the SbIII selected cells are cross-resistant to Pentostam, the main drug used against *Leishmania*. Putative alterations in the level of expression of more than 40 genes were compared between susceptible and resistant axenic amastigotes using customized DNA microarrays. The expression of three genes coding for the ABC transporter MRPA (PGPA), the S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) and the folylpolyglutamate synthase (FPGS) was found to be consistently increased. The levels of cysteine were found to be increased in the mutant. Transfection of the *MRPA* gene was shown to confer Pentostam resistance in intracellular parasites. This MRPA mediated resistance could be reverted by using the glutathione biosynthesis specific inhibitor buthionine sulfoximine. These results highlight for the first time the role of MRPA in antimony resistance in the amastigote stage of the parasite and suggest a strategy for reversing resistance.

INTRODUCTION

Leishmania is a protozoan parasite affecting several million people throughout the world. The clinical manifestations of the infection depend on the species, the most life threatening being visceral leishmaniasis caused by the *Leishmania donovani* complex. Treatment relies exclusively on chemotherapy and pentavalent antimonials (SbV) are still the mainstay against all forms of *Leishmania* infections (14, 18). While SbV is used for treating patients, it is generally agreed that SbV is reduced to trivalent antimony (SbIII) which constitutes the active form of the drug against the parasite. The exact site of drug reduction (inside the macrophages or inside the parasites) is not known but activities were recently discovered in *Leishmania* that could be implicated in this reduction process (7, 26, 29, 35). Resistance to SbV is so widespread in part of India (33) that first line treatment in this region is either based on miltefosine (31) or amphotericin B (32). Miltefosine is interesting because it can be taken orally but single point mutations can lead to resistance (24) suggesting that resistance to this drug may occur rapidly.

Leishmania has a relatively simple life cycle with two main stages, the flagellated promastigote in the insect stage and the intracellular amastigote living inside macrophages. Progress in culture techniques has allowed the growth of *Leishmania* amastigotes as part of axenic cultures. An increase in the temperature from 25°C to 37°C and a decrease in the pH of the culture medium to mimic the conditions encountered in the phagolysosome are the key parameters to transform promastigotes in amastigotes (reviewed in (36)). It is nonetheless easier to grow promastigotes and most of the work pertaining to resistance mechanisms to antimonials was studied in the insect stage of the parasite. One resistance mechanism deduced from *in vitro* work involves multiple steps where antimony is conjugated to the parasite specific glutathione-spermidine conjugate trypanothione (TSH) (11). TSH is increased in SbIII resistant cells (16) and meta-trypanothione conjugates are either sequestered into an intracellular organelle by the ABC transporter MRPA (formerly known as PGPA) (20) or extruded outside the cell by an efflux pump (8). It remains to be seen whether similar resistance mechanisms operate in the amastigote stage of the parasite and also in field isolates. Resistance in field isolates is less well defined and it is only recently that susceptibility values determined using *in vitro* assays were found to correlate with the clinical response (21). Resistance in field isolates may involve amplification of genes (30). Resistance mechanisms in amastigotes have only recently been studied and one

resistance mechanism involves reduced accumulation of the drug (4). One possible route of entry of the drug is a parasite aquaglyceroporin (12). Another study as revealed a decrease in the conversion of SbV to SbIII (29).

To further define the molecular mechanisms of resistance to antimonials in *Leishmania* amastigotes, we used customised DNA microarrays to screen for differentially expressed genes in an *L. infantum* axenic amastigote cell line selected for SbIII resistance. Our analysis indicates that the ABC transporter MRPA can confer resistance to antimony in the intracellular amastigote parasites.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines. The *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) and *Leishmania viania panamensis* strain MHOM/CO/86/1166 have been described previously (4, 28). Axenically grown amastigotes of *L. infantum* were maintained at 37°C with 5% CO₂ by weekly subpassages in MAA/20 (medium for axenically grown amastigotes) at pH 5.8 in 25-cm² flasks (27). The promastigote forms of *L. infantum* or *L. panamensis* were grown in the same medium at pH 7.0 at 25°C. Growth curves of control strains and transfectants in the presence of drugs were obtained by measuring absorbance at 600 nm using an automated microplate reader (Organon Teknica Microwell System). An axenic *L. infantum* cell line was selected for SbIII resistance (potassium antimonyl tartrate hydrate; Aldrich Chemical) by step-wise selection starting with a drug concentration corresponding to the (EC₅₀) of the strain until we obtained the mutant *L. infantum* Sb2000.1 resistant to 2000 µM. Note that the EC₅₀ of susceptible axenic amastigotes varies from 2 to 20 µM and this may depend on a number of factors. Nonetheless the mutants are considerably more resistant than the sensitive isolates. This mutant was grown in absence of drugs for 20 passages to obtain a (partial) revertant line.

DNA Microarray procedures. We have recently described customized DNA microarrays for studying drug resistance in *Leishmania* (15). These arrays contain several genes implicated in drug resistance including genes involved in cysteine, trypanothione, and folate metabolism and transport. These arrays were used to study gene expression in *L. infantum* 2000.1. RNA was isolated from mid-log phase parasites using the Trizol reagent (Invitrogen). The RNA was treated with DNaseI (Ambion) and purified using the RNeasy Kit (Qiagen). RNA was converted to fluorescent cDNA probes by direct incorporation of Cy3/Cy5-linked dUTP (AmershamPharmacia) mediated by the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) according to the supplier recommendations. For each labelling reaction, 15µg of purified RNA were spiked with two exogenous RNAs (*CAB1* at 2 pg/µl and *NAC1* at 5 pg/µl from *A. thaliana*, Stratagene) to adjust for variations in the incorporation efficiency of the dyes and for differences in first strand cDNA synthesis reactions. Aliquots of cDNA containing 20 pmol of incorporated dye were lyophilized and stored at -80°C until use. The hybridization, washes, data and statistical

analysis were done essentially as described previously using the QuantArray software (15). Statistical significance was calculated by the Student's test using the StatView software. A cut off of 2 for significant differences was chosen.

DNA constructs and transfections. MRPA constructs cloned into *Leishmania* expression vectors were described previously (20, 23). These constructs were electroporated in *L. infantum* axenic amastigote cells and *L. panamensis* promastigotes as described (28). The vector pSP1.2 LUC α HYG α (34) was also co-transfected in MRPA transfected cells to facilitate the quantification of intracellular parasites.

Drug efficacy assay in THP-1 differentiated monocytes. The growth of the luciferase-expressing amastigotes *L. infantum* and *L. panamensis* was evaluated in a human leukemia monocyte cell line (THP-1 cells) as described (28). Briefly, THP-1 cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 100 international units of penicillin/ml, and 100 μ g of streptomycin/ml. THP-1 cells in log phase of growth were differentiated by incubation for 2 days in medium containing 20 ng of PMA/ml (Sigma). These cells were washed with pre-warmed medium and subsequently infected with stationary-phase *L. panamensis* promastigotes in 24-microwell plates (Falcon) at a parasite/macrophage ratio of 20:1 or with *L. infantum* axenic amastigotes at a parasite/macrophage ratio of 2:1. Non-internalized parasites were removed by several washes and infected macrophages were put in contact with Pentostam. After 4 or 5 days of drug exposure, wells containing adherent differentiated THP-1 cells were washed, and the luciferase activity of the LUC-recombinant parasites was determined essentially as described (25). Values were expressed as relative light units (RLU).

Confocal microscopy. *Leishmania infantum* cells transfected with an MRPA-GFP construct were immobilized with 2% paraformaldehyde (Sigma) and mounted on microscope slides with coverslips. Samples were viewed with an Olympus confocal scanning laser system installed on an Olympus IX-70 inverted microscope with an argon laser. Visualization of the fluorophore was achieved using 488 nm excitation filter and 510/530 nm emission filter. Samples were scanned for green fluorescence using a 60X objective (NA 1.40) and a 5X zoom. Transmitted light images

were collected at the same time as fluorescent images. Images were obtained using the Olympus Fluoview 300 software and processed using Adobe Photoshop software.

Thiols analysis. Thiols were derivatized with monobromobimane and separated by HPLC as described (22).

RESULTS

Characterization of the resistance phenotype in *L. infantum* axenic amastigotes Sb2000.1.

To study resistance to antimonials in the amastigote stage of the parasite, an *L. infantum* axenic amastigote line was selected for SbIII resistance (4). The EC₅₀ of the wild-type sensitive line is close to 3 μM while the Sb2000.1 line have an EC₅₀ greater than 4000 μM (Fig. 1A). The stability of the resistance phenotype was tested by passing the cells in absence of SbIII. Resistance was found to be stable and it is only after 20 passages in absence of the drug that part of the resistance present in the mutant was lost (Fig. 1A). This revertant axenic amastigote cell line had an EC₅₀ of 800 μM , still 200-fold more resistant than the wild-type cell. These cells were grown for 20 more passages in absence of drug, but the remaining resistance was stable (result not shown). In our cell culture assay, axenic *L. infantum* amastigotes are not intrinsically susceptible to pentavalent antimony (SbV) (EC₅₀ of 1250 $\mu\text{g/ml}$) but they are susceptible to Pentostam when infecting macrophages with an EC₅₀ of 75 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 1B). Interestingly, the Sb2000.1 mutant selected for SbIII resistance was cross-resistant to Pentostam in our macrophage intracellular assay (Fig. 1B).

Analysis of resistance mechanisms in *L. infantum* by DNA microarrays.

For analyzing the expression of several drug resistance genes in parallel, we have made customised DNA microarray with PCR fragments containing 44 genes involved in cysteine, glutathione, trypanothione, folate, pterin and methionine biosynthesis and transport (15). These arrays have already shown their usefulness for the study of drug resistance in various *Leishmania* species (15). We hypothesized that these arrays would be useful to study resistance in the amastigote stage of the parasite. RNAs, derived from *L. infantum* Sb2000.1 and the susceptible

parent strain, were reverse transcribed, labelled and hybridized to the customised DNA microarrays. From the selected genes covered by the array, none was found to be down regulated in the mutant but three genes appear to be consistently upregulated as determined by DNA microarrays when we applied a cut off of at least 2-fold differential expression. One gene corresponds to the ABC transporter MRPA (PGPA) ($P < 0,003$), a second one to S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) ($P < 0,01$) and the third one to folylpolyglutamate synthase (FPGS) ($P < 0,0001$). These microarray results were further studied by Northern blot analysis and all three genes were indeed found to be more expressed in the resistant mutant compared to susceptible cells (Fig. 2). Increased expression in *Leishmania*, at least in the promastigote stage, is sometimes the result of gene amplification (2, 3) but clearly other mechanisms can also lead to an increase in RNA (9,17). The DNAs derived from *L. infantum* wild-type and Sb2000.1 cells were isolated, digested, blotted and hybridized to MRPA, SAHH and FPGS probes. The MRPA gene was found to be amplified (Fig. 3A, lane 2). Additional work has shown that MRPA is part of an extrachromosomal circle (results not shown). This amplified DNA was lost in cells passaged 20 times in absence of the drug (Fig. 3A, lane 3). Concomitant with the loss of this amplicon, part of the resistance was also lost in the revertant line (Fig. 1A). Neither the SAHH gene nor the FPGS gene were amplified (Fig. 3), however.

Role of the ABC transporter MRPA in antimony resistance in *Leishmania* amastigote parasites.

In *L. tarentolae* promastigotes, MRPA is located intracellularly and has been proposed to confer resistance by sequestering the antimonials conjugated to thiols into an intracellular organelle (20). We first tested whether transfection of MRPA in *L. infantum* axenic amastigotes could lead to SbIII resistance in this stage of the parasite. Growth curve experiments clearly show that MRPA can indeed bestow resistance to SbIII in axenic amastigote (Fig. 4A). We also fused the Green Fluorescent protein to MRPA C-terminus to yield MRPA-GFP. The MRPA-GFP fusion was active as it led to a two-fold increase in resistance to SbIII in axenic amastigotes, a level also observed with transfectants with the unfused MRPA (Fig. 4A). The fold increase in resistance parallels what observed in promastigotes (20). The location of the MRPA-GFP fusion was studied by confocal microscopy in axenic amastigotes and was also found to be located intracellularly in this stage of the parasite (Fig. 4B).

MRPA is thought to transport the antimonials conjugated to thiols including trypanothione and consistent with this hypothesis, trypanothione and other thiols were found to be increased in a number of resistant mutants of different *Leishmania* species (16, 19, 22). Thiol levels were measured in the susceptible and resistant axenic amastigote culture of *L. infantum*. While glutathione and trypanothione levels were similar between the wild-type and Sb2000.1 resistant cells, the levels of cysteine were increased by two fold in the mutant compared to the susceptible cell (Fig. 5).

MRPA confers resistance to SbIII in axenic amastigotes (Fig. 4A) and while SbV is likely to be converted to SbIII (7, 26, 35), SbV is nonetheless the drug used in the treatment of *Leishmania* infections. SbV has very little activity against our axenic amastigote line (27) and we therefore decided to test the role of MRPA in intracellular parasites. Attempts to study MRPA using *L. infantum* have been inconclusive, in part because of the rather high intrinsic resistance of the susceptible strain (Fig. 1, and unpublished observations). In contrast, *L. panamensis* is ~10 times more sensitive to SbV in our assay (Fig. 6A) and we thus transfected the *MRPA* construct in *L. panamensis*. These recombinant parasites were used for infecting the human monocyte cell line THP-1. Most interestingly, the MRPA transfectants were clearly more resistant to SbV than the control transfected lines (Fig. 6A). Buthionine sulfoximine (BSO), a specific inhibitor of γ -glutamylcysteine synthase, the rate limiting step in glutathione biosynthesis, was shown to reduce antimony resistance in vitro (17) and in vivo (5). We tested whether it could reduce MRPA-mediated resistance in intracellular parasites. The results indicated that while the susceptibility of control transfectants was not altered (Fig. 6C), the resistance mediated by MRPA in intramacrophagic parasites was abrogated in the presence of BSO (Fig. 6B).

DISCUSSION

Resistance to antimony has been induced in axenic amastigotes (4, 27, 29) although no genes have so far been linked to resistance. In one study, a decrease in the rate of reduction of SbV to SbIII was correlated to SbV resistance (29). A number of *Leishmania* proteins have recently been discovered that could be related to this reductase activity (7, 35) although the molecular defects in the resistant line remains to be discovered. Transport defects were also observed in *L. infantum* axenic resistant mutants (4) and while one route of entry to SbIII in *Leishmania* implicates the aquaglyceroporin AQP1 (12), we have no evidence, at least at the DNA level, that AQP1 is altered in Sb2000.1 (unpublished observations). DNA microarrays have recently been used to study drug resistance in microorganisms (1, 6) including *Leishmania* (15). Using DNA microarrays containing a limited number of genes we found three genes whose expressions were consistently altered in the Sb2000.1 resistant mutant. One gene consists in *MRPA* and the role of *MRPA* was confirmed by gene transfection in axenic amastigotes (Fig. 4) but even more importantly in intracellular parasites (Fig. 6A). Clearly, resistance genes other than *MRPA* are present in the drug selected mutant, since the loss of the *MRPA* containing amplicon in the revertant is associated with a modest loss in resistance, but the revertant cell is still considerably more resistant than the wild-type susceptible isolate (Fig. 1A). Two other genes were found to be overexpressed, *SAHH* and *FPGS*. *SAHH* is involved in the conversion of S-adenosyl homocysteine to homocysteine, a cysteine precursor. Interestingly, we found that cysteine levels are significantly higher in the mutant (Fig. 5). Possibly an increase in cysteine can either directly or indirectly (e.g. by serving as a precursor for glutathione or trypanothione biosynthesis) be involved in the resistance phenotype by reacting with metals. These metal-thiol conjugates would be substrates for transporters. The *SAHH* gene was found to be amplified also in an *L. tarentolae* mutant selected for SbIII resistance (15) although, while the *SAHH* gene is overexpressed in Sb2000.1, the gene is clearly not amplified (Fig. 3C). *FPGS* is involved in the addition of glutamic acid residues to folic acid and this gene is linked to methotrexate resistance (10). It is not clear how *FPGS* would be involved in SbIII resistance but it is expected that a number of changes may occur in a cell upon drug selection (9) and some of these changes may not be directly linked to the resistance phenotype studied. These expression results confirm, however that there are several mechanisms outside gene amplification that can lead to RNA

overexpression despite the fact that this protozoan parasite is devoid of classical RNA polymerase II promoters.

In our study of antimony resistant *L. tarentolae*, cysteine, glutathione and in particular trypanothione were found to be increased (16, 22). Co-transfection of glutathione biosynthesis genes and MRPA were shown to be synergistic when in the right background (13, 20). In *L. infantum*, the baseline levels of trypanothione are much higher (50-fold) than in *L. tarentolae* (5 versus 0.1 nmol./10⁶ cells). An increase in trypanothione levels may therefore not be as essential in *L. infantum* for achieving resistance to antimonials, although it is worth pointing out that cysteine is increased. Thiols are nonetheless required for MRPA-mediated resistance, since treatment with BSO, a known specific inhibitor of glutathione biosynthesis, reverses MRPA mediated resistance inside macrophages (Fig. 6B). Treatment with BSO was shown previously to reduce resistance to antimonials in vitro (17) but also in vivo (5). It is possible that BSO affects the thiol levels of both the macrophage and the parasite and the collective effect would be decreased resistance to SbV mediated by MRPA.

A major finding of this study consists in the ability of MRPA to confer SbV resistance inside macrophages. The fold increase in resistance is quite impressive (Fig. 6) when taking into account that MRPA has a relatively modest effect in axenic amastigotes (Fig. 4A) or in promastigotes (23). It is possible that resistance is better achieved in the intracellular stage of the parasite or that the exquisite sensitivity of *L. panamensis* to SbV make it an ideal model. The fold resistance to SbV mediated by MRPA (Fig. 6A) is similar to the fold increase resistance observed with Sb2000.1 (Fig. 1) despite that these cells are much more resistant to SbIII than MRPA transfectants. It is thus possible that the intracellular assay may not be quantitative and may only provide qualitative information on whether a strain is sensitive or resistant. Nonetheless, the intracellular assay has showed that it can correlate well with the clinical responses (21). Thus, if MRPA overexpressing strains are present in the field, our results would suggest that these will be resistant to SbV. One possible way to circumvent resistance would be to provide a combination therapy consisting of SbV and BSO, a combination that was shown useful in animal models on field isolates with unknown genetic background (5).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded in part by CIHR group and operating grants to M.O, and through a Wellcome Trust-Burroughs Wellcome Fund new initiative in infectious diseases program grant to M.O and NGS. K EF. is a "Strategic Training Fellow of the Strategic Training Program in Microbial Resistance, a partnership of the CIHR Institute of Infection and Immunity and the Fonds de Recherche en Santé du Québec". PL is the recipient of a CIHR studentship and GC of NSERC and FRSQ studentships. BP is a Burroughs Wellcome Fund New Investigator in Molecular parasitology and is an FRSQ senior investigator. M.O is a Burroughs Wellcome Fund Scholar in Molecular Parasitology and holds a Canada Research Chair in Antimicrobialresistance.

REFERENCES

1. **Barker, K. S., S. Crisp, N. Wiederhold, R. E. Lewis, B. Bareither, J. Eckstein, R. Barbuch, M. Bard, and P. D. Rogers.** 2004. Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* **54**:376-385.
2. **Beverley, S. M.** 1991. Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* **45**:417-44.
3. **Borst, P., and M. Ouellette.** 1995. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* **49**:427-60.
4. **Brochu, C., J. Wang, G. Roy, N. Messier, X. Y. Wang, N. G. Saravia, and M. Ouellette.** 2003. Antimony Uptake Systems in the Protozoan Parasite *Leishmania* and Accumulation Differences in Antimony-Resistant Parasites. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3073-3079.
5. **Carter, K. C., S. Sundar, C. Spickett, O. C. Pereira, and A. B. Mullen.** 2003. The In Vivo Susceptibility of *Leishmania donovani* to Sodium Stibogluconate Is Drug Specific and Can Be Reversed by Inhibiting Glutathione Biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1529-1535.
6. **Cowen, L. E., A. Nantel, M. S. Whiteway, D. Y. Thomas, D. C. Tessier, L. M. Kohn, and J. B. Anderson.** 2002. Population genomics of drug resistance in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:9284-9.
7. **Denton, H., J. C. McGregor, and G. H. Coombs.** 2004. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem J* **381**:405-12.
8. **Dey, S., M. Ouellette, J. Lightbody, B. Papadopoulou, and B. P. Rosen.** 1996. An ATP-dependent As(III)-glutathione transport system in membrane vesicles of *Leishmania tarentolae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:2192-7.
9. **Drummel-Smith, J., I. Girard, N. Trudel, and M. Ouellette.** 2004. Differential protein expression analysis of *Leishmania major* reveals novel roles for methionine

- adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in methotrexate resistance. *J Biol Chem* **279**:33273-80.
10. **El Fadili, A., D. Richard, C. Kundig, and M. Ouellette.** 2003. Effect of polyglutamylation of methotrexate on its accumulation and the development of resistance in the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochem Pharmacol* **66**:999-1008.
 11. **Fairlamb, A. H., and A. Cerami.** 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol* **46**:695-729.
 12. **Gourbal, B., N. Sonuc, H. Bhattacharjee, D. Legare, S. Sundar, M. Ouellette, B. P. Rosen, and R. Mukhopadhyay.** 2004. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem* **279**:31010-7.
 13. **Gronzin, K., A. Haimeur, R. Mukhopadhyay, B. P. Rosen, and M. Ouellette.** 1997. Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene *gsh1* and of the ABC transporter gene *pgpA* in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*. *Embo J* **16**:3057-65.
 14. **Guerin, P. J., P. Olliaro, S. Sundar, M. Boelaert, S. L. Croft, P. Desjeux, M. K. Wasunna, and A. D. Bryceson.** 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* **2**:494-501.
 15. **Guimond, C., N. Trudel, C. Brochu, N. Marquis, A. E. Fadili, R. Peytavi, G. Briand, D. Richard, N. Messier, B. Papadopoulou, J. Corbeil, M. G. Bergeron, D. Legare, and M. Ouellette.** 2003. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* **31**:5886-96.
 16. **Haimeur, A., C. Brochu, P. Genest, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 2000. Amplification of the ABC transporter gene *PGPA* and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol* **108**:131-135.
 17. **Haimeur, A., C. Guimond, S. Pilote, R. Mukhopadhyay, B. P. Rosen, R. Poulin, and M. Ouellette.** 1999. Elevated levels of polyamines and trypanothione resulting from overexpression of the ornithine decarboxylase gene in arsenite-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol* **34**:726-735.
 18. **Herwaldt, B. L.** 1999. Leishmaniasis. *Lancet* **354**:1191-9.

19. **Légaré, D., B. Papadopoulou, G. Roy, R. Mukhopadhyay, A. Haimeur, S. Dey, K. Grondin, C. Brochu, B. P. Rosen, and M. Ouellette.** 1997. Efflux systems and increased trypanothione levels in arsenite-resistant *Leishmania*. *Exp Parasitol* **87**:275-82.
20. **Légaré, D., D. Richard, R. Mukhopadhyay, Y. D. Stierhof, B. P. Rosen, A. Haimeur, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 2001. The *Leishmania* ABC protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem* **276**:26301-26307.
21. **Lira, R., S. Sundar, A. Makharia, R. Kenney, A. Gam, E. Saraiva, and D. Sacks.** 1999. Evidence that the High Incidence of Treatment Failures in Indian Kala- Azar Is Due to the Emergence of Antimony-Resistant Strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis* **180**:564-567.
22. **Mukhopadhyay, R., S. Dey, N. Xu, D. Gage, J. Lightbody, M. Ouellette, and B. P. Rosen.** 1996. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:10383-7.
23. **Papadopoulou, B., G. Roy, S. Dey, B. P. Rosen, and M. Ouellette.** 1994. Contribution of the *Leishmania* P-glycoprotein-related gene *ltgpA* to oxyanion resistance. *J Biol Chem* **269**:11980-6.
24. **Perez-Victoria, F. J., F. Gamarro, M. Ouellette, and S. Castanys.** 2003. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem* **278**:49965-71. Epub 2003 Sep 27.
25. **Roy, G., C. Dumas, D. Sereno, Y. Wu, A. K. Singh, M. J. Tremblay, M. Ouellette, M. Olivier, and B. Papadopoulou.** 2000. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models [In Process Citation]. *Mol Biochem Parasitol* **110**:195-206.
26. **Santos Ferreira, C., P. S. Martins, C. Demicheli, C. Brochu, M. Ouellette, and F. Frezard.** 2003. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biometals* **16**:441-6.
27. **Sereno, D., and J. L. Lemesre.** 1997. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:972-6.

28. **Sereno, D., G. Roy, J. L. Lemesre, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 2001. DNA Transformation of *Leishmania infantum* Axenic Amastigotes and Their Use in Drug Screening. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1168-1173.
29. **Shaked-Mishan, P., N. Ulrich, M. Ephros, and D. Zilberstein.** 2001. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* **276**:3971-6.
30. **Singh, N., R. T. Singh, and S. Sundar.** 2003. Novel mechanism of drug resistance in kala azar field isolates. *J Infect Dis* **188**:600-7.
31. **Sundar, S., T. K. Jha, C. P. Thakur, J. Engel, H. Sindermann, C. Fischer, K. Junge, A. Bryceson, and J. Berman.** 2002. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* **347**:1739-46.
32. **Sundar, S., H. Mehta, A. V. Suresh, S. P. Singh, M. Rai, and H. W. Murray.** 2004. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. *Clin Infect Dis* **38**:377-83. Epub 2004 Jan 13.
33. **Sundar, S., D. K. More, M. K. Singh, V. P. Singh, S. Sharma, A. Makharia, P. C. Kumar, and H. W. Murray.** 2000. Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India: Report from the Center of the Indian Epidemic. *Clin Infect Dis* **31**:1104-1107.
34. **Wu, Y., Y. El Fakhry, D. Sereno, S. Tamar, and B. Papadopoulou.** 2000. A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol Biochem Parasitol* **110**:345-57.
35. **Zhou, Y., N. Messier, M. Ouellette, B. P. Rosen, and R. Mukhopadhyay.** 2004. *Leishmania major* LmACR2 Is a Pentavalent Antimony Reductase That Confers Sensitivity to the Drug Pentostam. *J Biol Chem* **279**:37445-51.
36. **Zilberstein, D., and M. Shapira.** 1994. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* **48**:449-70.

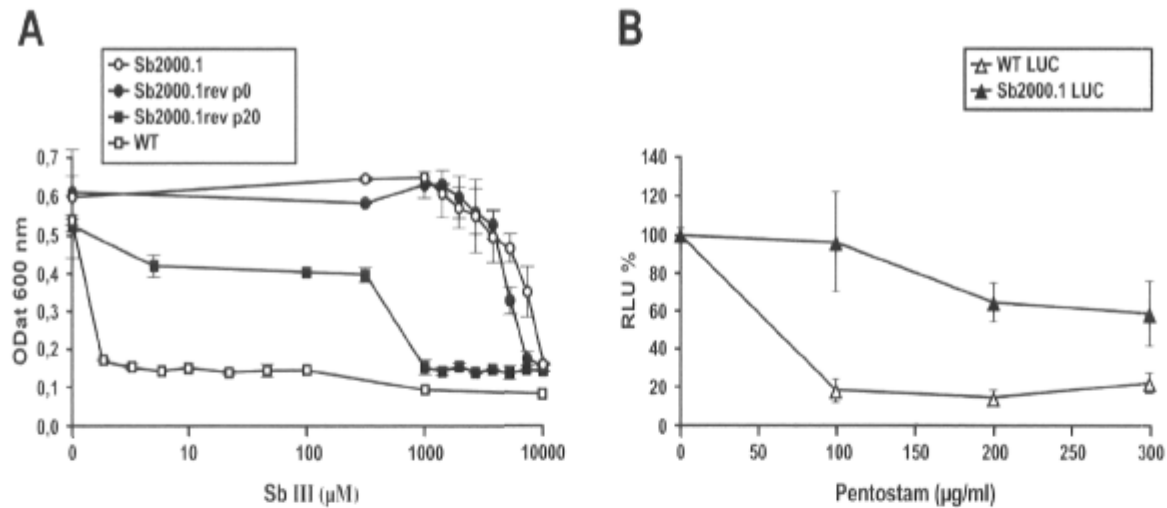


Figure 1. Susceptibility of *L. infantum* amastigotes to antimonials. (A) Growth curve of *L. infantum* axenic amastigotes in the MAA medium in the presence of potassium antimonyl tartrate. (B) Intracellular survival of *L. infantum* axenic amastigotes infecting THP-1 cells in the presence of Pentostam. (□), *L. infantum* wild-type; (○), *L. infantum* Sb2000.1; (●), *L. infantum* Sb2000.1 grown for one passage in absence of selection; (■), *L. infantum* Sb2000.1 grown for 20 passages in absence of selection; (△) *L. infantum* wild-type transfected with 1.2 LUC α NEO α ; (▲) *L. infantum* Sb2000.1 transfected with 1.2 LUC α NEO α .

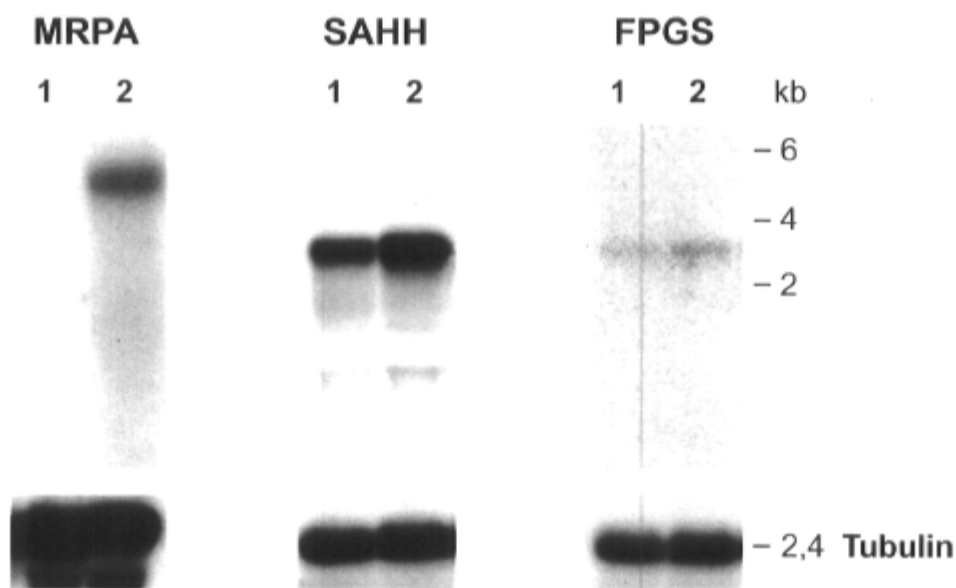


Figure 2. Analysis of gene expression in *L. infantum* Sb2000.1 by Northern blot analysis. Total RNA from *L. infantum* was hybridized to DNA probes recognizing the genes coding for the ABC transporter MRPA, the S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) and foyllypolyglutamate synthase (FPGS). Hybridizations with a DNA probe covering the α tubulin gene was done to monitor the amount of RNA layered. Sizes were derived from an RNA ladder. 1, *Leishmania infantum* wild-type cell; 2, *L. infantum* Sb 2000.1.

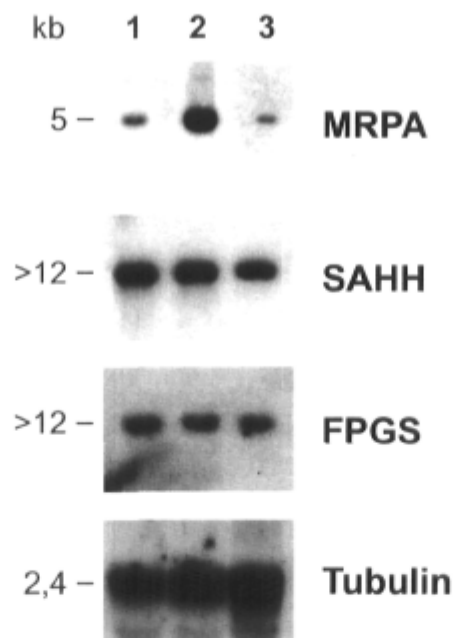


Figure 3. Analysis of DNA copy number in *L. infantum* Sb2000.1 as determined by Southern blot analysis. The DNAs of the parasites were isolated, digested with *Xho*I for the blots hybridized to the *MRPA* probe and with *Eco*RI for the blots hybridized with the *SAHH* and *FPGS* probes. DNA loading was monitored by hybridization with an α -tubulin probe 1, *L. infantum* wild-type ; 2, *L. infantum* Sb 2000.1; 3, *L. infantum* SbIII 2000.1 revertant grown in absence of drug for 20 passages. The sizes of the hybridizing bands were determined using a DNA 1kb ladder.

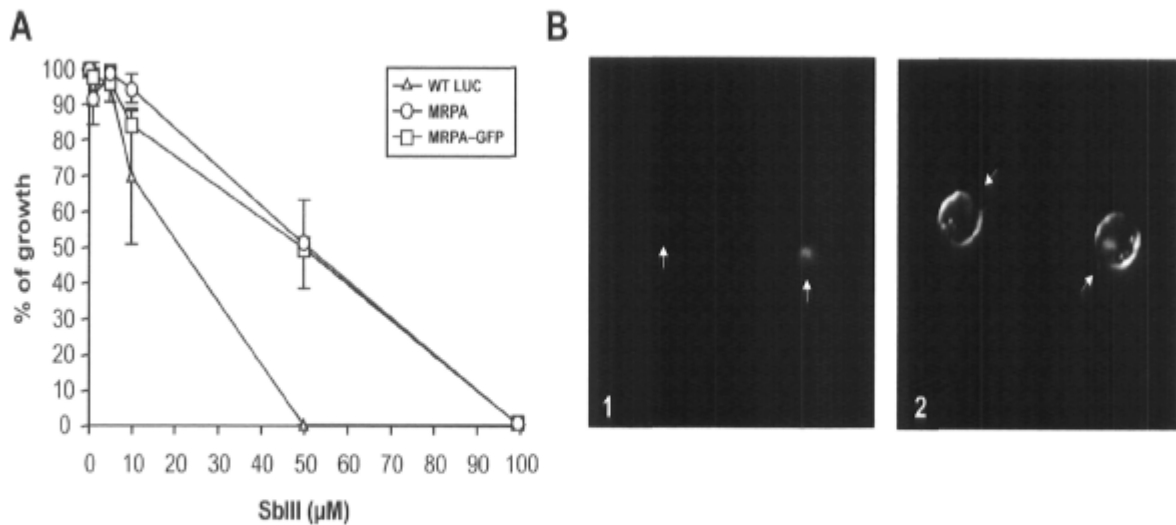


Figure 4. MRPA is an intracellular ABC transporter that confers antimony resistance in *L. infantum* axenic amastigotes. (A) Transfection of *MRPA* in *L. infantum* axenic amastigotes leads to Sb(III) resistance. (Δ), *L. infantum* transfected with the vector control 1.2LUC α NEO α , compared with *L. infantum* transfected with constructs containing *MRPA* (\circ) or *MRPA*-GFP (\square). (B) Localization of *MRPA*-GFP was studied by confocal microscopy in *L. infantum* axenic amastigotes. Lanes: 1, fluorescence only; 2, composite image of Nomarsky differential interference contrast and fluorescence.

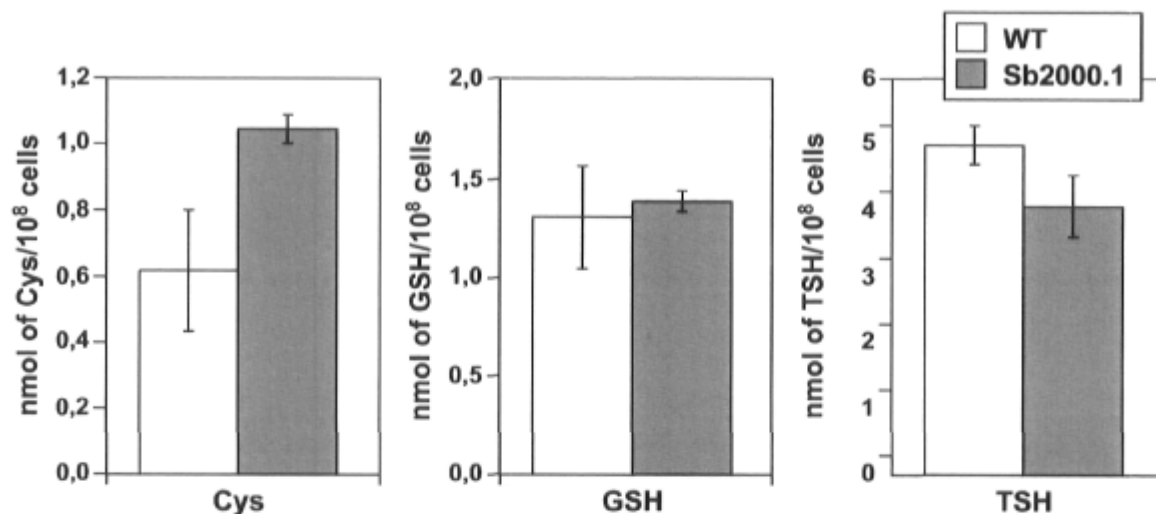


Figure 5. Quantification of intracellular cysteine, glutathione and trypanothione. Thiols of cells were prepared as described under material and methods and analyzed by HPLC. An average of triplicates is shown which has been repeated once with essentially the same results.

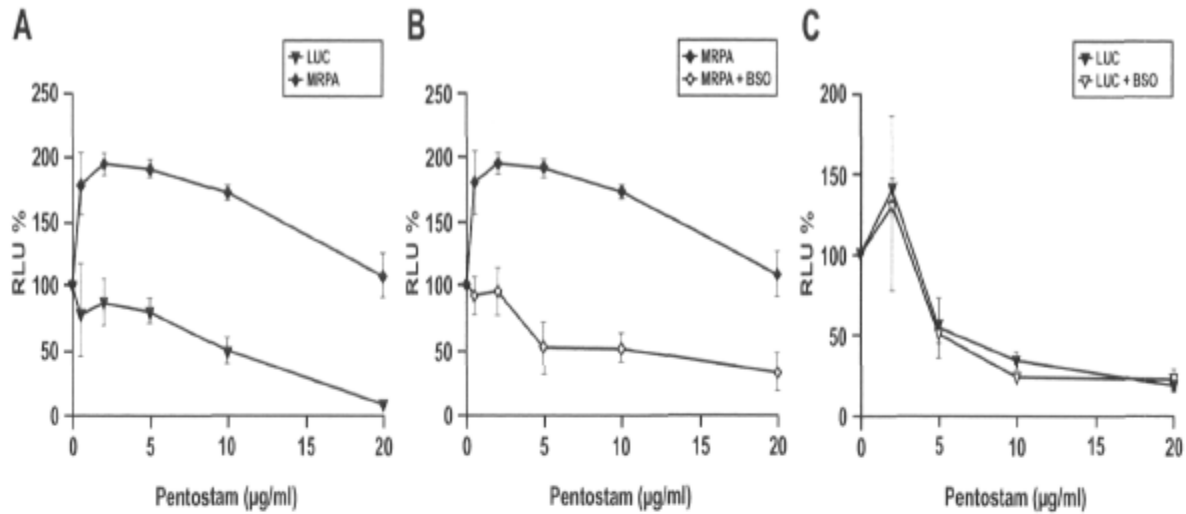


Figure 6. MRPA-mediated resistance in intracellular parasites and reversal using BSO. (A) *L. panamensis* strains transfected with MRPA (◆) and infecting macrophages are resistant to sodium stibogluconate, compared to transfected control cells (▼). (B) The glutathione-specific inhibitor BSO abrogated the resistance mediated by MRPA in intracellular parasites (◇). (C) Susceptibility of control *L. panamensis* cells transfected with pSP72 α neO α and 1.2 LUC HYG was not altered in the presence of BSO (▽).

Chapitre III

Down regulation of KMP-11 in *Leishmania infantum* axenic antimony resistant amastigotes as revealed by a proteomic screen

RÉSUMÉ

L'antimoine pentavalent est encore la principale drogue (SbV) pour le traitement de la leishmaniose, mais la résistance augmente dans différentes régions du monde. Les mécanismes de résistance sont connus en partie chez les isolats promastigotes du laboratoire, alors que chez les isolats amastigotes, ils restent inconnus. Nous décrivons ici l'analyse comparative par gels 2D de souches sensibles et résistantes à SbIII axéniques amastigotes. L'analyse nous a révélé l'expression différentielle de nombreuses protéines chez le résistant. Un nombre de protéines qui ont été détecté, n'ont jamais été associés à la résistance à l'antimoine. L'expression de la protéine phosphomannomutase est augmentée chez le mutant alors que l'expression de LACK est diminuée. La diminution de la production d'une protéine membranaire du kinetoplast KMP-11 a été observée chez ce mutant mais aussi chez d'autres mutants. Le rôle de KMP-11 dans la résistance devrait être complexe puisque la transfection et l'inactivation de ce gène n'ont pas montré de phénotype.

Down regulation of KMP-11 in *Leishmania infantum* axenic antimony resistant amastigotes as revealed by a proteomic screen.

Karima El Fadili, Jolyne Drummelsmith, Isabelle Girard, Gaétan Roy, Armando Jardim² and Marc Ouellette^{1*}.

¹Centre de Recherche en Infectiologie du Centre de Recherche du CHUQ and Division de Microbiologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada.

²Institute of Parasitology, McGill University, Montreal, Québec, Canada

*Corresponding author:

Marc Ouellette
Centre de Recherche en Infectiologie
CHUQ, pavillon CHUL
2705 boul. Laurier
Ste-Foy, Québec
Canada, G1V 4G2
tel.: 418-654 2705
fax: 418-654 2715
E-mail: marc.ouellette@crchul.ulaval.ca

ABSTRACT

The therapeutic mainstay against the protozoan parasite *Leishmania* is still based on the antiquated pentavalent antimonials (Sb(V)), but resistance is increasing in several parts of the world. Resistance is now partly understood in laboratory promastigotes isolates, but our understanding of resistance in amastigotes isolates is lagging behind. We describe here a comparative analysis of a genetically related pair of antimonial-sensitive and -resistant *Leishmania infantum* strains axenic amastigotes. A comparative proteomics screen has highlighted a number of proteins differentially expressed in the resistant parasite. A number of proteins were also detected that were never before associated with antimonial resistance. The expression of the protein phosphomannomutase was increased in the mutant while the expression of LACK was decreased. One protein, the kinetoplastid membrane protein KMP-11 was shown to be decreased in that mutant but also in several other mutants. The role of KMP-11 in resistance must be complex, however since transfection or allelic inactivation did not lead to a susceptibility phenotype.

INTRODUCTION

Human visceral leishmaniasis or kala-azar is a severe and frequently lethal parasitic disease. More than 500,000 new human kala-azar cases are registered annually, most of them (90%) in India, Sudan, Bangladesh and Brazil (23, 32). Its etiological agents are *Leishmania donovani*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania infantum*. These parasites exhibit a dimorphic life cycle, consisting of extracellular promastigotes that reside within the midgut of the sand fly vector, and intracellular amastigotes that reside within the phagolysosome of host macrophages. An effective vaccine against leishmaniasis is not available, and chemotherapy is the only effective way to treat all forms of the diseases. Throughout the world, pentavalent antimony (SbV) containing drugs have been the first-line of treatment for more than 50 years. However, in recent years, an increase in clinical resistance to SbV has been reported (16, 20, 28). In India, as many as 65% of previously untreated patients failed to respond promptly or relapse after therapy with antimony drugs, due to the development of drug resistance (42). Understanding drug resistance is crucial for the future control of leishmaniasis.

Recent insights suggest that drug resistance comprises at least the following features. Firstly, the active form of the drug is the trivalent form (SbIII) of the metal. The reduction of SbV to SbIII may take place either in the host macrophage (36) or in the parasite *Leishmania* (39) as enzymes that could potentially carry out this reduction have been characterized (9, 45). If the latter were the case, reduction or loss of reductase activity may lead to drug resistance. Secondly, the route of entry of SbV is not known, but reduced uptake could also lead to resistance and cells selected for SbIII resistance showed a reduction in the steady-state accumulation of metal (4). This appears to be mediated by down regulation of the expression of the aquaglyceroporin AQP1 (29). Thirdly, increased levels of trypanothione (TSH), the major reduced thiol of *Leishmania* cells (15), are found in cells selected for resistance to SbIII (21). This increase is caused by amplification of the γ -glutamylcysteine synthase (GSH1) gene (19) and overexpression of the ornithine decarboxylase (ODC) gene (22), which are both involved in TSH biosynthesis. This also seems to be the case with field isolates (30, 31). Fourthly, the *Leishmania* ATP-binding cassette (ABC) transporter MRPA confers resistance by sequestering an antimony thiol conjugate

into an intracellular organelle (14, 27). This does not exclude that the parasite has other mechanisms that contribute to the metal resistance phenotype.

Most of the molecular and biochemical mechanisms underlying drug resistance were elucidated so far in promastigotes. It remains to be established whether comparable mechanisms are present in the amastigote stage of the parasite and preliminary results suggest that this can indeed be the case (14). Indeed, we selected under axenic conditions Sb(III)-resistant amastigotes of *L. infantum* by direct drug pressure. Resistance in these cells was found to be complex and included amplification of MRPA and increased thiol levels (14). Transfection of MRPA explained only a small fraction of the resistance phenotype in mutant Sb2000.1, however (14). This has prompted us to perform a more detailed comparison of this mutant using two-dimensional gel electrophoresis analysis. The screen for differentially expressed proteins in axenic amastigote *L. infantum* Sb2000.1 indicated a number of proteins that were differentially expressed upon SbIII resistance. Work on selected proteins will be presented with emphasis on the kinetoplastid membrane protein 11 (KMP-11).

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

L. infantum (MHOM/MA/67/ITMAP-263) was maintained as axenic amastigotes at 37°C with 5% CO₂ in MAA/20 (medium for axenically growing amastigotes) at pH 5.8 in 25-cm² flasks (37). The promastigote forms of *L. infantum* were grown in the same medium at pH 7.0 at 25°C. Growth curves of control strains and transfectants in the presence of drugs were obtained by measuring absorbance at 600 nm using an automated microplate reader (Organon Teknica microwell system). An axenic *L. infantum* cell line was selected for Sb(III) resistance (potassium antimonyl tartrate hydrate; Aldrich Chemical) (14). Promastigotes of *L. infantum* cell line were also selected for Sb(III) resistance by step-wise selection until we obtained the mutant *L. infantum* Sb 4000.4 and Sb4000.5, which were resistant to 4,000 μM. The mutants are considerably more resistant than the sensitive *L. infantum* WT promastigote (EC₅₀ 200μM).

Two Dimensional Sample Preparation and Electrophoresis

Cultures on axenic amastigotes were grown to late log phase as determined by optical density at 600 nm. Cells were harvested by centrifugation at 2500 g, washed twice in HEPES-NaCl buffer, and resuspended in two-dimensional lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 40 mM Tris, 4% CHAPS, 0.1 mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride). Lysis was allowed to proceed for 2 h at room temperature, and samples were centrifuged to remove insoluble material. Protein concentration was assayed using the 2D Quant Kit (Amersham Biosciences). Proteins were separated into aliquots and stored at -80 °C.

Samples were run on 18-cm Immobiline Dry-Strips (Amersham Biosciences) in the first dimension on an IPGPhor isoelectric focusing system as recommended by the manufacturer. Strips were equilibrated in buffer (50 mM Tris-Cl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, trace of bromphenol blue) containing 10 mg/ml dithiothreitol for 15 min and then in equilibration buffer containing 25 mg/ml iodoacetamide for 15 min and sealed to 12% acrylamide gels using 0.5% agarose in standard Tris-glycine electrophoresis buffer. Second

dimension SDS PAGE was run in a Hoefer DALT apparatus (Amersham Biosciences) at 40 mA/gel and 15 °C until the tracking dye was run off the gel.

Gel Staining, Imaging, and Image Analysis

Proteins were visualized by Sypro Ruby fluorescence (Molecular Dynamics). Gels were fixed overnight in 40% methanol, 7% acetic acid. Gels were stained overnight and then destained in 10% methanol, 7% acetic acid for 3 x 1 h. Gels were imaged with the ProXpress scanner (PerkinElmer Life Sciences) at 100- μ m resolution using 480-nm excitation and 620-nm emission filters. Two-dimensional gels of three independent samples per strain or conditions were averaged and compared using Progenesis software (Nonlinear Dynamics). Significance of differences observed was determined by the Student's two-tailed *t* test in Microsoft Excel.

Mass Spectrometry

Gel plugs containing the proteins of interest were excised using a ProXcision robot (Perkin Elmer) and sent for LC-MS/MS analyses (Eastern Quebec Proteomics Centre, Centre Hospitalier de l'Université Laval, Québec). Gel plugs were placed in 96-well plates and washed with water. Tryptic digestions were performed on a MassPrep liquid handling robot (Micromass) according to the manufacturer's specifications and using sequencing grade modified trypsin (Promega). After extraction from the gel into 50% ACN/water, peptides were lyophilized in a speed vacuum and resuspended in 10 mL of 0.1% formic acid solution. Peptide MS/MS spectra were obtained by capillary liquid chromatography coupled to an LCQ DecaXP (Thermo-Finnigan, San Jose, CA, USA) quadrupole IT mass spectrometer with a nanospray interface as described previously [Drummel-Smith, 2003 #1182]. Resulting MS/MS spectra were interpreted using MASCOT (Eng et al., 1994) and searched against *Leishmania* proteins in the GeneDB Leishpep database (version dating from April 27, 2004, containing 8081 sequences and 5,170,567 residues) generated by annotation of *Leishmania major* Friedlin sequence (GeneDB, www.genedb.org). Carbamidomethylation of cysteine and partial oxidation of methionine, two missed cleavages, and an error tolerance of 2.0 Da for peptides and 0.5 Da for fragments were considered in the searches. A peptide was considered a good match if it produced a MASCOT score greater than 35, and the cut-off calculated by the software as indicating identity or extensive homology at $p < 0.05$. A protein was considered a good match if at least two peptides were confidently identified.

Confident identification of a peptide required a cross-correlation score of 1.9, 2.5, and 3.7 for singly, doubly, and triply charged peptides, respectively. Each peptide identification was confirmed by manual inspection of the spectrum. Due to the current incomplete nature of the *L. infantum* peptide database, homologous *L. major* database designations are used here where they exist.

DNA constructs and transfections. Genes of interest were amplified by PCR from *L. infantum* genomic DNA using the Expand High Fidelity polymerase (Roche Applied Science). PCR amplifications were performed using modified primers bearing HindIII and XbaI or BamHI and XbaI restriction sites on forward and reverse primers, respectively: for KMP-11 forward, 5-ACGAAGCTTGATATGGCCACCACGTACG-3 and, KMP-11 reverse, 5-CATCTAGATTACTTGGATGGGTACTGCG-3; for LACK forward, 5-CAGAAGCTTCGGCTTGGATCCATGAAC-3 and LACK reverse, 5-GACTCTAGATTACTCGGCGTCGGAGAT-3; for PMM forward, 5-TCTGCGGATCCGCATGACCTCCAAGGTTATT-3 and, PMM reverse 5-GCTCTAGAGCTCACCGCGACTCCTCGAG-3. The PCR fragments were cloned in pGEM T-easy vector (Invitrogen), digested with XbaI and HindIII (for KMP-11 and LACK) or XbaI and BamHI (for PMM). The resulting constructs were inserted into either the *Leishmania* expression vector pSP72 α NEO α (for LACK and PMM) and for KMP-11 (pGEM7ZF α NEO α or pSP72 α BLAST α). Each construction was verified by restriction digests and by sequencing. The resulting plasmids were transfected into *L. infantum* by electroporation as previously described (38).

Disruption of L. infantum KMP-11— Constructs have been made containing NEO and HYG markers in expression vector pX63 (as described in (6)) for inactivation of the tandemly organized KMP-11 genes. An 1819-bp fragment with 1040-bp upstream (HindIII-SalI) and 779-bp downstream (SacI-BglII) sequences of *KMP-11* was cloned from *L. infantum* total DNA by PCR. A 786-bp sequence of *KMP-11* was replaced with a neomycin or hygromycin cassette. The fragment containing the neomycin or hygromycin cassettes were linearized and transfected into wild type *L. infantum* promastigotes. Clones resistant to geneticin (G418) or hygromycin B were selected. Total DNA was digested with XhoI or HindIII and analyzed by Southern blotting (35),

with a DNA probe consisting of the 5' flanking region of *KMP-11* and a second one specific to the neomycin or hygromycin cassette (see Fig. 7A).

Western Blot for KMP-1

Cells were solubilized in Laemmli SDS-PAGE sample buffer and separated on 12% acrylamide gels. Gels were blotted to nitrocellulose membranes (43). The protein blot filter paper was incubated in 1XPBS, 5% nonfat milk, 0.2% Tween and 1:1000 dilution of a monoclonal anti-*Leishmania* KMP-11 antibody (CEDARLANE® Laboratories Limited) for 1h30 hours. The filter paper was washed with 1XPBS containing 0.1% Tween, incubated with a 1:10000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated goat antimouse IgG (Bio-Rad, Hercules) in 1XPBS plus 5% nonfat milk for 1 hour, washed again with PBS, and then subjected to autoradiography in the presence of an enhanced chemiluminescent substrate (Pierce).

Southern and Northern blot analysis Nucleic acid isolation was performed using either DNazol or Trizol reagent (Invitrogen). Southern and Northern blots analyses were performed by following standard protocols (35). Probes were made from polymerase chain reaction (PCR) fragments. The RNA levels were quantified by densitometry using an Alpha-Imager 2000 (Documentation and Analysis System, Alpha Innotech, Corporation).

RESULTS

Comparative Two-dimensional Gel Electrophoresis Analysis of *L. infantum* axenic amastigote cells sensitive and resistant to SbIII.

The mutant *L. infantum* Sb2000.1 was derived from a wild-type axenic amastigote cell selected for resistance to SbIII. This strain was able to grow in 2,000 μ M of SbIII, whereas the EC₅₀ for the wild type strain is ~20 μ M (14). A proteomic screen was carried out in order to find novel proteins implicated in resistance. Gels of three independent samples were run and averaged and compared using the two-dimensional gel analysis software package Progenesis. Representative gels of one of different pH ranges analyzed, pH 5.0–6.0, are shown in Fig. 1A and some of the pinpointed proteins in Fig. 1B. The Progenesis software identified 1725 protein spots in the samples derived from wild-type cells. Six protein spots were unique to WT; and 54 spots were differentially expressed. The same strategy has allowed the detection of 1537 protein spots in the Sb2000.1 mutant, 21(1.4%) were differentially expressed in the mutant Sb2000.1 compared to wild-type cells. Several of the protein spots were sent to MS/MS analysis and 11 of them were identified (Table1). The most highly overexpressed protein corresponded to the arginosuccinate synthase ARGG. ARGG is physically linked to MRPA and MRPA is known to be amplified in this mutant, thus providing an explanation for ARGG overexpression. However, some proteins (Fig.1B) never associated before with antimony resistance and have been pinpointed. KMP-11 and LACK, are down-regulated while PMM is up-regulated in the mutant Sb2000.1 (Table1).

By 2D- gel analysis, we found a number of proteins differentially expressed in *L. infantum* axenic amastigote Sb2000.1 (Table1). Antibodies against KMP-11 are commercially available and have allowed the validation of the proteomic data by Western blotting. KMP-11 is a ubiquitous and abundant protein, mainly located in the flagellum and the flagellar pocket of different species of kinetoplastids (24, 41). The anti-KMP-11 antibody recognized a protein of 11 kDa (the predicted size of KMP-11) in WT and the mutant Sb2000.1 axenic amastigotes and promastigotes (Fig.2). The production of this protein is decreased in Sb2000.1 axenic amastigotes (see Fig.2, lanes 1 and 2), hence confirming the 2D-gels analysis. The protein KMP-11 seems

also to be decreased in the promastigote form of the mutant Sb2000.1 (Fig.2, lanes 3 and 4) albeit not as much as in the axenic amastigote form.

Northern blot analysis indicated that the down regulation of the KMP-11 protein is not caused by a decrease in RNA as determined by Northern blot (Fig.3A). PMM is an example of a protein whose expression is increased in the mutant (Table.1) but also this does not seem to be due to a change in steady-state RNA levels (Fig.3B). While LACK protein levels differ in resistant isolates (Table1) the level of RNAs between sensitive and resistant isolates were similar (not shown).

Down regulation of KMP-11 expression is a common feature in SbIII resistant mutants

Western blot analysis indicated that KMP-11 is down regulated in the mutant Sb2000.1. We generated two independent mutants, *L. infantum* Sb4000.4 and Sb4000.5, resistant to SbIII. We found that the expression of the KMP-11 protein was also down regulated in both mutants Sb4000.4 and Sb4000.5 (see Fig.4, lane 1, 2 and 4). This result shows that down-regulation of KMP-11 is a common feature in SbIII resistant mutants and this may suggest that it is directly implicated in the resistance phenotype in *Leishmania*.

Role of KMP-11 in SbIII resistance as determined by gene transfection and gene disruption.

The KMP-11 protein is down regulated in several SbIII resistant cells (Figs. 2,4). To test for its role in resistance, we transfected the gene in wild-type and SbIII resistant cells. One could have predicted that transfection in a resistant isolate may have decreased resistance. Transfection of the gene led to an overproduced protein (Fig. 2 lane 5 and Fig. 4 lane 3 and 5). However no change in SbIII susceptibility was observed in KMP-11 transfectant *L. infantum* wild-type cells being either promastigote (Fig. 5A) or amastigote (Fig. 5B) or in *L. infantum* Sb4000.4 or Sb4000.5 (Fig. 6A and B). All our attempts to link LACK or PMM transfectants to the SbIII resistant susceptibility phenotype also failed (results not shown).

Another strategy to study the putative role of KMP-11 in SbIII resistance was to generate a knock out cell line. We made NEO and HYG containing cassettes to disrupt KMP-11. There are three tandem copies of the gene in *L. infantum* and we thus attempted to inactivate the three

copies at once. The second and third copy have identical ORFs but there are 3 amino acids difference in the first ORF. Integration of the HYG or NEO cassettes should yield an 8.9kb XhoI-XhoI band by hybridizing to NEO or HYG probes and the Southern blots shown are consistent with these integrations (see Fig. 7 lane 2 and 3). While the XhoI-XhoI 5'upstream fragment is 2.4kb in the wild type cell upon integration of the NEO or HYG cassettes, one allele is rearranged leading to XhoI-XhoI site of 1.8kb which hybridize to an upstream probe (Fig.7, 5'UTR probe). Similarly the downstream XhoI site is 4.3kb in wild-type cells and upon integration of the NEO or HYG cassettes, one allele changes in size to 8.9kb (Fig. 7A,B lanes 2-3). We have attempted to generate a double knock out and indeed we had transfectant with the correct integration of NEO and HYG but at least one allele was intact as indicated by the presence of 2.4 and 4.3kb XhoI-XhoI fragment still hybridizing with upstream and downstream probes (Fig. 7A,B lanes 4). This is likely due to the emergence of polyploidy at the targeted locus, a well known phenomenon in *Leishmania* for reputed essential genes (7, 13). The single and double KMP-11 disrupted alleles were also analyzed by digestion with HindIII-HindIII or NcoI-NcoI and results were also consistent with recombination of the NEO and HYG cassettes in the appropriate KMP-11 (results not shown).

According to the expression pattern of KMP-11 expression in *L. infantum* Sb2000.1 (Fig. 2, 4) it could be possible that a cell with one allele less of KMP-11 could become less susceptible to SbIII. KMP-11 single knockout cells were similarly susceptible to SbIII as control wild-type cells transfected with the same drug resistance markers (Fig.8A). Interestingly the double NEO/HYG disruptants, despite still having a third intact allele, was shown to be more resistant to SbIII (Fig. 8A). To try to see whether this phenotype was due to KMP-11 gene inactivation, we have attempted to rescue the phenotype by introducing an episomal copy of one KMP-11 gene. Unfortunately this did not reversed the phenotype (Fig. 8B).

DISCUSSION

Resistance to antileishmanial containing drugs has been well established in lab induced resistant promastigote lines (reviewed in (5, 34)). Some of the genes highlighted in these studies such as MRPA were also shown in SbIII resistant *L. infantum* axenic amastigotes (14) and in clinical isolates (30, 31, 40). However other yet undiscovered resistance genes are present in either laboratory induced or clinical isolates of *Leishmania* (8, 44). Additional work and strategies are necessary to try to isolate the genes/proteins implicated in these novel resistance mechanisms. We used here a proteomic screen of SbIII resistant axenic amastigotes that are also SbV cross-resistant inside macrophages. Proteomic screens have been useful for the study of antimicrobial resistance in the protozoan parasite *Leishmania* (11, 12, 44). In this study we compared sensitive and SbIII resistant *L. infantum* and found a number of proteins that were differentially expressed (Table1).

Tubulins or fragments were detected but these are frequent in proteomic screens in *Leishmania* (11, 17) and are likely not to be involved in the phenotype studied here. There is a number of chaperonine and putative stress inducible proteins that were also detected and this can be expected in drug resistant cells. For example we showed that HSP70 (3) and HSP83 (44) are implicated in SbIII mediated susceptibility. A number of proteins were also detected that were never before associated with antimonial resistance. The expression of the protein phosphomannomutase was increased in the mutant while the expression of LACK was decreased (Table1). Our attempts to directly link these proteins to resistance have so far met with limited success but clearly further work is necessary to exclude any role in resistance. Indeed, some of these mutations may facilitate the emergence of resistance as we have demonstrated for S-adenosyl methionine transferase and methotrexate resistance (12). Resistance has a biological cost (reviewed in (1)) and it is also possible that some of these mutations are compensating for primary resistance mutation. Further work will be needed to test some of these hypotheses.

The availability of antibodies has allowed the remarkable observation that a decrease in KMP-11 expression was observed in three independent mutants. KMP-11 was first isolated as a major immunoreactive membrane glycoprotein (24). This protein was localised to the flagellar pocket and flagellar (2) and has been proposed to increase lipid bilayer pressure, stabilizing

molecules within the parasite membrane (25). It is thus possible that a reduction in KMP-11 expression may alter the interactions with transporters, such as the aquaglyceroporin (18) or with putative efflux systems (10) that may alter SbIII susceptibility. Interestingly, cells with two KMP-11 alleles disrupted are more resistant to SbIII (Fig. 8A). We were unfortunately unable to revert this phenotype by ectopic expression of KMP-11 (Fig.8B). Two qualifying remarks can be brought up, however. First complementation in *Leishmania* is rarely total and second there are 3 copies of KMP-11, two that are different and it is possible that a combination of different KMP-11 alleles will be required to revert the phenotype.

Overall this proteomic screen has allowed the detection of novel proteins whose expression is modulated upon the emergence of antimonial resistance. Intriguingly the expression of KMP-11 was down regulated in all the mutants studied and further work should reveal how it can be implicated in the resistance phenotype.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Vicky Brochu for the assistance for experimental aspects of this study. And this work was funded in part by the CIHR group and operating grants to M.O. and through a Wellcome Trust-Burroughs Wellcome Fund New Initiative in Infectious Diseases program grant to M.O. K.E.F. is a Strategic Training Fellow of the Strategic Training Program in Microbial Resistance, a partnership of the CIHR Institute of Infection and Immunity and the Fonds de Recherche en Santé du Québec. J. D was supported by a CIHR Postdoctoral Fellowship. M.O. is a Burroughs Wellcome Fund Scholar in Molecular Parasitology and holds a Canada Research Chair in Antimicrobial Resistance.

REFERENCES

1. **Andersson, D. I.** 2006. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr Opin Microbiol* **9**:461-5.
2. **Berberich, C., G. Machado, G. Morales, G. Carrillo, A. Jimenez-Ruiz, and C. Alonso.** 1998. The expression of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein is developmentally regulated and stage specific. *Biochim Biophys Acta* **1442**:230-7.
3. **Brochu, C., A. Haimeur, and M. Ouellette.** 2004. The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Stress Chaperones* **9**:294-303.
4. **Brochu, C., J. Wang, G. Roy, N. Messier, X. Y. Wang, N. G. Saravia, and M. Ouellette.** 2003. Antimony Uptake Systems in the Protozoan Parasite *Leishmania* and Accumulation Differences in Antimony-Resistant Parasites. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3073-3079.
5. **Croft, S. L., S. Sundar, and A. H. Fairlamb.** 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* **19**:111-26.
6. **Cruz, A., C. M. Coburn, and S. M. Beverley.** 1991. Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:7170-4.
7. **Cruz, A. K., R. Titus, and S. M. Beverley.** 1993. Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:1599-603.
8. **Decuypere, S., S. Rijal, V. Yardley, S. De Doncker, T. Laurent, B. Khanal, F. Chappuis, and J. C. Dujardin.** 2005. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4616-21.
9. **Denton, H., J. C. McGregor, and G. H. Coombs.** 2004. Reduction of antileishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol dependent reductase TDR1. *Biochem J* **1**.
10. **Dey, S., M. Ouellette, J. Lightbody, B. Papadopoulou, and B. P. Rosen.** 1996. An ATP-dependent As(III)-glutathione transport system in membrane vesicles of *Leishmania tarentolae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:2192-7.

11. **Drummel-Smith, J., V. Brochu, I. Girard, N. Messier, and M. Ouellette.** 2003. Proteome mapping of the protozoan parasite leishmania and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Mol Cell Proteomics* **2**:146-55.
12. **Drummel-Smith, J., I. Girard, N. Trudel, and M. Ouellette.** 2004. Differential protein expression analysis of *Leishmania major* reveals novel roles for methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in methotrexate resistance. *J Biol Chem* **279**:33273-80.
13. **Dumas, C., M. Ouellette, J. Tovar, M. L. Cunningham, A. H. Fairlamb, S. Tamar, M. Olivier, and B. Papadopolou.** 1997. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *Embo J* **16**:2590-8.
14. **El Fadili, K., N. Messier, P. Leprohon, G. Roy, C. Guimond, N. Trudel, N. G. Saravia, B. Papadopolou, D. Legare, and M. Ouellette.** 2005. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1988-93.
15. **Fairlamb, A. H., and A. Cerami.** 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol* **46**:695-729.
16. **Faraut-Gambarelli, F., R. Piarroux, M. Deniau, B. Giusiano, P. Marty, G. Michel, B. Faugere, and H. Dumon.** 1997. In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:827-30.
17. **Foucher, A. L., B. Papadopolou, and M. Ouellette.** 2006. Prefractionation by digitonin extraction increases representation of the cytosolic and intracellular proteome of *Leishmania infantum*. *J Proteome Res* **5**:1741-50.
18. **Gourbal, B., N. Sonuc, H. Bhattacharjee, D. Legare, S. Sundar, M. Ouellette, B. P. Rosen, and R. Mukhopadhyay.** 2004. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem* **279**:31010-7.
19. **Grondin, K., A. Haimeur, R. Mukhopadhyay, B. P. Rosen, and M. Ouellette.** 1997. Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene *gsh1* and of the ABC transporter gene *pgpA* in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*. *Embo J* **16**:3057-65.

20. **Hadighi, R., M. Mohebbali, P. Boucher, H. Hajjarian, A. Khamesipour, and M. Ouellette.** 2006. Unresponsiveness to Glucantime Treatment in Iranian Cutaneous Leishmaniasis due to Drug-Resistant *Leishmania tropica* Parasites. *PLoS Med* **3**:e162.
21. **Haimeur, A., C. Brochu, P. Genest, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 2000. Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol* **108**:131-135.
22. **Haimeur, A., C. Guimond, S. Pilote, R. Mukhopadhyay, B. P. Rosen, R. Poulin, and M. Ouellette.** 1999. Elevated levels of polyamines and trypanothione resulting from overexpression of the ornithine decarboxylase gene in arsenite- resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol* **34**:726-735.
23. **Herwaldt, B. L.** 1999. Leishmaniasis. *Lancet* **354**:1191-9.
24. **Jardim, A., V. Funk, R. M. Caprioli, and R. W. Olafson.** 1995. Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *Biochem J* **305** (Pt 1):307-13.
25. **Jardim, A., S. Hanson, B. Ullman, W. D. McCubbin, C. M. Kay, and R. W. Olafson.** 1995. Cloning and structure-function analysis of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *Biochem J* **305** (Pt 1):315-20.
26. **Keller, A., A. I. Nesvizhskii, E. Kolker, and R. Aebersold.** 2002. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* **74**:5383-92.
27. **Légaré, D., D. Richard, R. Mukhopadhyay, Y. D. Stierhof, B. P. Rosen, A. Haimeur, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 2001. The *Leishmania* ABC protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem* **276**:26301-26307.
28. **Lira, R., S. Sundar, A. Makharia, R. Kenney, A. Gam, E. Saraiva, and D. Sacks.** 1999. Evidence that the High Incidence of Treatment Failures in Indian Kala- Azar Is Due to the Emergence of Antimony-Resistant Strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis* **180**:564-567.
29. **Marquis, N., B. Gourbal, B. P. Rosen, R. Mukhopadhyay, and M. Ouellette.** 2005. Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol* **57**:1690-9.

30. **Mittal, M. K., S. Rai, Ashutosh, Ravinder, S. Gupta, S. Sundar, and N. Goyal.** 2007. Characterization of natural antimony resistance in leishmania donovani isolates. *Am J Trop Med Hyg* **76**:681-8.
31. **Mukherjee, A., P. K. Padmanabhan, S. Singh, G. Roy, I. Girard, M. Chatterjee, M. Ouellette, and R. Madhubala.** 2007. Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* **59**:204-11.
32. **Murray, H. W., J. Berman, C. R. Davies, and N. G. Saravia.** 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* **366**:1561-1577.
33. **Nesvizhskii, A. I., A. Keller, E. Kolker, and R. Aebersold.** 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **75**:4646-58.
34. **Ouellette, M., J. Drummelsmith, and B. Papadopoulou.** 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* **7**:257-66.
35. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning*, vol. Cold Spring Harbour laboratory, New York.
36. **Sereno, D., M. Cavaleyra, K. Zemzoumi, S. Maquaire, A. Ouaiissi, and J. L. Lemesre.** 1998. Axenically Grown Amastigotes of *Leishmania infantum* Used as an In Vitro Model To Investigate the Pentavalent Antimony Mode of Action. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:3097-3102.
37. **Sereno, D., and J. L. Lemesre.** 1997. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:972-6.
38. **Sereno, D., G. Roy, J. L. Lemesre, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 2001. DNA Transformation of *Leishmania infantum* Axenic Amastigotes and Their Use in Drug Screening. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1168-1173.
39. **Shaked-Mishan, P., N. Ulrich, M. Ephros, and D. Zilberstein.** 2001. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* **276**:3971-6.
40. **Singh, N., R. Almeida, H. Kothari, P. Kumar, G. Mandal, M. Chatterjee, S. Venkatachalam, M. K. Govind, S. K. Mandal, and S. Sundar.** 2007. Differential gene

expression analysis in antimony-unresponsive Indian kala azar (visceral leishmaniasis) clinical isolates by DNA microarray. *Parasitology*:1-11.

41. **Stebeck, C. E., R. P. Beecroft, B. N. Singh, A. Jardim, R. W. Olafson, C. Tuckey, K. D. Prenevost, and T. W. Pearson.** 1995. Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. *Mol Biochem Parasitol* **71**:1-13.
42. **Sundar, S.** 2001. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* **6**:849-54.
43. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**:145-9.
44. **Vergnes, B., B. Gourbal, I. Girard, S. Sundar, J. Drummel-Smith, and M. Ouellette.** 2007. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics* **6**:88-101.
45. **Zhou, Y., N. Messier, M. Ouellette, B. P. Rosen, and R. Mukhopadhyay.** 2004. *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. *J Biol Chem* **279**:37445-51.

Table 1. Proteins differentially expressed in *L. infantum* Sb 2000.1 axenic amastigote cells.

MS ID	Mr (exp/pred)	pl (exp/pred)	ID	Accession no.	No. unique peptide/%coverage	%Protein identification probability	Fold change
959	30/24	5.5/5.2	proteasome activator protein pa26, putative	LinJ35.0850	2/10	100	-2,8
960	40/34	5.5/6.4	LACK activated protein kinase c receptor (LACK)	LinJ28.2880	3/13	100	-2
968	38/50	4.9/4.5	beta tubulin	LinJ08.1170	5./13	100	-2,7
969	60/55	6.1/6.8	pyruvate kinase, putative	LinJ35.0090	4/12	100	-2,6
970	14./1 1	5.5/6.3	KMP11 kinetoplastid membrane protein-11	LinJ35.2280	1./10	94	-3
974	20/35	6/6.4	LACK activated protein kinase c receptor (LACK)	LinJ28.2870	1./3	99	-3,5
977	29/28	5.1/5.3	PMM phosphomannomutase, putative	LinJ36.4490	1./4	54	2
979	53/46	5.6/5.8	argininosuccinate synthase, putative	LinJ23.0300	2./5	100	3

Accession numbers are from the *L. infantum* GeneDB, version 300104. exp/pred, experimental/predicted. CRITERIA FOR PROTEIN IDENTIFICATION-- Scaffold (version Scaffold-01_06_19, Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 90.0% probability as specified by the Peptide Prophet algorithm (Keller, A et al Anal. Chem. 2002;74(20):5383-92). Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 50.0% probability and contained at least 1 identified peptides. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm (Nesvizhskii, AI Anal Chem. 2003 Sep 1;75(17):4646-58). Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony.

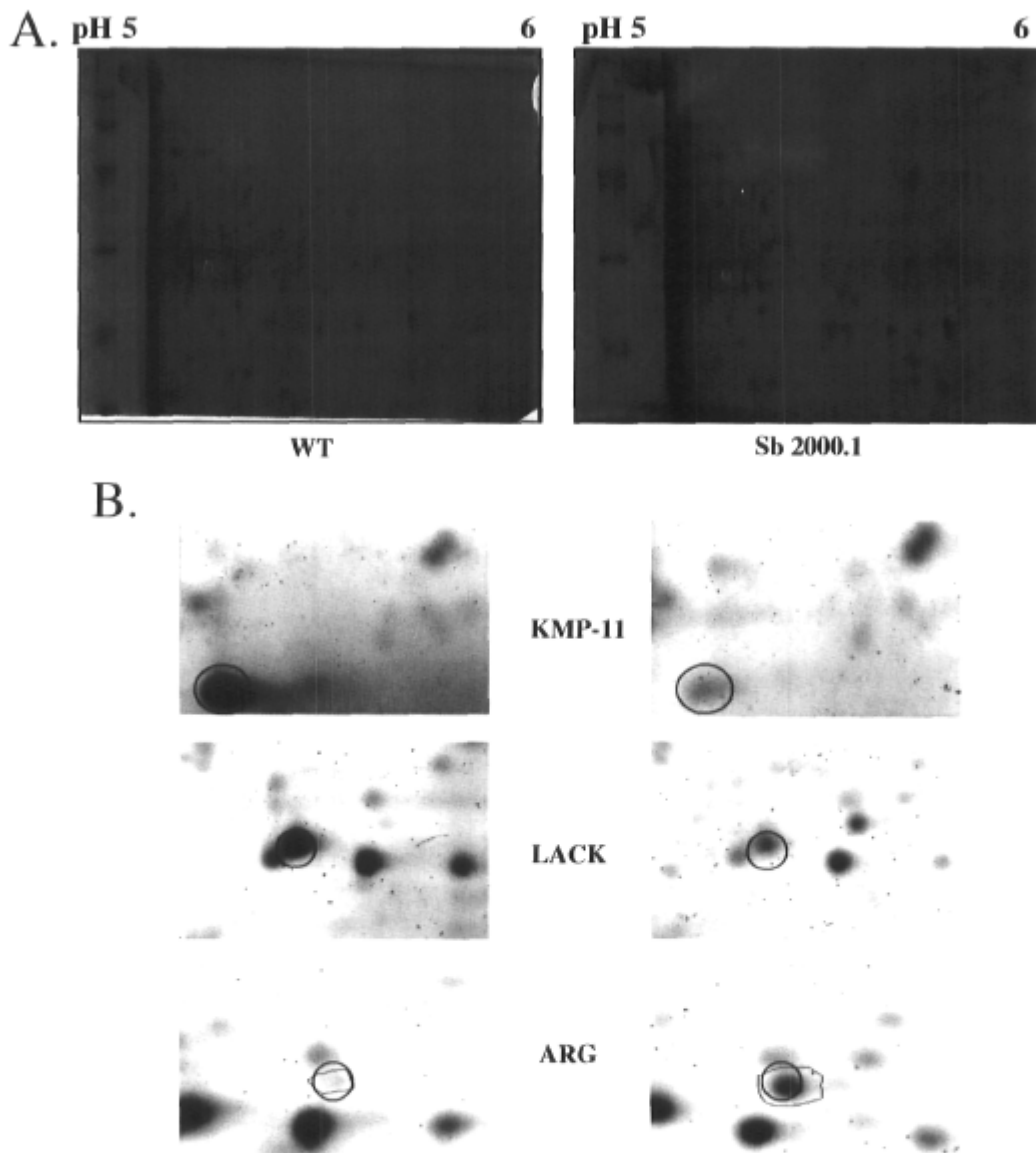


Figure 1. Representative two-dimensional gels comparing soluble proteins of axenic amastigotes the mutant *L. infantum* *SbIII2000.1* and wild type sensitive cells. **A**, Representative gels covering pH 5.0–6.0. **B**, Zoom in of spots with significant differences in protein expression (Table 1). The spots were excised, and identified by MS/MS.

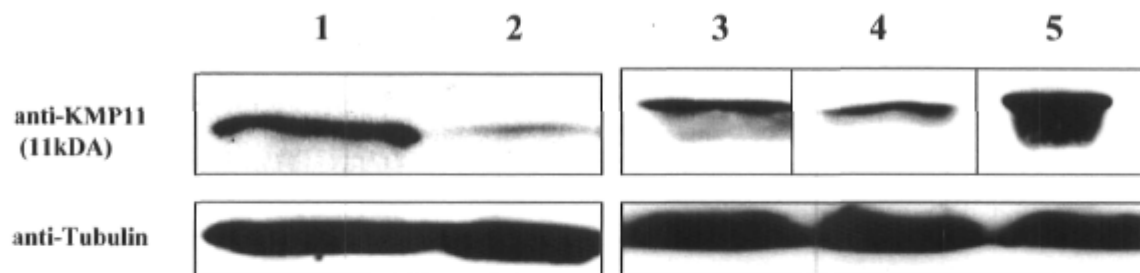


Figure 2. Downregulation of KMP-11 in *L. infantum* as monitored by Western blotting. Proteins (25 μ g) were migrated in SDS gel, transferred and reacted with an anti-KMP-11 antibody (CEDARLANE® Laboratories Limited). **1**, *L. infantum* WT axenic amastigote; **2**, *L. infantum* *Sb* 2000.1 axenic amastigote; **3**, *L. infantum* WT promastigote; **4**, *L. infantum* *Sb* 2000.1 promastigote; **5**, *L. infantum* *Sb* 2000.1 promastigote transfected with an episomal copy of KMP-11.

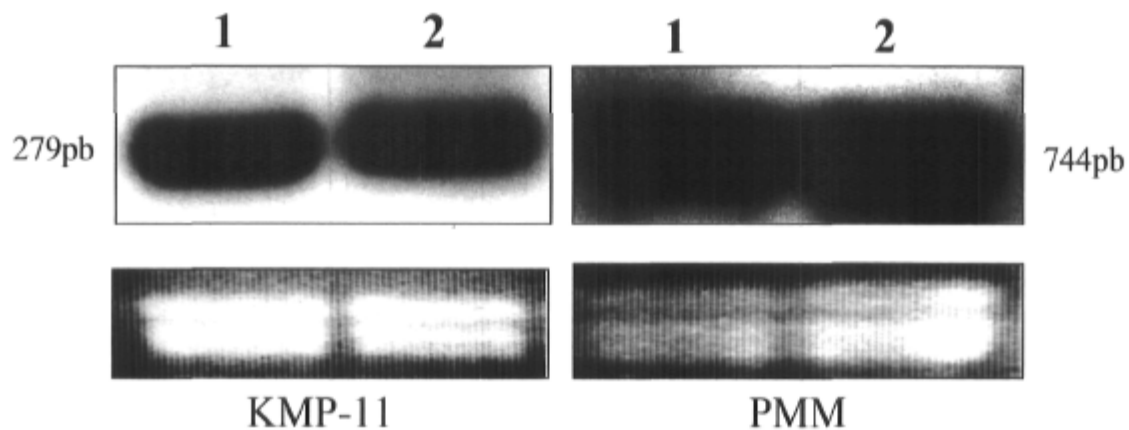


Figure 3. Analysis of gene expression in *L. infantum* Sb2000.1 axenic amastigotes by Northern blot analysis. Total RNA from *L. infantum* axenic amastigotes was hybridized to DNA probes recognizing the genes coding for the KMP-11, and PMM (phosphomannomutase). An ethidium bromide gel is shown to monitor the amount of RNA layered. Sizes were derived from an RNA ladder. Lanes: 1, *L. infantum* wild type; 2, *L. infantum* Sb2000.1.

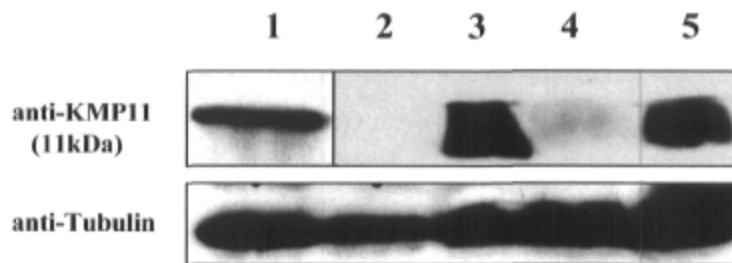


Figure 4. Downregulation of KMP-11 in *L. infantum* Sb4000.4 and Sb4000.5 promastigotes. Proteins were prepared and reacted as indicated in Fig.2. **1**, *L. infantum* WT; **2**, *L. infantum* Sb 4000.4; **3**, *L. infantum* Sb 4000.4 transfected with an episomal copy of KMP-11. **4**, *L. infantum* Sb 4000.5; **5**, *L. infantum* Sb 4000.5 transfected with an episomal copy of KMP-11.

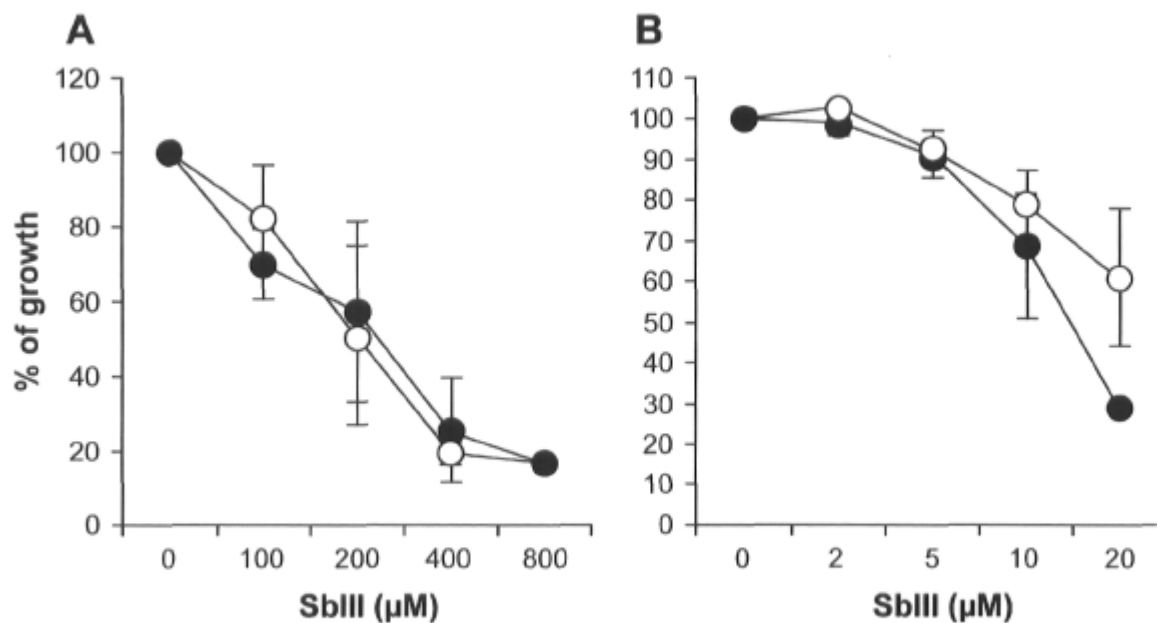


Figure 5. Role of KMP-11 in the SbIII resistance phenotype as determined by gene transfection. The role in resistance was assessed by cloning KMP-11 in a *Leishmania* expression vector that was transfected in *L. infantum* wild-type cells. **A.** Promastigotes of (○) *L. infantum* WT αNEOα and (●) *L. infantum* WT transfected with an episomal copy of KMP-11. **B.** Same cell lines but as axenic amastigotes. Note that the EC_{50} values is much lower in axenic amastigotes.

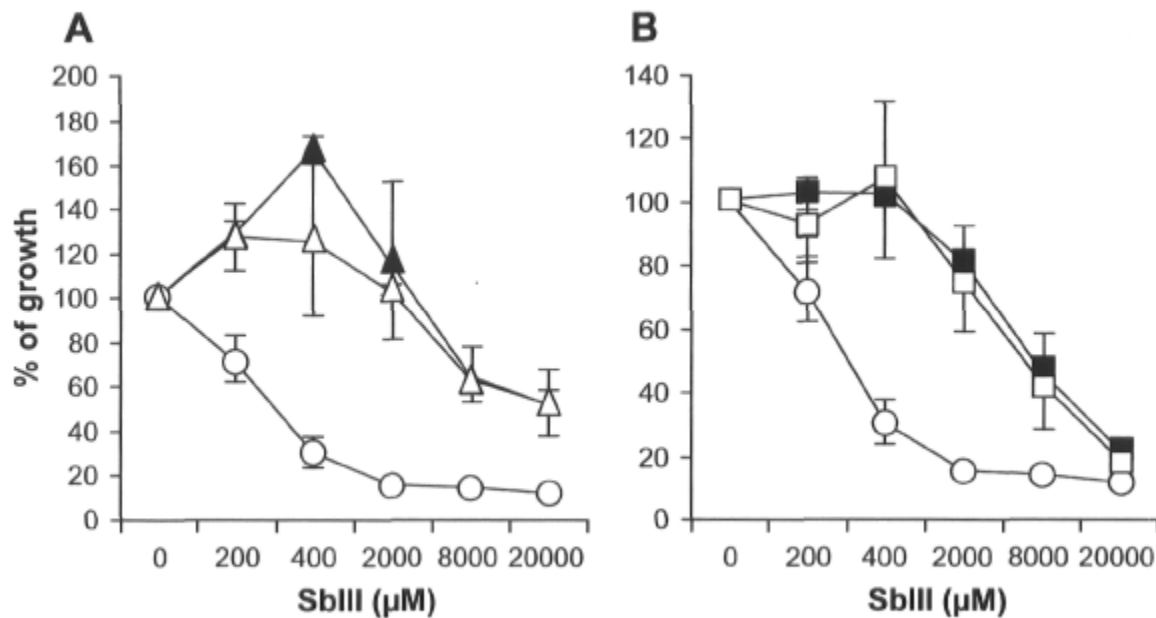


Figure 6. Role of protein KMP-11 in the SbIII resistance phenotype. *Leishmania* expression vectors expressing KMP-11 were transfected in *L. infantum* Sb4000.4 and Sb4000.5 promastigotes cells. (○) *L. infantum* WT transfected with $\alpha\text{NEO}\alpha$ promastigote; (▲) *L. infantum* Sb4000.4 transfected with $\alpha\text{NEO}\alpha$ promastigote; (△) *L. infantum* Sb4000.4 transfected with an episomal copy of KMP-11 promastigote; (■) *L. infantum* Sb4000.5 transfected with $\alpha\text{NEO}\alpha$ promastigote; (□) *L. infantum* Sb4000.5 transfected with the episomal copy of KMP-11 promastigote.

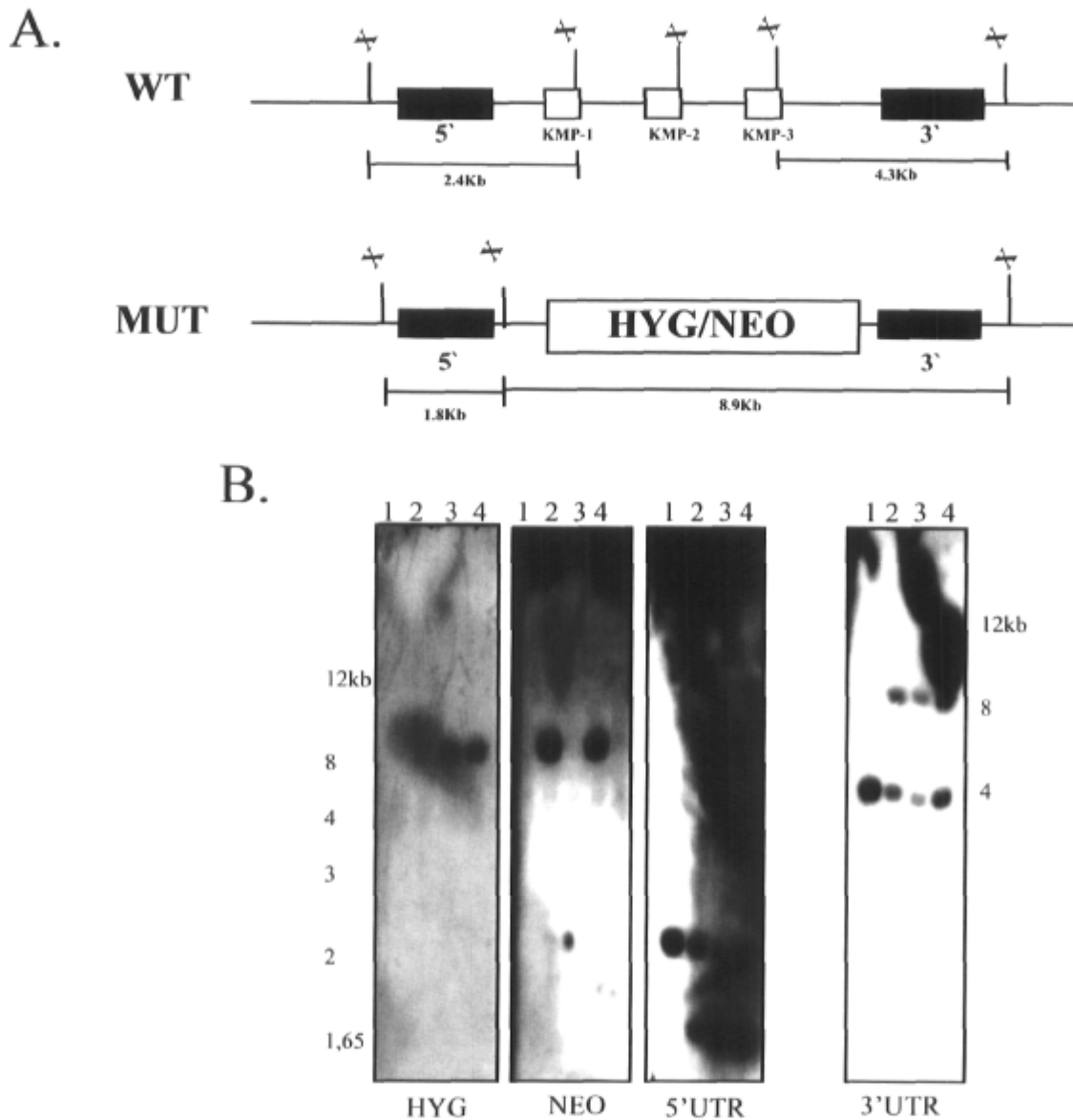


Figure7. Generation of KMP-11 gene disruption mediated by homologous recombination. (A) Schematic representation of the genomic organization of *L. infantum* KMP-11 locus. (B) Southern blot hybridization. Genomic DNA was digested with XhoI (X), then hybridized with the probes, HYG, NEO, 5'UTR region and 3'UTR region. 1, *L. infantum* wild type promastigote; 2, *L. infantum* skoKMP-11 NEO; 3, *L. infantum* skoKMP-11 HYG; 4, *L. infantum* dkoKMP-11 HYG/NEO. Size were estimated with the 1kb plus ladder.

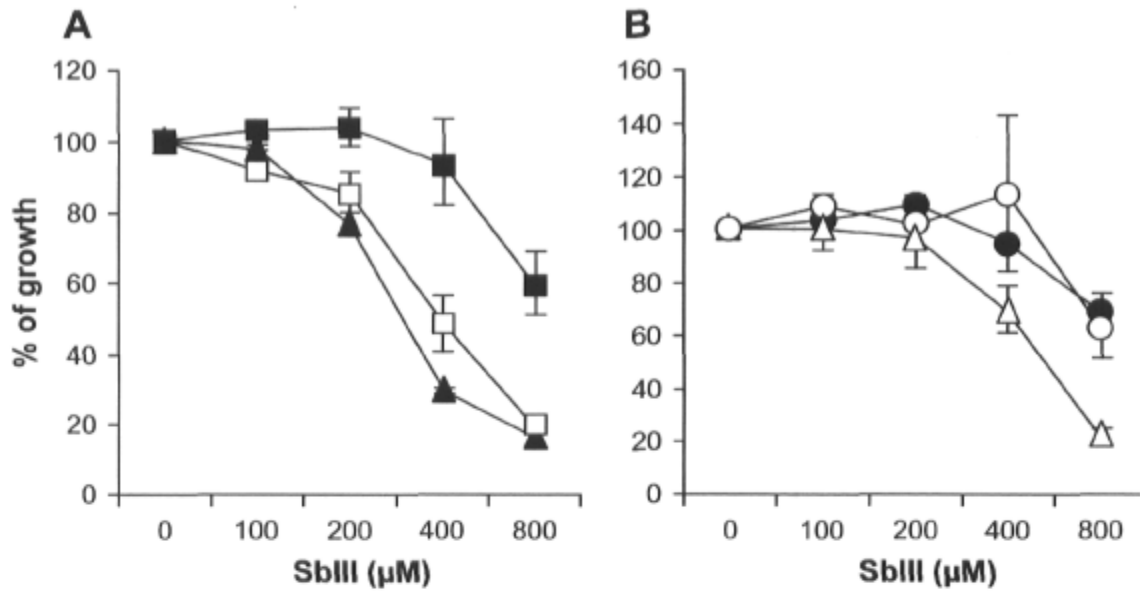


Figure 8. Role of inactivation of KMP-11 genes in the SbIII resistance phenotype. The role of KMP-11 in resistance was assessed by disruption of the three copies of KMP-11, and assessed in the promastigote stage of the parasite. (\blacktriangle) *L. infantum* WT NEO/HYG promastigote; (\square) *L. infantum* skoKMP HYG; (\blacksquare) *L. infantum* dkoKMP NEO/HYG promastigote; (\triangle) *L. infantum* WT NEO/HYG/BLAST promastigote; (\bullet) *L. infantum* dkoKMP NEO/HYG/BLAST promastigote; (\circ) *L. infantum* dkoKMP NEO/HYG transfected with an episomal copy of KMP-11 promastigote in a vector with blasticidin (BLAST) as a rescue.

Chapitre IV

Modulation of Gene Expression in Human macrophages treated with the anti-*Leishmania* pentavalent antimonial drug Pentostam

RÉSUMÉ

Leishmania donovani est un protozoaire intracellulaire obligatoire qui réside et se multiplie exclusivement dans les phagolysosomes des macrophages. L'antimoine pentavalent (SbV) reste le principale médicament pour le traitement de la leishmaniose sous ces deux formes Pentostam et Glucantime, mais son mode d'action n'est pas parfaitement connu. Pour étudier l'effet de SbV sur l'expression des gènes du macrophage, une analyse par les puces Affymetrix a été faite pour comparer les profils d'expression génique des cellules THP-1 non infectées et infectées par *L. donovani* traitées ou non par le Pentostam. SbV a modifié l'expression de 8 gènes indépendamment de l'effet de l'infection par le parasite sensible ou résistant. Deux des gènes dont l'expression est modulée fortement par SbV sont l'hème oxygénase HMOX-1 et la glutamate-cystéine ligase modifier subunit (GCLM) et dont la modulation est aussi observé chez les macrophages dérivés des monocytes (MDMs). Notre analyse suggère l'implication de quelques gènes dans le mode d'action de SbV.

Modulation of gene expression in human macrophages treated with the anti-*Leishmania* pentavalent antimonial drug Pentostam.

Karima El Fadili, Michaël Imbeault, Nadine Messier, Gaétan Roy, Benjamin Gourbal¹, Marc Bergeron, Michel J Tremblay, Danielle Légaré and Marc Ouellette*.

Centre de Recherche en Infectiologie du Centre de Recherche du CHUL and Division de Microbiologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Canada.

*Corresponding author:

Marc Ouellette
Centre de Recherche en Infectiologie
CHUQ, pavillon CHUL
2705 boul. Laurier
Ste-Foy, Québec
Canada, G1V 4G2
tel.: 418-654 2705
fax: 418-654 2715
E-mail: marc.ouellette@crchul.ulaval.ca

¹Present address : Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5244, CNRS Université de Perpignan

ABSTRACT

Within the mammalian host, *Leishmania donovani* is an obligatory intracellular protozoa that resides and multiplies exclusively in the phagolysosomes of macrophages. *Leishmania* control relies primarily on chemotherapy, with the mainstay being pentavalent antimony (SbV) complexed to carbohydrates in the form of sodium stibogluconate (Pentostam) or meglumine antimoniate (Glucantime). The mode of action of SbV is still not known precisely. To explore the effect of SbV on macrophage gene expression, a microarray analysis was performed using Affymetrix Focus arrays to compare gene expression profiles in non-infected and *L. donovani*-infected THP-1 monocytic cells treated or not by Pentostam. Under our experimental conditions, SbV changed the expression of few host genes and this was independent of whether cells were infected or not with *Leishmania*. *Leishmania* infection had a greater effect in the modulation of host gene expression. Statistical analyses have indicated that the expression of 8 genes were modified by at least 2-fold upon SbV treatment with 6 genes up-regulated and 2 genes down-regulated. One gene whose expression was affected by SbV was the heme oxygenase *HMOX-1* and this was observed in both the monocytic cell line THP-1 and primary human monocyte-derived macrophages. Another pathway that was affected was the glutathione biosynthesis pathway where the expression of glutamate-cysteine ligase modifier subunit was increased upon SbV treatment. Our analysis has suggested that under our experimental conditions the expression of few genes is altered upon SbV treatment, some of which may be implicated in the yet to be defined mode of action of SbV.

INTRODUCTION

Leishmania is a protozoan parasite found as a motile flagellated promastigote in the sand fly vector and as a round non flagellated amastigote inside the phagolysosome of the macrophage. Cells of the macrophage lineage (i.e. macrophages, monocytes, and dendritic cells) are the exclusive host cells of this parasite species (28). No vaccines are currently available against *Leishmania* infection and its control relies primarily on chemotherapy. The arsenal of drugs available against this parasite is limited and includes pentavalent antimonials (SbV), pentamidine (rarely), amphotericin B, miltefosine and eventually paromomycin (25).

The mainstay for leishmaniasis treatment has been SbV complexed to carbohydrates in the form of sodium stibogluconate (Pentostam) or meglumine antimoniate (Glucantime). Although, these compounds have been in use since 1940, their mode(s) of action are still not known precisely. Recent findings suggested that antimonial drugs interfere with trypanothione metabolism by extruding thiols outside the *Leishmania* cell and by inhibiting trypanothione reductase (43). Trypanothione is a glutathione spermidine conjugate and the main thiol of these parasites (14). It has been suggested that SbV is a prodrug which needs to be converted to SbIII to be active (10, 29). The main site of conversion (within macrophages or parasites), and the mechanism by which this is achieved is unclear. Moreover, the precise molecular target of antimonials is unknown but it is likely that the macrophages either directly or indirectly contribute to the anti-*Leishmania* activity of SbV. Interestingly, recent results have demonstrated that SbV can selectively inhibit protein tyrosine phosphatases (Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 1 [SHP1] and SHP2) *in vitro* and augment cytokine induced signalling and responses in hematopoietic cell lines (31), suggesting the role of phosphatases and possibly other signal transduction pathways in SbV-induced killing of *Leishmania*. Recent studies have shown that sodium stibogluconate (SSG) and alpha-interferon (IFN- α) synergized to abrogate IFN- α resistance in various human cancer cell lines by activating STAT1 (46). Also, SbV can trigger the activation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), protein kinase C (PKC) and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) coupled with the activation of the microbicidal mechanisms of macrophages, this ultimately leads to the elimination of the intracellular *L. donovani* parasites (23). We also recently showed that SbV alters the activity of the

MAPK/extracellular signal-related kinase (ERK) and other signal transduction pathways (3). Additional studies, have reported that SbV could induce a protective effect *in vivo* against the down-regulation of phagocyte defence activities mediated by *Leishmania*. This property appears to be mediated at least by a direct interaction between SbV and phagocytes, resulting in the priming of their ability to generate reactive oxygen species in response to various stimuli and to enhance the activity of NADPH oxidase, the enzyme generating superoxides (33).

DNA microarrays have been extensively used to study *Leishmania*-macrophage interactions (5, 7, 11, 34) and to further understand the possible contribution of the macrophage on the mode of action of SbV against *Leishmania* we have studied genes differentially expressed in the THP-1 cells treated with SbV using DNA microarray studies. Our analysis has suggested that under our experimental conditions the expression of few genes is altered upon SbV treatment, some of which may be involved in the mode of action of SbV.

MATERIAL AND METHODS

Parasites culture and characterization

The *L. donovani* field isolates 9551 (sensitive to SbV treatment) and 9518 (resistant to SbV) derived from kala-azar patients have been described previously (19, 41). Promastigotes were maintained in SDM79 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum at 25°C. Growth assays of promastigotes were done as described previously (30). For intracellular amastigotes assays, parasites transfected with the firefly luciferase (35) were used at 10:1 ratio to infect the human leukemia monocyte cell line THP-1 as described and validated previously (39). Drug susceptibility assay were performed as described previously (13, 35, 39) and values are expressed as relative light units (RLU).

Isolation and culture of THP-1 cells and monocyte-derived macrophages (MDMs)

Briefly, the cell line THP-1 was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamate, 100 international units of penicillin/ml, and 100µg of streptomycin/ml. THP-1 cells in the log phase of growth were differentiated by incubation for 2 days in medium containing 20 ng of PMA/ml, which caused the cells to become adherent. These cells were infected with *Leishmania* species (39).

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from healthy blood donors by density-gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque. Monocytes were purified by adherence to plastic in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and penicillin and streptomycin. Briefly, PBMCs (6×10^6 cells) were first seeded into 6-well plates, after 2 hrs, non-adherent cells were removed by several washes with warmed PBS. Freshly isolated monocytes were allowed to differentiate into MDMs in complete RPMI 1640 supplemented with human recombinant macrophage colony stimulating factor (100 ng/ml) for 6 days before, when applicable, being treated with Pentostam at 200µg/ml.

RNA extraction– array processing

Experimental set up. The RNAs were first isolated from THP-1 cells infected or not with *L. donovani* 9951 (sensitive to SbV) treated or not with SbV (200µg/ml) after 4 days (THP-1, THP-1+SbV, THP-1+9551 and THP-1+SbV+9551). RNAs were prepared using the RNeasy Mini Kit

(Qiagen) and treated by DNase according to the manufacturer's protocol. RNA quality was controlled spectrophotometrically and by Bioanalyser analysis. Similar amounts of RNA from each condition were labelled and hybridized to the GeneChip® Human Genome Focus Array containing over 8,500 verified human sequences from the NCBI RefSeq database, as described at <http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/focus.affx>. For each condition, we have performed one biological replicate that was hybridized to a second set of microarrays.

Microarray preparation Total RNA from each sample was used to prepare biotinylated target RNA, as described by the manufacturer's protocol. Briefly, 5 µg of RNA was used to generate first-strand cDNA by using a T7-linked oligo(dT) primer. After second-strand synthesis, in vitro transcription was performed with biotinylated UTP and CTP (Enzo Diagnostics), resulting in approximately 100-fold linear amplification of RNA. Spike controls were added to 15 µg fragmented cRNA before overnight hybridization. Arrays were then washed and stained with streptavidin-phycoerythrin before being scanned on an GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix).

Microarray quality Control. After scanning, array images were assessed by eye for confirming scanner alignment and the absence of significant bubbles or scratches on the chip surface. 3'/5' ratios for GAPDH and beta-actin were confirmed to be within acceptable limits (1.00-1.85) and (1.04-2.238) respectively, and BioB spike controls were found to be present along with BioC, BioD and CreX controls. When scaled to a target intensity of 100 (using Affymetrix MAS 5.0 array analysis software), scaling factors for all arrays were within acceptable limits (0.410-0.627), as were backgrounds, Q values and mean intensities.

Real-Time PCR analysis of gene expression in THP-1 cells.

The RNAs were first isolated from THP-1 cells infected or not with *L. donovani* 9951 (sensitive to SbV) treated or not with SbV (200µg/ml) after 4 days (THP-1; THP-1+SbV; THP-1+9551; and THP-1+SbV+9551). Primers for the *EDNRB*, *HMOX-1*, *GCLM*, *SEPW-1*, *NT5C2*, *MAGEB2* and *MRC1* genes were designed using the Primer 3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (see supplementary Table 1). Primers for the GAPDH control have been described by others (26). Complementary DNA synthesis and real-time PCR on a Rotor-Gene 6000 from Corbett Life Science were performed with three independent RNA preparations. The relative amount of PCR products generated from each primer set was determined based on the threshold cycle (Ct) value and amplification efficiencies, and was

normalized by dividing the values by the relative amount of the *GAPDH* gene used as a control. Real-Time PCR analysis of the gene *MXI* and *GIP2* were performed by the Gene Quantification core laboratory of the Centre de Génomique de Québec (<https://genome.ulaval.ca/qrtPCR>).

THP-1 cells (6×10^6) were harvested by centrifugation at 2500 x g, washed twice in HEPES-NaCl buffer, resuspended and disrupted in an equal volume of boiling 2x lysis buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4% SDS; 3% β -mercaptoethanol; 17.5% glycerol; 5 mM Na_3VO_4 ; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin; 0.0025% bromophenol blue; 1x Protease Inhibition Cocktail). The samples were boiled for 10 min, vortexed and total cellular proteins (from 6×10^6 cells) were separated on a 15% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was then incubated in 1X PBS, 5% nonfat milk, 0.2% Tween and 1:1000 dilution of a monoclonal anti-human HMOX-1 antibody (StressGen) for 90 min. The membrane was washed with 1X PBS containing 0.1% Tween 20 and incubated with a 1:10000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated goat antimouse IgG (Bio-Rad, Hercules) in 1X PBS plus 5% nonfat milk for 1 hour, washed again with PBS. Results were visualized using a chemiluminescence detection kit (Pierce).

Thiols analysis. Thiols were derivatized with monobromobimane, separated by HPLC and quantitative as described (15).

RESULTS

Modulation of gene expression induced by Pentostam in THP-1 cells.

Pentostam (SbV) is the first line drug against infections caused by the protozoan parasite *Leishmania*. Its mode of action is unknown but it is likely to act as a prodrug. Recent evidence suggests interaction with host signalling proteins (3, 23, 31, 33, 46). DNA microarrays have been useful for determining the mode of action of a number of drugs (4, 27, 42, 47). Consequently, we have used DNA microarrays to assess any putative SbV- mediated changes in gene expression in the macrophage host cell in the hope that it may be informative on the mode of action of SbV. We used SbV at 200µg/ml a condition that kills a large proportion of sensitive *Leishmania* isolates (strain 9551) but not SbV-resistant isolates (strain 9518) (Fig. 1). This concentration of SbV is not toxic to THP-1 cells (results not shown).

Macrophages, infected or not with the clinical isolate *L. donovani* 9551 were treated with SbV. RNAs from the four different conditions (THP-1; THP-1 +SbV; THP-1 + 9551; THP-1 + 9551 + SbV) were isolated and hybridized to human Genome Focus Array as described under material and methods. While the focus of this study is on the mode of action of SbV, as part of a control we also monitored changes of host gene expression upon *Leishmania* infections. Statistical analyses using the Agilent Gene Spring software package have revealed that after having arbitrarily set up a cut off of two fold differential expression, the expression of 44 genes (24 up-regulated and 20 down-regulated) was changed in THP-1 cells upon infection with strain 9951 of *L. donovani* (Supplementary Table 2). The expression of most of these genes was not modulated by SbV treatment alone (Supplementary Table 2). Several of these genes whose expression is modulated upon *Leishmania* infection are part of the interferon gamma pathway like MX1 (human interferon-regulated resistance GTP-binding protein MxA) and G1P2 (interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K) see supplementary Table 2. The qRT-PCR experiments confirmed the expression data derived from the expression data derived from the DNA microarray experiments for the *MX1* and *G1P2* genes (Fig. 2). Interestingly, SbV treatment of cells infected with *Leishmania* altered the modulation of gene expression induced by

Leishmania (Supplementary Table 2). This was confirmed also by real-time PCR of the two studied host genes part of the interferon gamma pathway (Fig. 2).

The main thrust of this study was to find SbV-modulated genes. SbV changed the expression of fewer genes and this was independent of whether THP-1 cells were infected or not with *Leishmania* (Table 1). Indeed, analyses of microarray data have indicated that a total of 8 genes were at least 2-fold differentially expressed after treatment, with 6 genes up-regulated and 2 genes down-regulated. The confirmation of the different expression levels of 7 genes was done by real-time reverse transcription (RT) quantitative PCR (qRT-PCR) (Fig. 3). We were unable to amplify the RNA of the *APOC1* gene starting from THP-1 derived RNA. The qRT-PCR experiments confirmed the expression data derived from the expression data derived from the DNA microarray experiments for the 7 other genes (Fig. 3).

SbV modulation of gene expression.

The microarray experiment was done with 200 µg/ml of SbV, as this was killing sensitive *Leishmania* cells (Fig. 1) while not being toxic for macrophages, but we wished to test whether lower concentration of SbV could also modulate the expression of these genes. This was tested using the 7 aforementioned genes by qRT-PCR. For all genes up-regulated, we found a maximum induction of gene expression in THP-1 cells at 200 µg/ml of Pentostam (Fig. 3). The induction in gene expression was clear at the highest concentration of Pentostam tested since only a modest increase was seen at lower Pentostam concentrations (Fig. 3). Possibly due to the dynamic range of each technique, the fold-increase was often greater by qRT-PCR than with the microarrays. For example *HMOX-1* expression was increased ~13 fold at 200 µg/ml of Pentostam as determined by qPCR compared to a 2.1-fold by microarray (Table 2). For down-regulated genes, we also observed maximal effect at 200 µg/ml of SbV but, in the case of *SEPW-1*, we already saw an effect at 20 µg/ml of SbV (Fig. 3).

Three out of the seven genes, the endothelin receptor type B (*EDNRB*), the heme oxygenase-1 (*HMOX-1*) and the glutamate-cysteine ligase modifier subunit (*GCLM*), have been for selected further analysis. These three genes were chosen either because they were the most highly differentially expressed (*EDNRB*) or, that data in the literature suggested a possible role in

the mode of action of SbV. Indeed, host thiols (potentially provided by *GCLM*) have been proposed to be involved in the reduction of SbV (37) and *HMOX-1* expression was found to be modulated by SbV treatment (12). Pentostam is one of the two main SbV containing drugs used to treat *Leishmania*, the other one being Glucantime. The same induction in gene expression was observed with 200 $\mu\text{g/ml}$ of Glucantime and this drug was found to be a potent inducer of the expression of both the *EDNRB* and *HMOX-1* genes of THP-1 cells, with increases more than 10-fold as determined by qRT-PCR (Fig. 4).

For measuring SbV activity against *Leishmania*, long incubation times are required (39). SbV-mediated alterations in some signalling pathways were found to be a slow process (3). This explains why we opted to investigate gene expression modulation at 96 hrs post-treatment. Nonetheless, we were interested in testing whether SbV-mediated changes in gene expression could occur more rapidly. RNA was extracted from THP-1 cells treated with Pentostam (200 $\mu\text{g/ml}$) after different incubation times (24, 48, 72 and 96hrs). qRT-PCR analyses revealed that *HMOX-1* and *EDNRB* mRNA levels increased with time of treatment, reaching their highest level after 96hrs for both genes (Fig.5 A and B).

The SbV induced changes in gene expression described so far in this manuscript were observed in PMA differentiated THP-1 cells. It was of interest to test whether SbV could also modulate gene expression in a different, more relevant, cellular context. For this purpose, monocytes derived from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were allowed to differentiate into macrophages. The expression of *HMOX-1*, *EDNRB* and *GCLM* were increased in MDMs of two independent donors upon Pentostam (200 $\mu\text{g/ml}$) incubation (Fig. 6). The fold increases for those three genes were greater in MDMs compared to what observed in the THP-1 cells (Figs. 4, 6).

We attempted to correlate changes in gene expression with either protein production or function. Antibodies against *EDNRB* and *HMOX-1* are commercially available but the *EDNRB* antibody was not able to detect a protein in our THP-1 cell line (results not shown) and this was not investigated further. In contrast, the anti-*HMOX-1* antibody recognized a protein of 32 kDa (the predicted size of HO-1) in THP-1 cells and the production of this protein is increased 9 ± 1.4 -fold upon SbV treatment (see Fig. 7, lanes 1 and 3). *GCLM* codes for the modulator subunit of

the rate-limiting enzyme of the glutathione biosynthesis pathway and it is possible that its overexpression upon SbV treatment could lead to an increase in GSH biosynthesis. This was tested by measuring thiols by HPLC and indeed we found an increased level of GSH in both THP-1 cells and MDMs treated with SbV after 96hrs (Fig. 8A and B).

Effect of EDNRB and HMOX-1 antagonists on SbV mediated gene expression.

SbV changed the expression of a selected number of genes and it is possible that these changes may be implicated in the activation of the drug. To obtain further evidence that *EDNRB* and *HMOX-1* expression were induced by SbV alone, we treated cells with antagonists of these two gene products. Several molecules have been developed that alter the expression of *HMOX-1* (reviewed in (1, 32) and zinc protoporphyrin IX (ZnPP IX), a known inhibitor (18), was tested. Surprisingly ZnPP IX increased the HMOX-1 RNA level by 30-fold (Fig. 9A) and this also correlated with an increase in HMOX-1 protein (Fig. 7, lane 3). Co-incubation of cells with ZnPP IX and SbV did not increase further RNA or protein levels (Fig. 7, lane 5; Fig. 9A). BQ788 is an antagonist of *EDNRB* (16) and incubation with BQ788 (Calbiochem) indeed resulted in a decrease in the mRNA expression of the *EDNRB* gene (0.63-fold; p 0.009) compared to THP-1 cells mocked control (Fig. 9B). However, treatment of cells with BQ788 could not modulate significantly the SbV-mediated change in *EDNRB* gene expression (Fig. 9B). As expected from the expression data of Fig. 9A and B, the *Leishmania* infection and their susceptibility to SbV was unchanged in THP-1 cells treated with either ZnPP IX or BQ788 (results not shown).

DISCUSSION

Antimonials have been used for decades against leishmaniasis but their mode of action is still not completely understood. However, there is a general consensus that SbV is converted to SbIII (reviewed in (10, 29)). The metal reduction could occur either in the macrophage, the intracellular parasite or in both, and it is likely that the macrophage either directly or indirectly is important for this conversion. Moreover, SbV was shown to modulate host signaling pathways (3, 23, 31) which could also contribute to the anti-leishmania activity of SbV. Therefore, we choose to use DNA microarrays in order to investigate the potential role of the macrophage on the mode of action of Pentostam. Indeed, it has been shown that RNA expression profiling is a useful technique to look at the mode of action of drugs (4, 27, 42, 47). Several studies have also dealt with changes of host gene expression upon infection with *Leishmania* spp (5, 7, 11, 34) and we indeed also observed changes in host gene expression (see Supplementary Table 2). Several of the genes (but not all) listed in Suppl. Table 2 were also pinpointed by others including the two genes studied in Fig. 2 (7). Interestingly, SbV treatment of *Leishmania* infections decreases the effect of *Leishmania* induced expression (Fig. 2 and Supplementary Table 2). This may suggest that modulation of gene expression depends on dividing parasites and this clearly warrants further investigations.

Under the experimental conditions that we have used, the expression of few genes was significantly modulated by SbV (Table 1) and this was independent of whether the macrophages were infected or not with *Leishmania* parasites (Table 1). SbV drugs used against *Leishmania* have been shown to be potent inhibitors of a family of protein phosphatases which modulates signalling pathways and cytokines responses (31). Stimulation of extracellular signal-regulated kinase 1 (*ERK-1*) by SbV and alterations in intracellular signalling pathways have also been described (3, 23). Under our experimental conditions, none of these signalling pathways were found to be altered by using Focus DNA microarrays. This observation is not surprising given that the majority of signal transduction pathways are modulated by post-transcriptional events (eg. phosphorylation/dephosphorylation). Thus, other global approaches such as proteomic screens may have highlight SbV-mediated changes in signalling pathways.

The few genes whose expression was modulated by SbV, suggested that SbV induced some oxidative stress and that these may contribute to the anti-*Leishmania* activity. Indeed, there are already links between SbV and the production of reactive oxygen species (ROS). For example, the activation of ERK-kinases by SbV is known to lead to the production of ROS (23), and this is consistent with the observation that SbV can prime the phagocyte respiratory burst (33). It should be noted, however, that short exposure (4hrs) of THP-1 cells to SbV did not lead to the production of ROS, but that incubation with SbIII for 4 hrs did in fact lead to ROS production (20, 44). If SbV is slowly converted to SbIII inside macrophages, it may take longer to see an increase in SbV-mediated ROS production. Indeed, we found that modulation of gene expression was maximal at 96 hrs (Fig. 5) and this parallels the rather slow activity of SbV on *Leishmania* cells. It is noteworthy that susceptibility testing is routinely carried out after 4-5 days of exposure to SbV (39). Interestingly, the expression of all genes pinpointed in THP-1 cells using Focus arrays, were also differentially expressed in MDMs (Fig. 6). The fold increase in SbV-mediated changes in gene expression was even greater in MDMs, suggesting that if we had used this system initially, we may have detected more genes responding to SbV. However, one caveat with MDMs, in comparison to established cell lines, is the heterogeneity in gene expression between donors which could have complicated the analysis of the data.

One gene whose expression was greatly modulated by SbV was *HMOX-1*, and this was observed in both THP-1 cells (Fig. 3) and MDMs (Fig. 6). *HMOX-1* is the gene coding for the HO-1 enzyme that catalyzes the rate-limiting step of heme degradation into biliverdin, carbon monoxide and iron (reviewed in (36)). The *HMOX-1* gene is activated under a number of cellular stresses and it has been shown to be important in dealing with oxidative stress (reviewed in (1)). Significantly, SbIII, and to a lesser extent SbV, were shown to induce HO-1 (12). The *HMOX-1* gene is under the control of several transcription factors and pathways (reviewed in (2)). The ERK pathway was found to be necessary for metal (arsenic) HO-1 induction (9) and, since SbV was shown to induce the ERK pathway (23), it is possible that it is through this pathway that HO-1 expression is increased. The zinc protoporphyrin IX (ZnPP IX) is a HO-1 inhibitor. In our hands, however, ZnPP IX was shown to be a potent inducer of *HMOX-1* gene and protein expressions (Fig. 9A; Fig. 7, lane 4). This induction effect has also been observed by others (45). This is explained by ZnPP IX-induced binding of nuclear proteins to the *HMOX-1* regulatory

regions (45). Attempts to look at whether ZnPP IX could modulate the activity of SbV against *Leishmania* have been inconclusive (results not shown), possibly because of the complexity of *HMOX-1* regulation. Future studies are nonetheless warranted to see whether HO-1 is involved in the mode of action of SbV.

Another pathway that was highlighted was that of glutathione (GSH) biosynthesis where the expression of glutamate-cysteine ligase modifier subunit (*GCLM*) was increased. This is the non catalytic subunit of the rate limiting enzyme in GSH biosynthesis (the catalytic gene *GCLC* was not present on the Focus array) but it may nonetheless indicate that GSH levels could be important for the SbV mode of action. It has been shown that an increase in *GCLM* expression could lead to an increase of GSH (8). Indeed, GSH reduces non enzymatically SbV into SbIII (37) and the activity of SbV was associated with the manipulation of both host and parasite GSH levels by the parasite (6). Thiol levels are known to be important for the parasite itself where SbIII decreases the level of intracellular GSH (21, 43) and an increased level of thiols is associated with resistance to antimonials (15, 22, 24). Similarly, short time exposure of host cells to SbIII depleted the cells of GSH (44) whereas longer exposure can lead to increased GSH (40). We showed that total GSH levels are increased in SbV treated cells (Fig. 8), concomitant with an increase in *GCLM* expression in both THP-1 cells (Fig. 3) and MDMs (Fig. 6). It is possible that during the initial contact, SbIII (or SbV being converted to SbIII) reacts with cellular GSH and this complex is effluxed outside the cell, hence reducing cellular thiol levels. To compensate for this loss in GSH levels, the cell increases the synthesis of GSH upon chronic metal exposure.

Another gene that was up-regulated extensively by SbV was the endothelin receptor type B (*EDNRB*). This receptor, upon endothelin binding, promotes vasodilatation (reviewed in (38)). The expression of *EDNRB* was increased by SbV in both THP-1 cells (Fig. 3) and in MDMs (Fig. 6). Inhibitors of EDNRB are available and we used BQ788. BQ788 was able to decrease the expression of *EDNRB* (Fig. 9B) but the effect was minimal and we could not observe any effect of BQ788 on the anti-leishmanial activity of SbV (results not shown). High expression of *EDNRB* is associated with hypertension (38) and one may need to be careful if SbV is used to treat leishmaniasis in individuals suffering from hypertension.

In addition to *EDNRB*, *GCLM*, and *HMOX-1*, the expression of 5 others genes (3 up-regulated and two down-regulated) was also modulated by SbV (table 2). The modulation in expression of these genes was confirmed by real-time PCR in THP-1 cells (Fig. 3). The three other genes up-regulated corresponded to the cytosolic 5'-nucleosidase type II (*NT5C2*), a melanoma antigen *MAGEB2* of unknown function and an apolipoprotein C-I (*APOC1*). For the latter, every primer design failed to detect the specific mRNA in THP-1 cells. It is not clear whether the regulation of these genes has a role to play in SbV activity. Two genes were down-regulated coding for the membrane receptor *MRC1* and for the selenoprotein *SEPWI* (Fig. 3). It has been suggested that *SEPWI* is a target for the heavy metal MeHg (methylmercury) and that its expression is dependent on GSH levels (17), although further work will be required to determine whether any of these down-regulated genes are related to SbV mode of action. Indeed, the transcriptomic approach used here has been useful to detect changes in gene expression mediated by SbV and future work should determine how these changes could modulate the efficacy of SbV drugs against leishmaniasis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded in part by the CIHR group and operating grants to M.O. K.E.F. is a Strategic Training Fellow of the Strategic Training Program in Microbial Resistance, a partnership of the CIHR Institute of Infection and Immunity and the Fonds de Recherche en Santé du Québec. M.I. is the recipient of a CIHR studentship. M.J.T holds the Canada Research Chair in Human Immuno-Retrovirology (senior level). M.O. is a Burroughs Wellcome Fund Scholar in Molecular Parasitology and holds the Canada Research Chair in Antimicrobial Resistance.

REFERENCES

1. **Abraham, N. G., and A. Kappas.** 2005. Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Free Radic Biol Med* **39**:1-25.
2. **Alam, J., and J. L. Cook.** 2007. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**:166-74.
3. **Barat, C., C. Zhao, M. Ouellette, and M. J. Tremblay.** 2007. HIV-1 replication is stimulated by sodium stibogluconate, the therapeutic mainstay in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Dis* **195**:236-45.
4. **Brazas, M. D., and R. E. Hancock.** 2005. Using microarray gene signatures to elucidate mechanisms of antibiotic action and resistance. *Drug Discov Today* **10**:1245-52.
5. **Buates, S., and G. Matlashewski.** 2001. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. *J Immunol* **166**:3416-22.
6. **Carter, K. C., S. Hutchison, F. L. Henriquez, D. Legare, M. Ouellette, C. W. Roberts, and A. B. Mullen.** 2006. Resistance of *Leishmania donovani* to sodium stibogluconate is related to the expression of host and parasite gamma-glutamylcysteine synthetase. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:88-95.
7. **Chaussabel, D., R. T. Semnani, M. A. McDowell, D. Sacks, A. Sher, and T. B. Nutman.** 2003. Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. *Blood* **102**:672-81.
8. **Chen, Y., H. G. Shertzer, S. N. Schneider, D. W. Nebert, and T. P. Dalton.** 2005. Glutamate cysteine ligase catalysis: dependence on ATP and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels. *J Biol Chem* **280**:33766-74.
9. **Cooper, K. L., K. J. Liu, and L. G. Hudson.** 2007. Contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase signaling in arsenite-stimulated hemeoxygenase-1 production. *Toxicol Appl Pharmacol* **218**:119-27.
10. **Croft, S. L., S. Sundar, and A. H. Fairlamb.** 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* **19**:111-26.
11. **Dogra, N., C. Warburton, and W. R. McMaster.** 2007. *Leishmania major* abrogates gamma interferon-induced gene expression in human macrophages from a global perspective. *Infect Immun* **75**:3506-15.
12. **Drummond, G. S., and A. Kappas.** 1981. Potent heme-degrading action of antimony and antimony-containing parasitocidal agents. *J Exp Med* **153**:245-56.
13. **El Fadili, K., N. Messier, P. Leprohon, G. Roy, C. Guimond, N. Trudel, N. G. Saravia, B. Papadopoulou, D. Legare, and M. Ouellette.** 2005. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1988-93.
14. **Fairlamb, A. H., and A. Cerami.** 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol* **46**:695-729.
15. **Haimeur, A., C. Brochu, P. Genest, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 2000. Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol* **108**:131-135.
16. **Ishikawa, K., M. Ihara, K. Noguchi, T. Mase, N. Mino, T. Saeki, T. Fukuroda, T. Fukami, S. Ozaki, T. Nagase, and et al.** 1994. Biochemical and pharmacological profile

- of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:4892-6.
17. **Kim, Y. J., Y. G. Chai, and J. C. Ryu.** 2005. Selenoprotein W as molecular target of methylmercury in human neuronal cells is down-regulated by GSH depletion. *Biochem Biophys Res Commun* **330**:1095-102.
 18. **Labbe, R. F., H. J. Vreman, and D. K. Stevenson.** 1999. Zinc protoporphyrin: A metabolite with a mission. *Clin Chem* **45**:2060-72.
 19. **Lira, R., S. Sundar, A. Makharia, R. Kenney, A. Gam, E. Saraiva, and D. Sacks.** 1999. Evidence that the High Incidence of Treatment Failures in Indian Kala- Azar Is Due to the Emergence of Antimony-Resistant Strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis* **180**:564-567.
 20. **Mann, K. K., K. Davison, M. Colombo, A. L. Colosimo, Z. Diaz, A. M. Padovani, Q. Guo, P. J. Scrivens, W. Gao, S. Mader, and W. H. Miller, Jr.** 2006. Antimony trioxide-induced apoptosis is dependent on SEK1/JNK signaling. *Toxicol Lett* **160**:158-70.
 21. **Mehta, A., and C. Shaha.** 2006. Mechanism of metalloid-induced death in *Leishmania* spp.: role of iron, reactive oxygen species, Ca²⁺, and glutathione. *Free Radic Biol Med* **40**:1857-68.
 22. **Mittal, M. K., S. Rai, Ashutosh, Ravinder, S. Gupta, S. Sundar, and N. Goyal.** 2007. Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. *Am J Trop Med Hyg* **76**:681-8.
 23. **Mookerjee Basu, J., A. Mookerjee, P. Sen, S. Bhaumik, P. Sen, S. Banerjee, K. Naskar, S. K. Choudhuri, B. Saha, S. Raha, and S. Roy.** 2006. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1788-97.
 24. **Mukherjee, A., P. K. Padmanabhan, S. Singh, G. Roy, I. Girard, M. Chatterjee, M. Ouellette, and R. Madhubala.** 2007. Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* **59**:204-11.
 25. **Murray, H. W., J. Berman, C. R. Davies, and N. G. Saravia.** 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* **366**:1561-1577.
 26. **Neuvians, T. P., I. Gashaw, C. G. Sauer, C. von Ostau, S. Kliesch, M. Bergmann, A. Hacker, and R. Grobholz.** 2005. Standardization strategy for quantitative PCR in human seminoma and normal testis. *J Biotechnol* **117**:163-71.
 27. **Ng, W. L., K. M. Kazmierczak, G. T. Robertson, R. Gilmour, and M. E. Winkler.** 2003. Transcriptional Regulation and Signature Patterns Revealed by Microarray Analyses of *Streptococcus pneumoniae* R6 Challenged with Sublethal Concentrations of Translation Inhibitors. *J Bacteriol* **185**:359-70.
 28. **Olivier, M., D. J. Gregory, and G. Forget.** 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* **18**:293-305.
 29. **Ouellette, M., J. Drummel-Smith, and B. Papadopolou.** 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* **7**:257-66.
 30. **Ouellette, M., F. Fase-Fowler, and P. Borst.** 1990. The amplified H circle of methotrexate-resistant *leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *Embo J* **9**:1027-33.

31. **Pathak, M. K., and T. Yi.** 2001. Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *J Immunol* **167**:3391-7.
32. **Prawan, A., J. K. Kundu, and Y. J. Surh.** 2005. Molecular basis of heme oxygenase-1 induction: implications for chemoprevention and chemoprotection. *Antioxid Redox Signal* **7**:1688-703.
33. **Rais, S., A. Perianin, M. Lenoir, A. Sadak, D. Rivollet, M. Paul, and M. Deniau.** 2000. Sodium stibogluconate (Pentostam) potentiates oxidant production in murine visceral leishmaniasis and in human blood. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2406-10.
34. **Rodriguez, N. E., H. K. Chang, and M. E. Wilson.** 2004. Novel program of macrophage gene expression induced by phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *Infect Immun* **72**:2111-22.
35. **Roy, G., C. Dumas, D. Sereno, Y. Wu, A. K. Singh, M. J. Tremblay, M. Ouellette, M. Olivier, and B. Papadopolou.** 2000. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models [In Process Citation]. *Mol Biochem Parasitol* **110**:195-206.
36. **Ryter, S. W., J. Alam, and A. M. Choi.** 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* **86**:583-650.
37. **Santos Ferreira, C., P. S. Martins, C. Demicheli, C. Brochu, M. Ouellette, and F. Frezard.** 2003. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biomaterials* **16**:441-6.
38. **Schneider, M. P., E. I. Boesen, and D. M. Pollock.** 2007. Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**:731-59.
39. **Sereno, D., G. Roy, J. L. Lemesre, B. Papadopolou, and M. Ouellette.** 2001. DNA Transformation of *Leishmania infantum* Axenic Amastigotes and Their Use in Drug Screening. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1168-1173.
40. **Snawder, J. E., M. A. Tirmenstein, P. I. Mathias, and M. Toraason.** 1999. Induction of stress proteins in rat cardiac myocytes by antimony. *Toxicol Appl Pharmacol* **159**:91-7.
41. **Vergnes, B., B. Gourbal, I. Girard, S. Sundar, J. Drummel-Smith, and M. Ouellette.** 2007. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics* **6**:88-101.
42. **Wilson, M., J. DeRisi, H. H. Kristensen, P. Imboden, S. Rane, P. O. Brown, and G. K. Schoolnik.** 1999. Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:12833-8.
43. **Wyllie, S., M. L. Cunningham, and A. H. Fairlamb.** 2004. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* **279**:39925-32.
44. **Wyllie, S., and A. H. Fairlamb.** 2006. Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. *Biochem Pharmacol* **71**:257-67.
45. **Yang, G., X. Nguyen, J. Ou, P. Rekulapelli, D. K. Stevenson, and P. A. Dennery.** 2001. Unique effects of zinc protoporphyrin on HO-1 induction and apoptosis. *Blood* **97**:1306-13.

46. **Yi, T., M. K. Pathak, D. J. Lindner, M. E. Ketterer, C. Farver, and E. C. Borden.** 2002. Anticancer activity of sodium stibogluconate in synergy with IFNs. *J Immunol* **169**:5978-85.
47. **Zembutsu, H., Y. Ohnishi, T. Tsunoda, Y. Furukawa, T. Katagiri, Y. Ueyama, N. Tamaoki, T. Nomura, O. Kitahara, R. Yanagawa, K. Hirata, and Y. Nakamura.** 2002. Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human cancer xenografts to anticancer drugs. *Cancer Res* **62**:518-27.

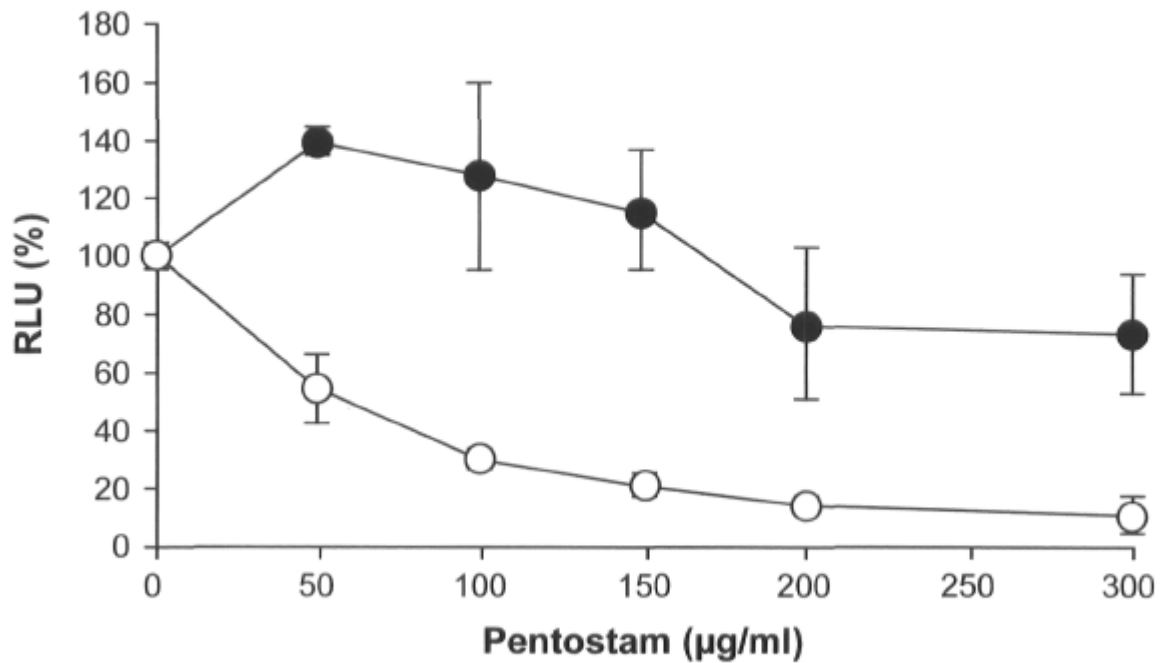


Figure 1. Susceptibility of *Leishmania donovani* clinical isolates to Pentostam. Susceptibility to Pentostam (SbV) of intracellular *Leishmania donovani* field isolates 9551 (○) and 9518 (●) expressing the luciferase reporter gene in THP-1 cells (19, 41). Each data point represents the average of three separate assays. RLU, relative light units.

Table 1. Modulation of gene expression in THP-1 cell by Pentostam (SbV).

Common Name	Gene symbol	Accession number	SbV	Leishmania + SbV	Function
Selenoprotein W, 1	SEPW1	NM_003009	0,37	0,36	
Mannose receptor, C type 1	MRC1	NM_002438	0,41	0,42	receptor-mediated endocytosis
Fatty acid binding protein 4, adipocyte	FABP4	NM_001442	0,65	1,10	fatty acid binding
NAD(P)H:quinone oxireductase	NQO1	NM_00090	0,77	0,97	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) activity
5'-nucleotidase, cytosolic II	NT5C2	NM_012229	2,04	1,64	5'-nucleotidase activity
Apolipoprotein C-I	APOC1	NM_001645	2,07	2,32	lipid metabolic process
Heme oxygenase (decycling) 1	HMOX1	NM_002133	2,11	2,16	heme oxygenase (decyclizing) activity
Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	GCLM	NM_002061	2,20	1,94	response to drug / oxidative stress
Melanoma antigen family B, 2	MAGEB2	NM_002364	2,37	2,19	protein binding
Endothelin receptor type B	EDNRB	NM_000115	4,77	4,50	G-protein signaling, coupled to IP3 second messenger (phospholipase C activating)

Modulation of gene expression was measured after 4 days of incubation with 200 µg/ml of SbV. Only the expression of genes whose level was significantly modulated is shown.

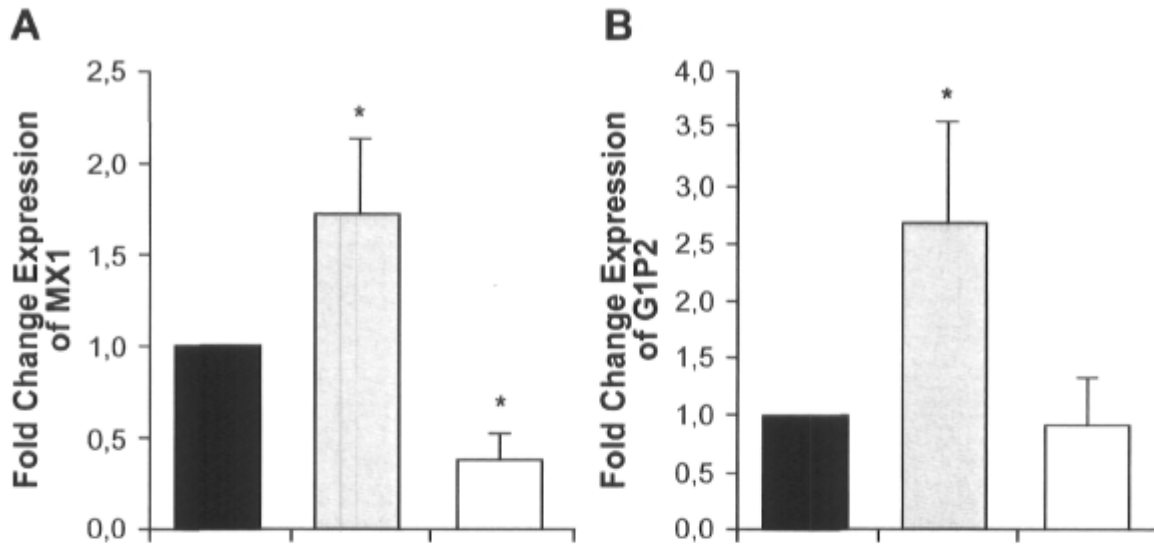


Figure 2. *Leishmania* and SbV mediated changes of gene expression in THP-1 cells as analyzed by quantitative real-time RT-PCR. RNA derived from THP-1 cells (black bars) infected with *L. donovani* 9551 (grey bars) and treated with Pentostam (200 μ g/ml) (white bars) were subjected to qRT-PCR for the gene *MX1* (A) and *GIP2* (B), two genes whose expression was modulated by *Leishmania* infections as determined by DNA microarrays (supplementary Table 2). Fold changes in expression were normalized with GAPDH. The amount of mRNA expression was expressed as a relative change standardized to control cells in each experiment. Each value represents the mean of three experiments. * $p < 0.05$

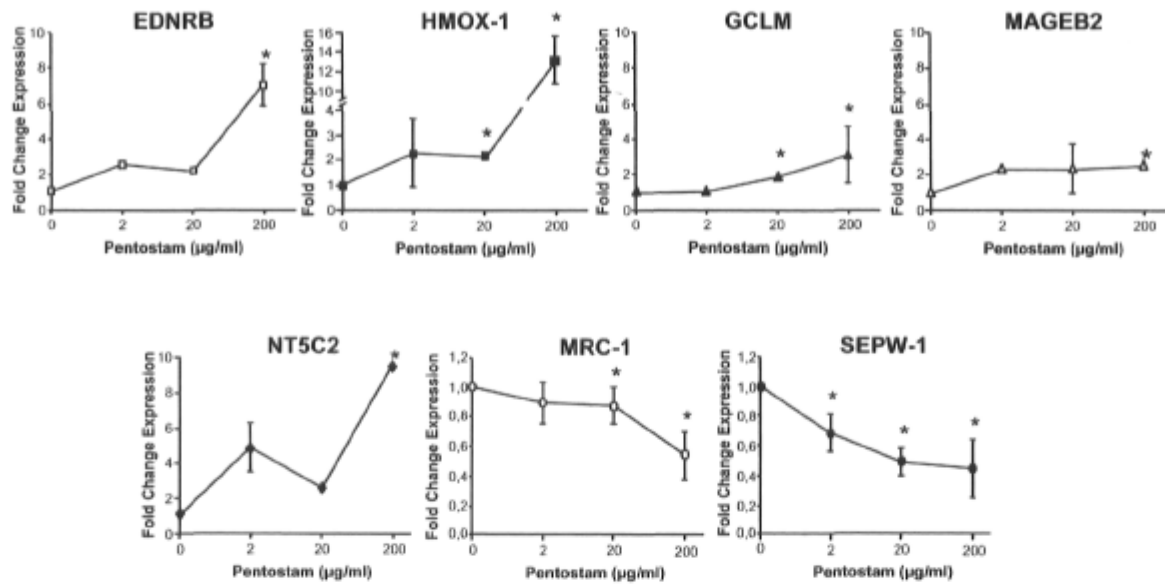


Figure 3. SbV mediated changes of gene expression in THP-1 cells as analyzed by quantitative real-time RT-PCR. RNA derived from THP-1 cells treated with Pentostam (200µg/ml), were subjected to qRT-PCR for the genes differentially expressed as determined by DNA microarrays (Table 1). Fold changes in expression were normalized with GAPDH. The amount of mRNA expression was expressed as a relative change standardized to control cells in each experiment. Each value represents the mean of three experiments. *p<0.05.

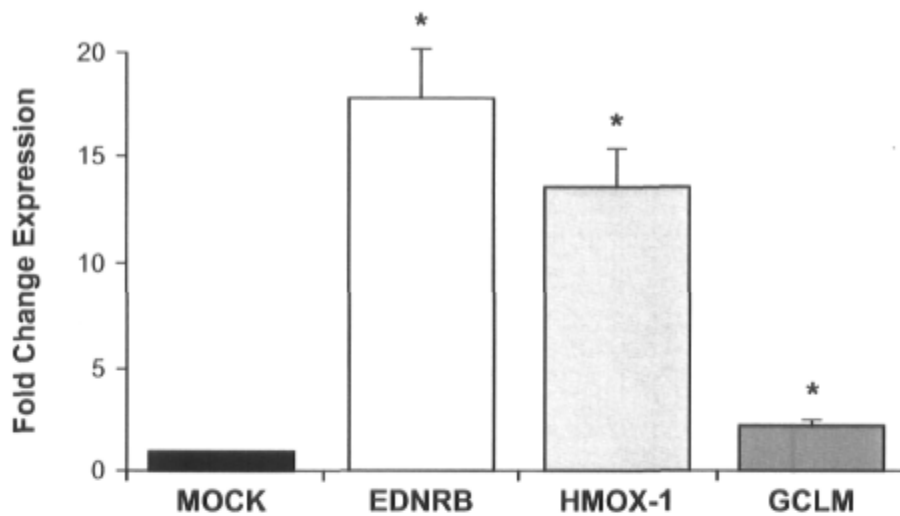


Figure 4. SbV mediated changes of gene expression in THP-1 cells treated by Glucantime as analyzed by quantitative real-time RT-PCR. RNA derived from THP-1 cells treated with Glucantime (200 μ g/ml), were subjected to qRT-PCR with primers for the *HMOX-1*, and *EDNRB*, and *GCLM* genes. Folds were normalized with *GAPDH* expression levels. The amount of mRNA expression was expressed as a relative change standardized to control cells in each experiment. Each value represents the mean of three experiments. * $p < 0.05$ for all values compared to mock.

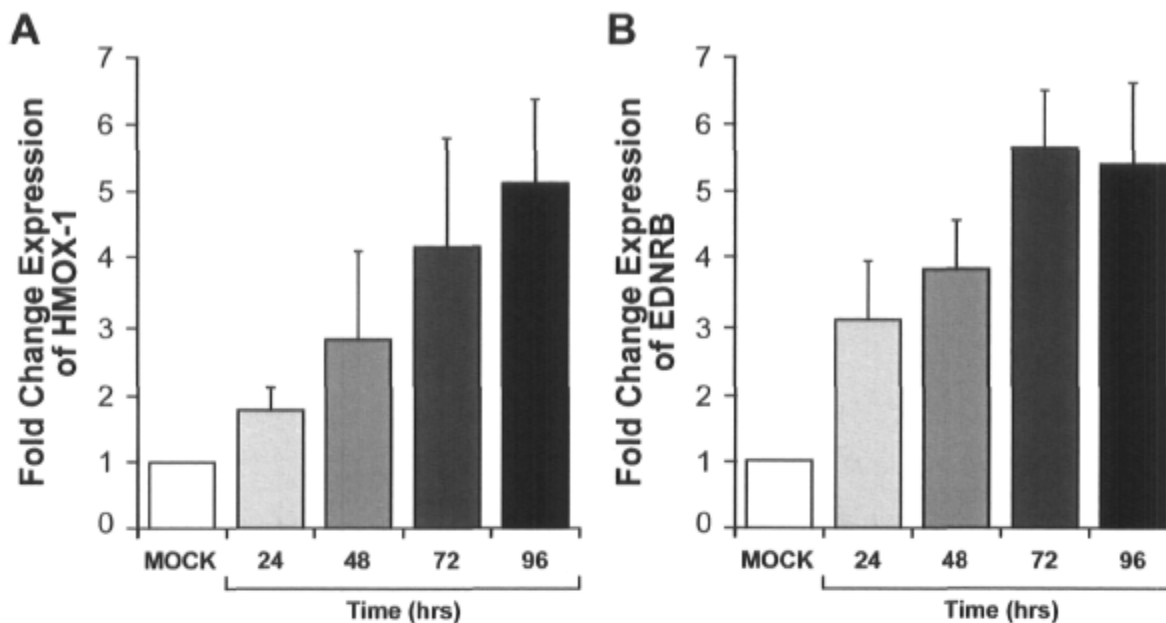


Figure 5. Time dependent SbV mediated changes of gene expression in THP-1 cells as analyzed by quantitative real-time RT-PCR. RNA derived from THP-1 cells treated with Pentostam at different time 0-96hrs, were subjected to qRT-PCR with primers for the *HMOX-1* (A), and *EDNRB* (B), genes. Folds were normalized with *GAPDH* expression levels. The amount of mRNA expression was expressed as a relative change standardized to control cells in each experiment. Each value represents the mean of three experiments. $p < 0.004$ for all values compared to mock.

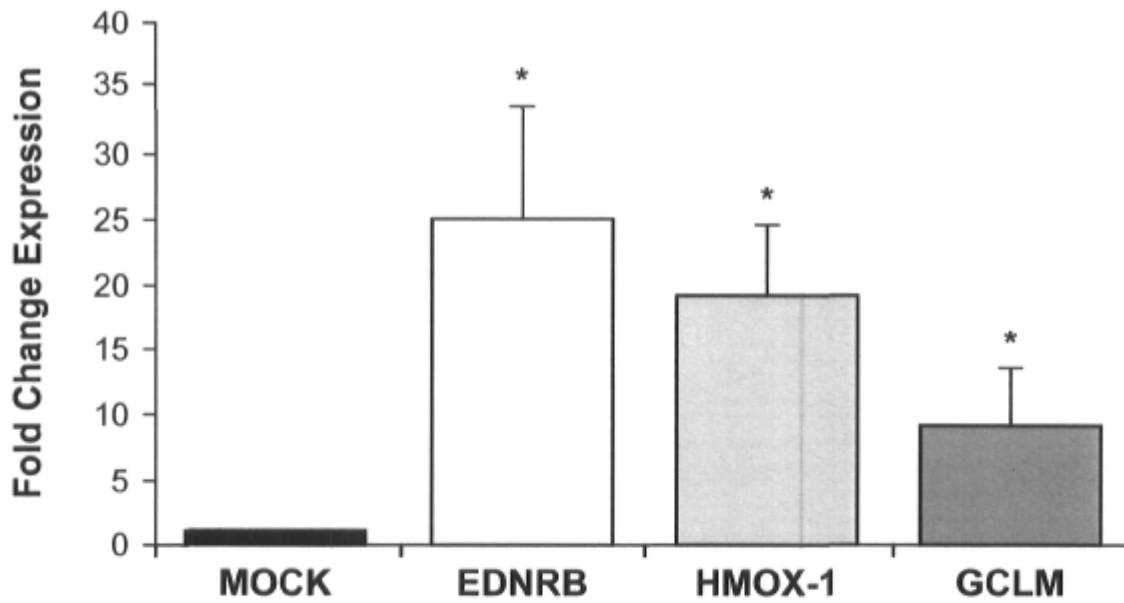


Figure 6. SbV alteration in gene expression in monocyte derived macrophages (MDMs) as determined by quantitative real-time RT-PCR. The change in expression level of *EDNRB*, *HMOX-1* and *GCLM* was analyzed by real-time RT-PCR on RNA derived from MDMs treated with Pentostam (200 μ g/ml). Folds were normalized with GAPDH. The amount of mRNA was expressed as a relative change standardized to control cells in each experiment. Each value represents the mean of two experiments from two different donors. * $p < 0.03$.

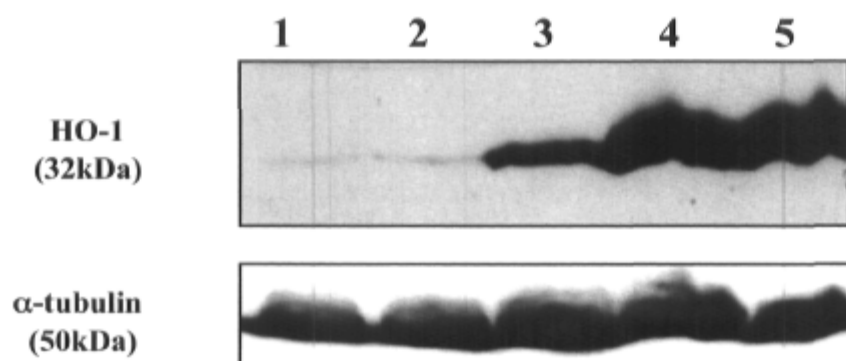


Figure 7. HO-1 expression in THP-1 cells. Western analysis directed against HO-1 of total proteins from THP-1 cells. 1, THP-1; 2, THP-1 + NaOH (0,2 μ M); 3, THP-1 + SbV (200 μ g/ml); 4, THP-1 + ZnPP IX (5 μ M); 5, THP-1 + SbV (200 μ g/ml) + ZnPP IX (5 μ M). All incubations lasted 4 days. α -tubulin was used as an internal control for gel loading. A representative experiment repeated three times is shown.

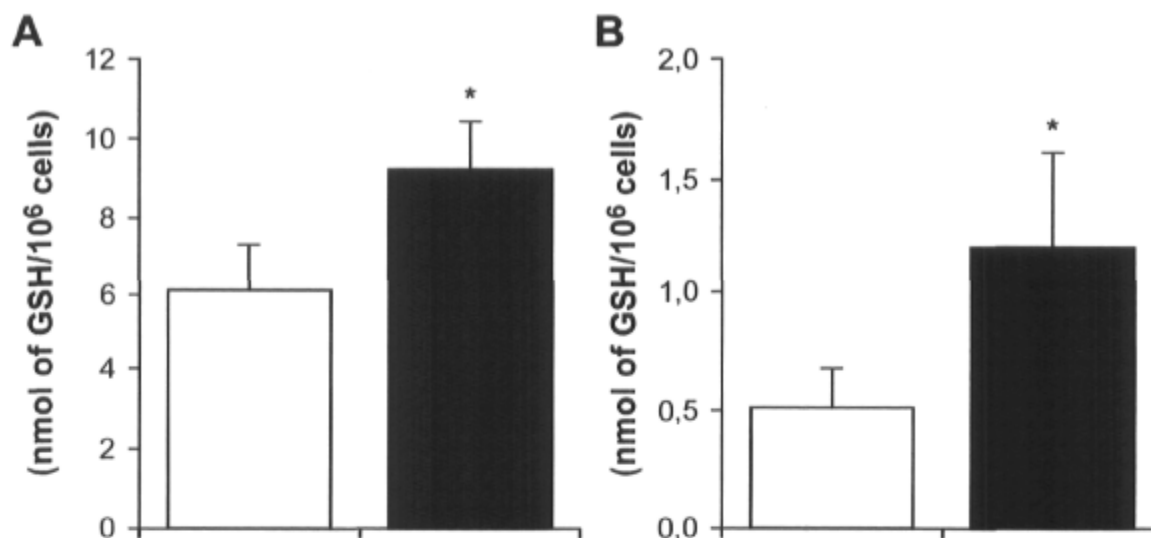


Figure 8. Quantitation of intracellular glutathione in SbV treated macrophages. Glutathione levels of THP-1 cells (A) or MDMs (B) were measured as described under Material and Methods. An average of triplicates for THP-1 cells is shown which has been repeated two times with similar results and for MDMs an average of two donors. White bars, untreated cells; black bars treated with 200 μ g/ml of Pentostam for 96 hrs. * $p < 0.02$.

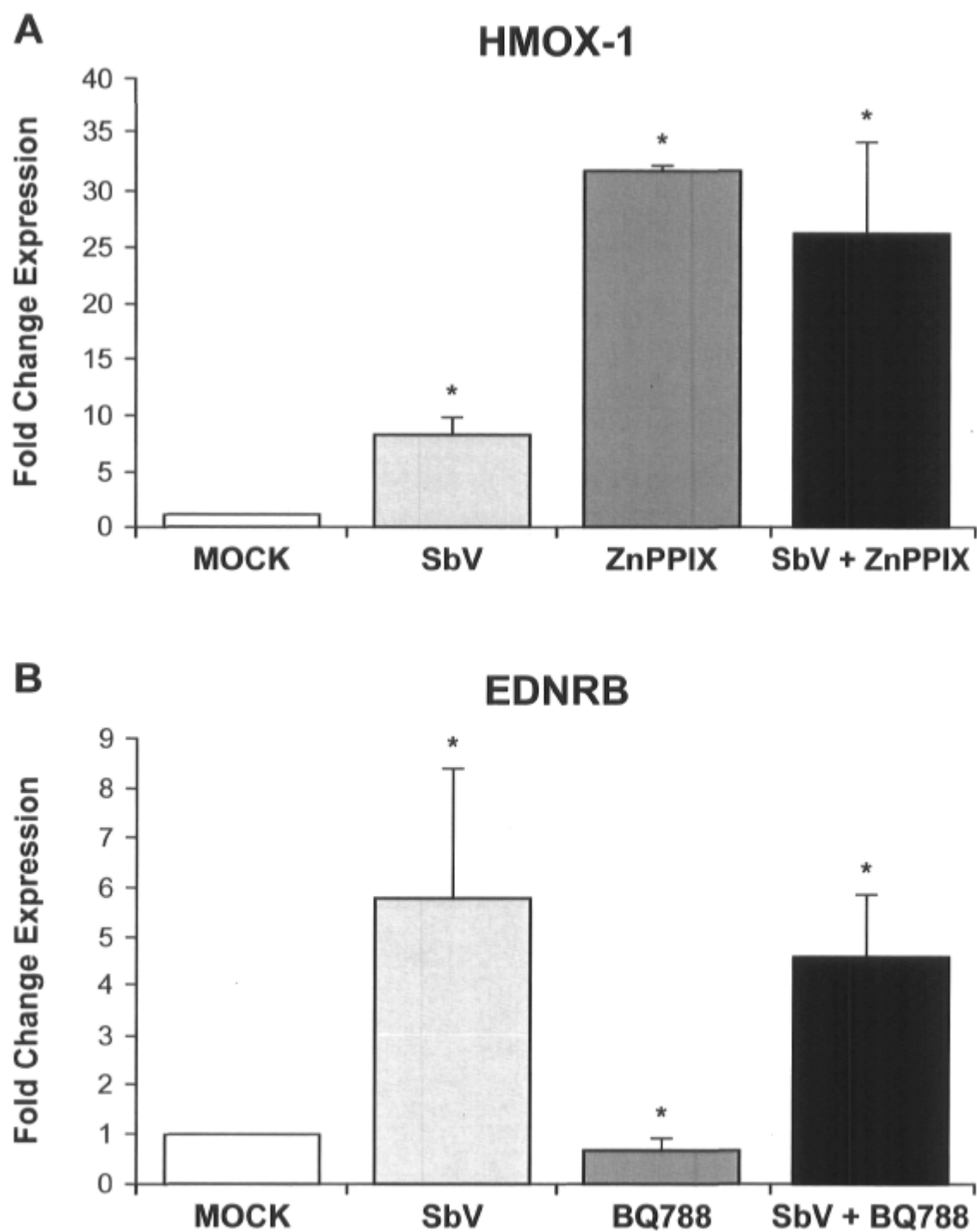


Figure 9. Modulation of *HMOX-1* and *EDNRB* mRNA expression in THP-1 cells. RNA expression of *HMOX-1* (A) and *EDNRB* (B) was measured by qRT-PCR in THP-1 cell line after

4 days of treatment with SbV (200 µg/ml) and ZnPP IX (5 µM) or BQ788 (10 µM) respectively. Folds were normalized with *GAPDH* expression levels. The amount of mRNA was expressed as a relative change standardized to control cells in each experiment. Each value represents the mean of three experiments. * $p < 0.05$.

Supplementary Table 1.**Table 1. Primers used for real-time RT-PCR.**

Genes	Forward	Reverse
Endothelin B receptor (EDNRB)	5'-AGACCTGCTGCACATCGTCA	5'-AACGGGATGAAGCAAGCAGA
Heme oxygenase-1 (HMOX-1)	5'-GGAGATTGAGCGCAACAAGG	5'-CTGCATGGCTGGTGTGTAGG
Human interferon-regulated resistance GTP-binding protein MxA	5'-ACTGAACCTGACCGTACAGACA GGACCATCGGAATCTTG	5'-AGTTCCTTTGTCCACCAGATCAG
Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit (GCLM)	5'-GCTGTGTGATGCCACCAGAT	5'-CACTCGTGCCTTGAATGTC
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC	5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCCTTCAGC
interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	5'-ACTGAACCTGACCGTACATGAGCA GCTCCATGTCCGGT	5'-TCTTCTGGGTGATCTGCGC
Mannose receptor, C type 1 (MRC-1)	5'-ATGGCTTCGTGGAGAACCAA	5'-GCCTTTCCTGCAGCCTTTTT
Melanoma antigen, family B, 2 (MAGEB2)	5'-CCCCCTGCTGTTCTCTTCT	5'-CACCAACGACCCTGACTTCC
5'-nucleotidase, cytosolic II (NT5C2)	5'-AATCAACGGTGGAGCACACA	5'-GTGGGAAGAGGTTGGGAGGT
Selenoprotein W-1 (SEPW-1)	5'-TCGTTTATTGTGGCGCTTGA	5'-CAACTTCCGGCTACCATCA

Supplementary Table 2.

Common Name	Gene symbol	Accession number	Leishmania	SbV	Leishmania + SbV	Function
Jagged 1	JAG1	NM_000214	0,12	0,40	0,35	Notch signaling pathway
cyclin D1	CCND1	NM_053056	0,22	0,22	0,27	G1/S transition of mitotic cell cycle
Frizzled homolog 7	FZD7	NM_003507	0,30	0,26	0,28	Wnt receptor activity
Dicer	DICER1	NM_177438	0,31	0,69	0,35	RNA interference, targeting of mRNA for destruction
cathepsin Z	CTSZ	NM_001336	0,34	0,66	0,34	proteolysis
RhoGEF protein	ARHGEF3	NM_019555	0,34	0,60	0,46	Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity
Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	ALOX5AP	NM_001629	0,36	0,61	0,54	inflammatory response
pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains, binding protein	PSCDBP	NM_004288	0,37	0,79	0,57	regulation of cell adhesion
serine/threonine kinase 3	STK3	NM_006281	0,39	0,68	0,69	signal transduction
multidrug resistance protein 3	ABCB4	NM_018850	0,39	0,64	0,82	response to drug
nuclear factor of activated T-cells 5	NFAT5	NM_138714	0,41	0,77	0,61	transcription factor activity
Zinc finger protein 36, C3H type-like 1	ZFP36L1	NM_004926	0,41	0,82	0,58	transcription factor activity
P2Y purinoceptor 5	P2RY5	NM_005767	0,41	0,74	0,65	G-protein coupled receptor protein signaling pathway
RAS-like protein A	RALA	NM_005402	0,41	0,73	0,59	signal transduction
speckle-type POZ protein	SPOP	NM_003563	0,41	0,61	0,51	mRNA processing
serine-protein kinase ATM	ATM	NM_000051	0,45	0,67	0,71	DNA repair
LIM and SH3 protein 1	LASP1	NM_006148	0,47	0,79	0,60	SH3/SH2 adaptor activity
Integrin, beta 5	ITGB5	NM_002213	0,47	0,84	0,76	integrin binding
CD1D antigen, d polypeptide	CD1D	NM_001766	0,47	0,90	0,82	positive regulation of innate immune response

glycogen synthase kinase 3 beta	GSK3B	NM_002093	0,47	0,82	0,53	glycogen metabolic process
Mesenchymal stem cell protein DSC54	LOC51334	NM_016644	0,48	0,70	0,57	-
insulin-like growth factor 1	IGF1	NM_000618	1,99	0,77	1,12	signal transduction
NMD3 homolog	CGI-07	NM_015938	2,04	1,48	1,92	-
XIAP associated factor-1	HSXIAPAF1	NM_017523	2,08	1,37	1,64	-
8D6 antigen	8D6A	NM_016579	2,10	1,32	1,70	regulation of cell growth
Exosome component 2	EXOSC2	NM_014285	2,11	1,27	1,47	rRNA processing
Friend leukemia virus integration 1	FLI1	NM_002017	2,12	1,37	1,25	transcription factor activity
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	NM_001565	2,23	0,67	0,83	chemokine activity
AXL receptor tyrosine kinase	AXL	NM_021913	2,24	1,24	1,56	transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity
RAD54 homolog B	RAD54B	NM_012415	2,30	1,38	1,83	mitotic/meiotic recombination
Thioredoxin domain containing	TXNDC	NM_030755	2,30	1,28	1,54	response to stress
Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	EEF1A2	NM_001958	2,31	0,94	2,35	protein binding
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	DDX58	NM_014314	2,32	1,17	1,10	protein binding
Interferon-induced protein 44	IFI44	NM_006417	2,53	0,96	0,99	response to virus, interferon related
Transforming growth factor, beta receptor I	TGFBR1	NM_004612	2,63	1,52	2,03	transforming growth factor beta receptor activity, type I
2'-5'-oligoadenylate synthetase 2	OAS2	NM_016817	2,63	1,23	1,36	response to virus, interferon related
Lymphocyte antigen 6 complex, locus E	LY6E	NM_002346	2,64	0,78	0,85	cell surface receptor linked signal transduction
Asparagine synthetase	ASNS	NM_183356	2,70	1,53	1,59	asparagine biosynthetic process
2'-5'-oligoadenylate synthetase 1	OAS1	NM_002534	2,95	0,80	0,93	response to virus, interferon related

Interferon induced transmembrane protein 1	IFITM1	NM_003641	2,95	0,84	0,94	cell surface receptor linked signal transduction, interferon related
interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	G1P2	NM_005101	3,80	1,17	1,68	ubiquitin cycle, interferon related
human interferon-regulated resistance gtp-binding protein mxa	MX1	NM_002462	4,39	1,31	1,50	signal transduction, interferon induced
signal transducer and activator of transcription 1	STAT1	NM_007315	4,39	1,53	2,12	transcription factor activity, interferon related

Chapitre V

Conclusions générales

V.1. DISCUSSION

Leishmania est un parasite protozoaire qui affecte plusieurs millions de gens dans le monde. Les manifestations cliniques de la maladie dépendent de l'espèce, et la forme la plus grave est la leishmaniose viscérale causée par *Leishmania donovani*. Le traitement de la maladie relève exclusivement de la chimiothérapie et l'antimoine pentavalent est encore la principale drogue (SbV) (115, 129). Les antimoinés pentavalents sont des pro-médicaments qui nécessitent une réduction biologique en la forme trivalente Sb(III) pour leur activité anti-leishmania (67, 209). Le site de la réduction (macrophage ou parasite) et aussi le type de la réduction (enzymatique ou non enzymatique) ne sont pas clairs. La cible moléculaire précise du SbV est inconnue mais il est probable que le macrophage puisse être impliqué directement ou non dans l'activité de Sb(V) (76, 245, 255, 298). L'émergence de souches résistantes à ces traitements prend de l'ampleur et représente un problème thérapeutique majeur, particulièrement dans certaines régions où la maladie est endémique, comme l'État de Bihar, en Inde, où près de 70 % des cas de leishmaniose ne répondent plus de façon adéquate aux traitements à base d'antimoine. Afin de comprendre les différents mécanismes impliqués dans la résistance à l'antimoine, plusieurs mutants promastigotes ont été sélectionnés pour leur résistance à l'antimoine trivalent (SbIII). En effet, la forme promastigote a servi de paradigme pour l'étude de la résistance au SbIII, d'une part parce qu'elle est plus facile à cultiver *in vitro*, et d'autre part parce que la plupart des travaux pertinents sur les mécanismes de résistance à l'antimoine ont été réalisés chez cette forme. Il était donc nécessaire de développer la culture de la forme amastigote du parasite *in vitro* afin de mieux comprendre les mécanismes de résistance aux médicaments et d'être plus proche des conditions *in vivo*.

Peu de travaux dans notre laboratoire ont été effectués en utilisant la forme amastigote axénique (41, 111) et c'est pour cette raison qu'une grande partie de mes travaux ont concerné cette forme du parasite.

V.1.1. Caractérisation du phénotype de résistance chez le mutant *L. infantum* amastigote axénique Sb2000.1

La résistance à l'antimoine a été induite chez la forme amastigote axénique du parasite (41, 254, 255) quoique aucun gène n'a encore été lié directement à la résistance. Pour étudier les mécanismes de résistance à l'antimoine chez la forme amastigote, *L. infantum* amastigote axénique a été sélectionné pour la résistance à SbIII (41).

Nous avons caractérisé le mutant Sb2000.1 amastigote axénique résistant à SbIII afin d'effectuer des expériences comparatives de puces à ADN avec la souche sensible. Ce mutant s'est avéré 200 fois plus résistant par rapport au sensible (Chapitre II, Fig.1A). De plus la résistance est stable puisque la souche révertante est restée résistante même après 20 passages sans SbIII. La forme amastigote axénique de la souche de *L. infantum* avec laquelle nous travaillons, n'est pas sensible à la forme pentavalente de l'antimoine (SbV) alors qu'elle est sensible au Pentostam quand les parasites infectent les macrophages THP-1 (Chapitre II, Fig.1B). De plus, le mutant Sb2000.1 sélectionné pour la résistance à SbIII montre une résistance croisée au Pentostam à l'intérieur du macrophage. Cette résistance croisée est illustrée à la figure 1B du chapitre II. Donc il semble évident que l'étude de mécanismes de résistance à SbIII est pertinente et peut nous instruire sur les mécanismes de résistance au SbV.

V.1.2. Étude de la résistance par puces à ADN chez le mutant *L. infantum* amastigote axénique Sb2000.1

La complexité du phénomène de résistance à l'antimoine rend fastidieuse l'étude des lignées de mutants ou des souches de terrains résistantes au traitement. En effet, de nombreux gènes doivent être testés pour vérifier s'ils sont amplifiés et/ou surexprimés. Suivent alors les études pour vérifier le phénotype relié aux amplifications et surexpression, que ce soient des activités enzymatiques, des études de transport, la quantification des thiols intracellulaires, etc. Les tests phénotypiques demeureront toujours une preuve nécessaire pour montrer que l'altération de l'expression d'un gène a bien un effet. Cependant, les amplifications et les surexpressions, ainsi que les sous-expressions, peuvent être détectées plus rapidement en utilisant la technique des puces à ADN qu'en faisant un Southern et un Northern pour chaque gène

suspect. En parasitologie, les puces à ADN ont montré leur utilité dans la recherche (chapitre II) sur *Leishmania* (116, 163), la malaria (37, 171, 293) et dans l'étude de *T. brucei* (82).

La création de puces à ADN pour *Leishmania* est facilitée par le projet de séquençage du génome de *L. major Friedlin*. Lors du début de notre projet de puces à ADN la séquence du génome n'était pas encore complétée. Il est maintenant disponible sur www.geneDB.org, et la séquence de *L. infantum* a également été réalisé et est disponible sur ce site, bien que les annotations ne soient pas complètes. Cependant, peu d'études ont portées sur la résistance à l'antimoine par les puces à ADN chez le parasite *Leishmania* (116).

V.1.2.1 MRPA

L'analyse de données présentées au chapitre II permet de confirmer le rôle important de MRPA dans la résistance au SbIII. En effet, *MRPA* est amplifié chez tous les mutants promastigotes résistants au SbIII. Les révertants de ces mutants ont perdu l'amplification de ce gène, en plus de celle de *GSH1*, ce qui a entraîné une perte importante du niveau de résistance au SbIII (plus de 10 fois) (120). Rappelons que MRPA procurerait la résistance aux métaux en séquestrant ceux-ci (préalablement lié au GSH ou au TSH) à l'intérieur d'une vacuole (figure 12 de l'introduction). Tous ces travaux ont été effectués chez la forme promastigote du parasite, et pour cette raison j'ai voulu étudier le mécanisme de résistance à l'antimoine chez la forme amastigote. Pour ce faire, j'ai choisi la méthode d'analyse de l'expression de l'ARN par les puces à ADN.

L'analyse comparative par puces à ADN entre la souche sensible axénique amastigote et le mutant Sb2000.1 axénique amastigote résistant à SbIII nous a révélé la surexpression au niveau de l'ARN du gène MRPA chez le mutant Sb2000.1 axénique amastigote pour la première fois (chapitre II). Les résultats obtenus par la technique des puces à ADN ont été confirmés par une technique alternative. Nous avons choisi les transferts de type Northern où les ARN sont hybridés à des sondes marquées. Grâce à cette technique, nous avons confirmé la surexpression du gène codant pour MRPA (chapitre III, Fig. 2). Il s'agit de la première explication moléculaire d'un mécanisme de résistance à l'antimoine chez le stade amastigote. Une technique alternative au

transfert de Northern est le PCR en temps réel quantitatif. Cette technique est maintenant très utilisée dans le laboratoire (103) et même un essai pour MRPA a été développé (163, 196).

La surexpression de gène chez *Leishmania* est souvent due à une amplification génique (32, 215). Ceci est probablement dû à l'absence de promoteurs reconnus par la polymérase de type pol II et donc il ne peut y avoir une surexpression par le changement au niveau de l'initiation de la transcription. Néanmoins il y a quelque rapport de modulation de l'expression de gènes sans changement du nombre de copie génique (116, 122, 177) et ceci devrait être due par exemple à une modulation dans la stabilité de l'ARN. L'amplification de MRPA a été rapportée dans plusieurs contextes (7, 36, 114, 119, 158, 160, 210, 211, 213) mais toujours chez la forme promastigote. Nous voulions donc savoir si l'augmentation de l'expression de MRPA chez le mutant axénique amastigote 2000.1 était due à une amplification de MRPA ou à un autre mécanisme. Nous avons effectué un transfert de type Southern qui nous a révélé que MRPA est surexprimé suite à une amplification et que cette amplification disparaissait chez le révertant (chapitre III, Fig. 3). Ces résultats suggèrent qu'une partie de la résistance chez les amastigotes est due à MRPA, puisque suite à la perte de l'amplicon contenant MRPA, les révertants sont encore très résistants à l'antimoine il faut en conclure que d'autres gènes sont impliqués dans la résistance. Il reste donc à trouver les autres gènes qui confèrent la plus grande partie de la résistance à la drogue. Une approche que nous avons utilisée est une approche protéomique (voir chapitre III) et effectivement de nouvelles protéines ont été isolées mais leur rôle dans la résistance reste à confirmer (section III. Table 1). Une approche complémentaire serait d'utiliser des puces à ADN couvrant tout le génome. En effet le laboratoire a maintenant cet outil très puissant disponible et d'ailleurs ces études sont actuellement en cours dans le laboratoire. Une autre technique complémentaire qui pourrait être utilisée est le clonage fonctionnel. Il s'agit ici de faire une banque génomique du mutant dans un cosmide d'expression et de transférer cette banque chez une cellule sensible et ensuite de sélectionner pour des clones résistants à l'antimoine. Ce type d'approche a déjà permis d'isoler de nouveaux gènes de résistance (40, 64, 152). Avec les avancées phénoménales dans les techniques de séquençage, il est même envisageable de séquencer une souche sensible et une souche résistante et ainsi de trouver les mutations ponctuelles, un type de mutation parfois plus difficilement identifiables par les techniques d'analyses d'expression globales.

Chez la forme promastigote de *L. tarentolae*, MRPA se localise à l'intérieur de la cellule et il conférerait la résistance par séquestration de conjugués antimoine-TSH à l'intérieur d'une vacuole (161). Nous avons utilisé la microscopie confocale afin de localiser MRPA chez la forme axénique amastigote par fusion de MRPA à la protéine verte fluorescente (GFP). Effectivement, nous avons trouvé que MRPA est localisé aussi à l'intérieur de la cellule chez la forme axénique amastigote (chapitre II, Fig. 4B). Cette construction a été transfectée chez l'isolat sensible à SbIII et a confirmé l'implication de MRPA pour la première fois dans le mécanisme de résistance chez la forme amastigote (chapitre II, Fig.4A).

On a montré que MRPA confère la résistance à SbIII chez la forme amastigote, toutefois SbV est un pro-médicament qui nécessite d'être activé et sa forme active est SbIII (76, 245, 298). L'activité de SbV contre la forme axénique amastigote est très faible (253), de ce fait on a décidé de tester le rôle de MRPA chez les parasites intracellulaires. Une transfection de la construction contenant le gène MRPA dans *L. panamensis* (connu pour être plus sensible à SbV que *L. infantum*) a été faite et ensuite on a infecté la lignée cellulaire THP-1 par les parasites recombinants. La transfection de MRPA a montré clairement un phénotype de résistance à SbV chez le parasite intracellulaire pour la première fois (chapitre II, Fig. 6A). Les transfections chez *L. infantum* ont été moins concluantes puisque cette espèce est intrinsèquement plus résistante à SbV. Il est possible également que la lignée cellulaire THP-1 ne soit pas toujours la meilleure pour tester l'activité de l'antimoine. En effet des données récentes dans le laboratoire montrent que parfois la lignée U937 est supérieure à THP-1 pour mesurer l'activité contre le SbV.

Le buthionine sulfoximine (BSO) est un inhibiteur spécifique du γ -glutamylcystéine synthase, l'enzyme qui catalyse l'étape limitante de la biosynthèse du glutathion. L'utilisation du BSO a permis de montrer qu'il réduit la résistance à l'antimoine *in vitro* (122) et *in vivo* (52). De plus la co-transfection de MRPA et de γ -GCS donne des niveaux de résistance synergique (114, 161). On a voulu ainsi tester si la résistance impliquant MRPA peut être diminuée par cet inhibiteur. Nos résultats ont indiqué qu'effectivement BSO a inversé le phénotype de résistance provoqué par MRPA chez les parasites intracellulaires (chapitre II, Fig.6B). Il est possible que BSO affecte le niveau des thiols des macrophages et des parasites et que cet effet collectif

diminue la résistance à SbV conférée par MRPA. Il est à noter que le BSO est en phase avancée d'étude clinique pour le traitement de certains cancers et donc si le BSO peut réverter la résistance chez les souches cliniques, cela pourrait s'avérer comme une combinaison (avec l'antimoine) des plus intéressantes.

V.1.2.2 Les thiols

Le trypanothion (TSH) est composé de deux molécules de glutathion conjuguées à une molécule de spermidine (10). Il représente le principal thiol réduit chez *Leishmania* et les trypanosomatidae en général (72). Le *Leishmania* est susceptible d'être exposé à des agents oxydants ainsi qu'à des métaux lourds pouvant réagir avec certaines de ses composantes cellulaires, tels l'ADN et les membranes lipidiques. Le TSH agit donc en assurant un environnement "réduit", de façon à limiter ces dommages. Plusieurs mutations impliquées dans la résistance et le mode d'action à l'antimoine sont reliées à la biosynthèse du trypanothion et de ses précurseurs, le glutathion et la spermidine. Il a été suggéré qu'une des façons de fonctionner de l'antimoine est de se lier aux thiols intracellulaires et ces conjugués sont alors expulsés de la cellule. Ce faisant il y a une diminution marquée des thiols intracellulaires (282). Ceci peut expliquer pourquoi la résistance est souvent liée à une augmentation de l'expression de gènes pouvant résulter dans une augmentation de la biosynthèse des précurseurs du TSH. Les gènes GSH1 et ODC ont souvent été mis en cause (114, 116, 120, 122, 123, 159). De plus l'amplification de MRPA et de GSH1 confère une plus grande résistance que l'amplification d'un seul de ces gènes. Notre analyse par puces à ADN nous a révélé la surexpression du gène S-adénosylehomocystéine hydrolase (SAHH) chez le mutant Sb2000.1 résistant à SbIII. SAHH est un des enzymes impliqué dans la biosynthèse du glutathion, la réaction catalysée par SAHH consiste en une hydrolyse de l'adénosylhomocystéine, formant ainsi l'homocystéine et l'adénosine (chapitre II, Fig.12). La SAHH a été clonée pour une première fois chez *L. donovani* afin d'étudier son potentiel thérapeutique pour un traitement sélectif aux parasites (128). Une étude a démontré l'amplification génique de la SAHH chez un autre mutant résistant au SbIII (116). Cette amplification ne mènerait pas à une augmentation de son niveau d'ARN. Toutefois notre analyse par Northern blot montre une surexpression au niveau de l'ARN chez le mutant Sb2000.1 axénique amastigote résistant à SbIII par contre aucune amplification n'a été observé.

Théoriquement, une augmentation de la SAHH pourrait mener à l'augmentation du niveau d'homocystéine et donc éventuellement à celui de la cystéine. On a utilisé la technique d' HPLC pour mesurer le niveau de TSH, GSH et de la cystéine. Effectivement le niveau de la cystéine est élevé chez le mutant Sb2000.1 par rapport au contrôle, alors que le niveau de TSH et de GSH n'a pas changé (chapitre II, Fig.5) par contre le niveau de base de TSH est 50 fois plus élevé chez *L. infantum* par comparaison à *L. tarentolae*. Ceci nous permet de supposer que SAHH est possiblement impliqué dans la résistance chez la forme axénique amastigote indirectement, cette implication consiste en l'augmentation du niveau de la cystéine un des précurseurs du glutathion.

V.1.3. Analyses protéomiques de la résistance chez le mutant amastigote axénique *L. infantum* Sb2000.1

L'analyse par transfert de type Southern nous a révélé que MRPA est surexprimé chez le mutant Sb2000.1 axénique amastigote résistant à SbIII suite à une amplification et que cette amplification disparaît chez le révertant (chapitre II). Ces résultats suggèrent qu'une partie de la résistance chez les amastigotes est due à MRPA, mais il reste à trouver les autres gènes qui confèrent la plus grande partie de la résistance à l'antimoine. Ces résultats nous ont incités à faire une comparaison plus détaillée de ce mutant en utilisant une technique protéomique comparative de gels 2D. Un des avantages de l'analyse protéomique comparativement aux puces à ADN est le fait que les protéines sont plus proches de la fonction que l'ARN et d'ailleurs comme dans plusieurs systèmes biologiques, la concordance entre le niveau d'ARN et de protéines n'est pas très bonne chez *Leishmania* (187). L'analyse protéomique permet aussi la détection de modifications post- traductionnelles (MPT) (84, 85, 187, 270). Notre analyse a révélé quelques protéines différemment exprimées et nous discuterons de quelques unes.

V.1.3.1. KMP-11

KMP-11 est une protéine membranaire majeure du kinetoplaste localisé au niveau de la poche flagellaire et du flagelle (22, 141). Cette protéine semble être impliquée dans la stabilité des molécules à l'intérieur de la membrane du parasite et dans les interactions avec les lipides de la membrane (142). Notre analyse comparative du protéome du mutant Sb2000.1 et du parasite

sauvage nous a révélé l'expression différentielle de plusieurs protéines (voir chapitre III, tableau 1) et une de ces protéines qui est sous-exprimée chez le mutant est KMP-11. La confirmation de ce résultat a été faite par analyse de type western blot (chapitre III, Fig.2). Aucune données de la littérature ne suggère une implication de KMP-11 dans la résistance, la plupart des études effectuées sur cette protéine ont été faites dans le but de produire un vaccin du fait que KMP-11 semble être impliqué dans la réponse immunitaire du macrophage lors de l'infection avec le parasite (18, 75). Pour élucider le rôle de KMP-11 dans la résistance à l'antimoine, nous avons transfecté des constructions du gène KMP-11 dans *L. infantum* promastigote et axénique amastigote sensibles à SbIII, malheureusement aucun phénotype n'a été observé. Le recours à l'inactivation du locus de KMP-11 chez l'isolat promastigote sensible a révélé un phénotype de résistance à SbIII. Il est possible que la diminution de l'expression de KMP-11 puisse altérer les interactions des différents transporteurs comme l'aquaglycéroporine AQP1 (111) ou avec les systèmes d'efflux (80). Toutefois nous n'avons pas pu reverser le phénotype en introduisant une copie du gène KMP-11 ce qui complique l'interprétation du phénotype de susceptibilité suite à une inactivation. Il faut tout de même indiquer que les complémentations d'inactivation génique ne sont jamais parfaites chez *Leishmania*. De plus, le fait que KMP-11 existe en trois copies et qu'une de ces copie contient 3 différents acides aminés, peut laisser suggérer que la combinaison des différents allèles de KMP-11 pourrait reversée le phénotype de résistance.

V.1.3.2. Autres protéines

L'analyse protéomique nous a révélé la présence de 8 protéines différentiellement exprimé en plus de KMP-11 (chapitre III, tableau 1). Des tubulines ou des fragments ont été détecté parmi ces 8 protéines, ce qui est fréquent dans les analyses protéomiques de *Leishmania* (84, 99) et il est improbable que la tubuline soit impliquée dans le phénomène de résistance à l'antimoine.

Deux autres protéines sont différentiellement exprimées chez le mutant SbIII axénique amastigote résistant à SbIII et qui n'ont jamais été liées à la résistance. Une phosphomannomutase (PMM) qui catalyse la conversion du mannose-6-phosphate en mannose-1-phosphate, une étape essentielle dans l'activation du mannose et la biosynthèse des glycoconjugués chez les eucaryotes (105, 136) et qui est plus abondante chez le mutant 2000.1.

L'autre protéine qui est sous produite chez le mutant Sb2000.1 axénique amastigote est LACK (Leishmania homologue of receptor for activated C kinase). LACK est un des antigènes de *Leishmania* qui peut être un candidat pour la vaccination (194). Nos études de transfections des gènes codant pour ces 2 protéines chez la souche sensible pour tenter de trouver un rôle dans la résistance, ont échoué. D'autres approches semblent être nécessaires pour élucider ou exclure leur contribution dans la résistance mais on ne peut exclure que ces mutations peuvent faciliter l'émergence de la résistance comme c'est le cas de l'enzyme S-adénosyle méthionine transférase et la résistance au méthotrexate (85). Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour tenter de prouver l'implication de LACK et PMM dans la résistance. Une expérience potentiellement intéressante, serait de faire l'inactivation du gène LACK et PMM comme on a procédé pour KMP-11. Des travaux sur PMM on montré son importance dans la glycosylation des lipides et des protéines, ceci par inactivation du gène PMM de *L. mexicana* (104). La mesure du niveau du mannose au niveau de la membrane a été mesurée par la technique de chromatographie à gaz-spectrométrie de masse.

V.1.4. Mode d'action de l'antimoine pentavalent à l'intérieur du macrophage

Leishmania donovani est un protozoaire intracellulaire obligatoire à l'intérieur de l'hôte mammifère qui réside et se multiplie exclusivement dans les phagolysosomes des macrophages (207). Le contrôle de l'infection causée par *Leishmania* est basé principalement sur l'utilisation du SbV. Le mode d'action de SbV n'est pas parfaitement connu. Toutefois des travaux ont pu apporter quelques éclaircissements (voir partie introduction). L'antimoine pentavalent peut être réduit soit à l'intérieur du macrophage ou du parasite et cette réduction peut être soit enzymatique ou non-enzymatique quoique rien n'est définitif. Pour explorer l'effet de SbV sur l'expression des gènes du macrophage, nous avons choisi une analyse par les puces Affymetrix contenant 8500 gènes humains, un peu moins du tiers des gènes connus. Nous avons procédé à la comparaison du niveau d'expression des gènes de la lignée cellulaire humaine THP-1 infectée ou non avec *L. donovani* (des isolats cliniques sensibles et résistants) traité ou non avec le Pentostam. Nos résultats ont montré une différence d'expression de 8 gènes (chapitre IV, tableau 1), et cette différence d'expression est due seulement à l'effet du médicament. La confirmation de ces résultats a été faite pour 7 gènes par PCR en temps réel.

V.1.4.1 HMOX-1

L'implication des 8 gènes identifiés dans la résistance n'est pas connue et n'a jamais été reliée à l'antimoine sauf pour le gène de l'hème oxygénase (HMOX-1). HMOX-1 est un gène codant pour l'enzyme HO-1 qui catalyse l'étape limitante dans la dégradation de l'hème en biliverdine, monoxyde de carbone et le fer (242). HO-1 est une protéine de choc thermique appelée HSP32, qui est activée par de nombreux stress cellulaires et son importance dans le stress oxydatif a déjà été démontré (1). Il y a déjà plusieurs années, une étude a montré que SbIII et SbV induisent la production de HO-1 (86) ce qui suppose une implication possible de cette enzyme dans le mode d'action de SbV. On sait que l'expression du gène HMOX-1 est contrôlée par plusieurs facteurs de transcription et des voies métaboliques (4). D'autre part, la voie métabolique d'ERK a été montrée importante pour l'induction de HO-1 par le métal arsenic (63) et aussi SbV semble induire à son tour la voie d'ERK (193). Ceci nous laisse supposer que probablement l'expression de HMOX-1 est augmentée via cette voie métabolique.

V.1.4.2 GCLM

GCLM est l'unité non catalytique de l'étape limitante de la biosynthèse de GSH et l'augmentation de son expression suggère qu'en contact avec le Pentostam, le GSH est augmenté. En effet, la mesure du niveau de GSH par HPLC a montré son augmentation. On sait que GSH réduit non-enzymatiquement le SbV (97) et que l'activité de SbV est associée avec la manipulation du niveau de GSH par le macrophage et le parasite (51). De plus, l'augmentation du niveau des thiols est associée avec la résistance à l'antimoine (120, 191, 196). Une augmentation de l'expression de GCLM a été observée aussi chez les MDMs traités au SbV, et l'expression de ce gène augmente avec l'augmentation de la concentration du Pentostam (chapitre IV, Figs.3,6). Donc, il est possible que pour compenser la diminution du niveau de GSH qui forme un complexe avec l'antimoine, la cellule a recourt à l'augmentation de GSH en augmentant l'expression de GCLM.

V.1.4.3 Autres gènes

Un autre gène qui a été surexprimé fortement suite au traitement avec le SbV est le récepteur de l'endothéline de type B (EDNRB). Suite à la liaison de l'endothéline à ce récepteur, une vasodilatation est provoquée via la production de l'oxyde nitrique (248). L'expression du gène EDNRB a été observée aussi bien chez les cellules THP1 que les MDMs (chapitre IV, Fig.3, 6). Le rôle de ce gène dans le mode d'action de SbV n'est pas clair mais toutefois on a bien montré que SbV est un inducteur potentiel d'EDNRB puisqu'il induit son expression même en présence de BQ788 un inhibiteur compétitif de EDNRB (chapitre IV, Fig.9). Nous n'avons par contre obtenu aucune évidence que EDNRB pourrait être important pour le mode d'action de SbV. Pour tenter d'élucider ce rôle nous pourrions inactiver le gène EDNRB par l'ARN à interférence (siRNA). L'obtention de l'inactivation du gène nous permettra de conclure si le déficit en EDNRB altérera l'activité de SbV contre les parasites intracellulaires.

En plus de HMOX-1, GCLM et EDNRB, l'expression de d'autres gènes était modulée, dont 3 surexprimés et 2 sous exprimés suite à un traitement avec le SbV. Les 3 gènes surexprimés sont une nucléotidase cytosolique de type II (NT5C2), un antigène MAGEB2 et une apolipoprotéine (APOC1). Il n'est pas clair quel est le rôle que pourrait jouer ces 3 gènes dans le mode d'action de SbV. Les deux autres gènes qui sont sous-exprimés sont un récepteur de mannose (MRC1) et une sélénoprotéine SEPW1. Il a été suggéré que SEPW1 est la cible des métaux lourds comme le méthyle mercure (MeHg) et que son expression est dépendante du niveau de GSH (147). D'autres expériences sont nécessaires pour élucider le rôle de ces deux gènes dans le mode d'action de SbV.

Le nombre de gènes qui ont été modulé par SbV est faible (8) en comparaison avec le nombre de gènes modulés par l'effet du parasite *Leishmania* seul. En effet, notre analyse par les puces à Affymetrix a révélé l'expression différentielle de 44 gènes suite à une infection par le parasite indifféremment qu'il soit sensible ou résistant à SbV. Parmi ces gènes modifiés il y avait des gènes dont l'expression est lié à l'interféron (INF) (voir chapitre IV, supplementary table 2). L'utilisation des puces à ADN pour trouver des gènes humains impliqués dans l'interaction du macrophage avec le parasite a été faite chez les macrophages et les cellules dendritiques humaines infectées par soit *major* ou *L. infantum* (56), chez les macrophages de souris infectés

par *L. donovani* (42) et chez les macrophages de souris infectés par *L. chagasi* (237). Nos résultats diffèrent avec ces 3 travaux quoique certaines similarités aient été notées avec une des études. Par exemple MX1 est surexprimé 4.4 fois alors que leur résultats montrent le contraire, le gène est sous exprimé 3-4 fois par l'effet *L. major* et 2 fois par *L. donovani*. C'est aussi le cas pour OAS2, G1P2 et IFITM1 qui sont sous exprimés mais seulement par *L. major*, alors que *L. infantum* n'a aucun effet sur leur expression. STAT1 le seul qui n'est pas modulé par ces deux espèces alors qu'il est sur exprimé 4.4 fois dans notre expérience. Il reste tout de même à valider nos résultats par PCR en temps réel.

Récemment, des travaux effectués sur les cellules THP-1 infectées par *L. major* traitées ou non par l'interféron-gamma ont montré que *L. major* contrebalance la réponse à l'interféron-gamma à large échelle à l'intérieur des macrophages (83). Les gènes dont l'expression a été modulée par l'interféron sont impliqués dans différentes voies métaboliques comme dans la réponse immune innée, l'adhésion cellulaire et la dégradation du protéasome. Les gènes identifiés par ces travaux ne sont pas les même qu'on a trouvé, toutefois quelques gènes sont de la même famille comme ABCB11 qui est sous exprimé 12.77 fois par rapport à ABCB4 où nous avons observé un niveau d'expression diminué.

Tous ces résultats suggèrent que l'expression génique des macrophages varie selon l'espèce infectant et les facteurs stimulants ou inhibants ajoutés. Toutefois, il serait préférable de procéder à des confirmations de ces résultats par PCR à temps réel dans les mêmes conditions que notre expérience afin de valider nos contradictions avec leurs résultats. Aussi, il paraît très intéressant d'étudier l'effet de l'interféron sur les gènes identifiés.

V.2. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les régions où les leishmanioses sont présentes de façon endémique se sont significativement accrues dans le monde, et l'émergence ainsi que la diffusion accrue de souches résistantes aux traitements à base d'antimoine pentavalent complique leur contrôle. Par conséquent, une compréhension des mécanismes de résistance est primordiale. Les travaux présentés ici ont permis de démontrer les similitudes des mécanismes de résistance à SbIII chez la forme amastigote avec la forme promastigote. Ils ont également permis de souligner le rôle essentiel des thiols dans la résistance via l'expression du gène SAHH chez la forme amastigote et de confirmer l'implication de MRPA dans la résistance chez la forme intracellulaire pour la première fois. Aussi l'altération du phénotype de la résistance provoqué par MRPA à l'intérieur des macrophages par l'inhibiteur de γ -GCS nous propose une nouvelle voie thérapeutique tout en utilisant une combinaison de SbV avec le BSO, une combinaison qui a été montrée utile chez des modèles animaux (52).

Nous avons pu étudier plus profondément les mécanismes de la résistance à l'antimoine grâce à la technique des gels à deux dimensions et nous avons trouvé des nouvelles protéines qui n'ont jamais été liées à la résistance. KMP-11 est peut-être impliquée dans la résistance mais des expériences supplémentaires telles que la co-transfection des différentes allèles de KMP-11 sont nécessaires.

On a montré l'utilité des techniques de génomique et de protéomique dans l'étude de la résistance aux médicaments. Mais le nombre de gènes qu'on a imprimés sur les lames était limité donc il est préférable comme prochaine étape de faire une analyse du génome entier de *Leishmania* surtout que maintenant le séquençage est terminé (139) et que nous avons maintenant dans le laboratoire des lames représentant tout le génome. Notre analyse protéomique s'est limitée aux protéines solubles ce qui exclut la présence des protéines membranaires et les protéines à haut poids moléculaire, donc il serait préférable d'extraire les protéines membranaires surtout que la famille des transporteurs ABC sont membranaires et qu'au moins une est impliquée dans la résistance (MRPA) ou le mode d'action de l'antimoine.

Le mode d'action de SbV est mal connu, toutefois grâce à notre étude on a pu identifier quelques gènes qui pourraient potentiellement être impliqués. Un de ces gènes est HMOX-1 qui semble être impliqué dans le mécanisme d'action de SbV via la voie métabolique d'ERK, mais il serait souhaitable d'effectuer des expériences de signalisation en bloquant par exemple un des enzymes impliqués dans cette voie. Le piceatannol, un inhibiteur de la famille Syk kinases par exemple et SP600125 l'inhibiteur de c-Jun N-terminal kinase, dont leur efficacité a été montré dans l'inactivation de l'expression des gènes du Virus du VIH-1 suite à un traitement par le Pentostam (16). L'effet de ces inhibiteurs sera mesuré à l'intérieur des macrophages infectés ou non par *Leishmania* en mesurant l'activité luciférase. L'inactivation du gène HMOX-1 par la méthode de siRNA et les mesures de l'activité du parasite à l'intérieur des macrophages traités par SbV avec ou sans les inhibiteurs cités plus haut, pourrait confirmer l'implication du gène dans le mécanisme d'action de SbV. Concernant la voie de la biosynthèse du glutathion, nous avons montré l'importance de cette voie dans le mode d'action de SbV par augmentation du niveau de GSH et aussi par surproduction d'un des enzymes impliqués dans cette voie qui est GCLM. Le niveau d'expression des gènes GCLM, EDNRB et HMOX-1 chez les cellules MDMs était plus élevé que chez les cellules THP-1 ceci nous ouvre la possibilité d'effectuer une autre analyse mais cette fois si en utilisant l'ARN des MDMs et des puces avec le génome entier humain au lieu de 8500 gènes ce qui augmentera nos chances pour identifier un plus grand nombre de gènes surtout ceux impliqués dans les voies de signalisation et aussi un niveau d'expression plus élevé.

En conclusion générale, l'analyse protéomique et génomique des souches résistantes est un atout important pour identifier des cibles thérapeutiques potentielles. Une caractérisation de ces cibles nous renseigne sur leur fonctionnement. Ceci va permettre de développer d'une part des médicaments pour un traitement efficace contre la leishmaniose et d'autre part, pourra aider à contourner les obstacles rencontrés lors du traitement de la maladie dans différents pays.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Abraham, N. G., and A. Kappas.** 2005. Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Free Radic Biol Med* **39**:1-25.
2. **Adhuna, A., P. Saltora, and R. Bhatnagar.** 2000. Nitric oxide induced expression of stress proteins in virulent and avirulent promastigotes of *Leishmania donovani*. *Immunol Lett* **71**:171-6.
3. **Akopyants, N. S., R. S. Matlib, E. N. Bukanova, M. R. Smeds, B. H. Brownstein, G. D. Stormo, and S. M. Beverley.** 2004. Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* **136**:71-86.
4. **Alam, J., and J. L. Cook.** 2007. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**:166-74.
5. **Alekshun, M. N., and S. B. Levy.** 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128**:1037-50.
6. **Almeida, R., B. J. Gilmartin, S. H. McCann, A. Norrish, A. C. Ivens, D. Lawson, M. P. Levick, D. F. Smith, S. D. Dyal, D. Vetrie, T. C. Freeman, R. M. Coulson, I. Sampaio, H. Schneider, and J. M. Blackwell.** 2004. Expression profiling of the *Leishmania* life cycle: cDNA arrays identify developmentally regulated genes present but not annotated in the genome. *Mol Biochem Parasitol* **136**:87-100.
7. **Anacleto, C., M. C. Abdo, A. V. Ferreira, S. M. Murta, A. J. Romanha, A. P. Fernandes, and E. S. Moreira.** 2003. Structural and functional analysis of an amplification containing a PGPA gene in a glucantime-resistant *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* cell line. *Parasitol Res* **90**:110-8.
8. **Arana, F. E., J. M. Perez-Victoria, Y. Repetto, A. Morello, S. Castanys, and F. Gamarro.** 1998. Involvement of thiol metabolism in resistance to glucantime in *Leishmania tropica* [In Process Citation]. *Biochem Pharmacol* **56**:1201-8.
9. **Arevalo, I., B. Ward, R. Miller, T. C. Meng, E. Najjar, E. Alvarez, G. Matlashewski, and A. Llanos-Cuentas.** 2001. Successful treatment of drug-resistant cutaneous

- leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clin Infect Dis* **33**:1847-51.
10. **Ariyanayagam, M. R., and A. H. Fairlamb.** 1997. Diamine auxotrophy may be a universal feature of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol Biochem Parasitol* **84**:111-21.
 11. **Ariyanayagam, M. R., and A. H. Fairlamb.** 2001. Ovoidiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* **115**:189-98.
 12. **Arrebola, R., A. Olmo, P. Reche, E. P. Garvey, D. V. Santi, L. M. Ruiz-Perez, and D. Gonzalez-Pacanowska.** 1994. Isolation and characterization of a mutant dihydrofolate reductase- thymidylate synthase from methotrexate-resistant *Leishmania* cells. *J Biol Chem* **269**:10590-6.
 13. **Ashford, R. W., P. Desjeux, and P. deRaadt.** 1992. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitol. Today* **8**:104-105.
 14. **Balzi, E., and A. Goffeau.** 1994. Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta* **1187**:152-62.
 15. **Banuett, F.** 1998. Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:249-74.
 16. **Barat, C., C. Zhao, M. Ouellette, and M. J. Tremblay.** 2007. HIV-1 replication is stimulated by sodium stibogluconate, the therapeutic mainstay in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Dis* **195**:236-45.
 17. **Barker, K. S., S. Crisp, N. Wiederhold, R. E. Lewis, B. Bareither, J. Eckstein, R. Barbuch, M. Bard, and P. D. Rogers.** 2004. Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* **54**:376-385.
 18. **Basu, R., S. Bhaumik, J. M. Basu, K. Naskar, T. De, and S. Roy.** 2005. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *J Immunol* **174**:7160-71.

19. **Bayle, D., S. Wangler, T. Weitzenegger, W. Steinhilber, J. Volz, M. Przybylski, K. P. Schafer, G. Sachs, and K. Melchers.** 1998. Properties of the P-type ATPases encoded by the copAP operons of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter felis*. *J Bacteriol* **180**:317-29.
20. **Beard, S. J., R. Hashim, J. Membrillo-Hernandez, M. N. Hughes, and R. K. Poole.** 1997. Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the *zntA* gene (*o732*) encodes a cation transport ATPase. *Mol Microbiol* **25**:883-91.
21. **Bello, A. R., B. Nare, D. Freedman, L. Hardy, and S. M. Beverley.** 1994. PTR1: a reductase mediating salvage of oxidized pteridines and methotrexate resistance in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:11442-6.
22. **Berberich, C., G. Machado, G. Morales, G. Carrillo, A. Jimenez-Ruiz, and C. Alonso.** 1998. The expression of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein is developmentally regulated and stage specific. *Biochim Biophys Acta* **1442**:230-7.
23. **Berenguer, J., F. Gomez-Campdera, B. Padilla, M. Rodriguez-Ferrero, F. Anaya, S. Moreno, and F. Valderrabano.** 1998. Visceral leishmaniasis (Kala-Azar) in transplant recipients: case report and review. *Transplantation* **65**:1401-4.
24. **Berenson, J. R., and H. S. Yeh.** 2006. Arsenic compounds in the treatment of multiple myeloma: a new role for a historical remedy. *Clin Lymphoma Myeloma* **7**:192-8.
25. **Berman, J.** 2003. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* **16**:397-401.
26. **Berman, J. D.** 1996. Treatment of New World cutaneous and mucosal leishmaniases. *Clin Dermatol* **14**:519-22.
27. **Berman, J. D., J. V. Gallalee, and J. M. Best.** 1987. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem Pharmacol* **36**:197-201.
28. **Berman, J. D., J. V. Gallalee, and B. D. Hansen.** 1987. *Leishmania mexicana*: uptake of sodium stibogluconate (Pentostam) and pentamidine by parasite and macrophages. *Exp Parasitol* **64**:127-31.
29. **Berman, J. D., and M. Grogl.** 1988. *Leishmania mexicana*: chemistry and biochemistry of sodium stibogluconate (Pentostam). *Exp Parasitol* **67**:96-103.

30. **Berman, J. D., D. Waddell, and B. D. Hanson.** 1985. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother* **27**:916-20.
31. **Bernstam, L., and J. Nriagu.** 2000. Molecular aspects of arsenic stress [In Process Citation]. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **3**:293-322.
32. **Beverley, S. M.** 1991. Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* **45**:417-44.
33. **Bobrowicz, P., R. Wysocki, G. Owsianik, A. Goffeau, and S. Ulaszewski.** 1997. Isolation of three contiguous genes, ACR1, ACR2 and ACR3, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**:819-28.
34. **Borremans, B., J. L. Hobman, A. Provoost, N. L. Brown, and D. van Der Lelie.** 2001. Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *J Bacteriol* **183**:5651-8.
35. **Borst, P., and R. O. Elferink.** 2002. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* **71**:537-92.
36. **Borst, P., and M. Ouellette.** 1995. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* **49**:427-60.
37. **Bozdech, Z., M. Llinas, B. L. Pulliam, E. D. Wong, J. Zhu, and J. L. DeRisi.** 2003. The Transcriptome of the Intraerythrocytic Developmental Cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol* **1**:E5. Epub 2003 Aug 18.
38. **Brabec, V., and J. Kasparkova.** 2005. Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist Updat* **8**:131-46.
39. **Bray, P. G., M. P. Barrett, S. A. Ward, and H. P. de Koning.** 2003. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol* **19**:232-9.
40. **Brochu, C., A. Haimeur, and M. Ouellette.** 2004. The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite *leishmania*. *Cell Stress Chaperones* **9**:294-303.
41. **Brochu, C., J. Wang, G. Roy, N. Messier, X. Y. Wang, N. G. Saravia, and M. Ouellette.** 2003. Antimony Uptake Systems in the Protozoan Parasite *Leishmania* and

- Accumulation Differences in Antimony-Resistant Parasites. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3073-3079.
42. **Buates, S., and G. Matlashewski.** 2001. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. *J Immunol* **166**:3416-22.
 43. **Buckner, F. S., A. J. Wilson, T. C. White, and W. C. Van Voorhis.** 1998. Induction of resistance to azole drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:3245-50.
 44. **Bun-ya, M., K. Shikata, S. Nakade, C. Yompakdee, S. Harashima, and Y. Oshima.** 1996. Two new genes, PHO86 and PHO87, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **29**:344-51.
 45. **Burguera, J. L., Burguera, M., Petit de Pena, Y., Lugo, A. and Anez, N.** 1993. Selective determination of antimony (III) and antimony (IV) in serum and urine and of total antimony in skin biopsies of patients with encephalic *Leishmania* treated with meglumine antimoniate. *J Trace Elem Med Biol* **10**:66-70.
 46. **Callahan, H. L., and S. M. Beverley.** 1991. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *J Biol Chem* **266**:18427-30.
 47. **Callahan, H. L., A. C. Portal, R. Devereaux, and M. Grogl.** 1997. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:818-22.
 48. **Callahan, H. L., W. L. Roberts, P. M. Rainey, and S. M. Beverley.** 1994. The PGPA gene of *Leishmania major* mediates antimony (SbIII) resistance by decreasing influx and not by increasing efflux. *Mol Biochem Parasitol* **68**:145-9.
 49. **Carrío, J., M. de Colmenares, C. Riera, M. Gallego, M. Arboix, and M. Portus.** 2000. *Leishmania infantum*: stage-specific activity of pentavalent antimony related with the assay conditions. *Exp Parasitol* **95**:209-14.
 50. **Carter, K. C., S. Hutchison, A. Boitelle, H. W. Murray, S. Sundar, and A. B. Mullen.** 2005. Sodium stibogluconate resistance in *Leishmania donovani* correlates with greater tolerance to macrophage antileishmanial responses and trivalent antimony therapy. *Parasitology* **131**:747-57.
 51. **Carter, K. C., S. Hutchison, F. L. Henriquez, D. Legare, M. Ouellette, C. W. Roberts, and A. B. Mullen.** 2006. Resistance of *Leishmania donovani* to sodium

- stibogluconate is related to the expression of host and parasite gamma-glutamylcysteine synthetase. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:88-95.
52. **Carter, K. C., S. Sundar, C. Spickett, O. C. Pereira, and A. B. Mullen.** 2003. The In Vivo Susceptibility of *Leishmania donovani* to Sodium Stibogluconate Is Drug Specific and Can Be Reversed by Inhibiting Glutathione Biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1529-1535.
 53. **Carter, N. S., and A. H. Fairlamb.** 1993. Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter [published erratum appears in *Nature* 1993 Jan 28;361(6410):374]. *Nature* **361**:173-6.
 54. **Cavalier-Smith, T.** 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev* **57**:953-94.
 55. **Charest, H., W. W. Zhang, and G. Matlashewski.** 1996. The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* **271**:17081-90.
 56. **Chaussabel, D., R. T. Semnani, M. A. McDowell, D. Sacks, A. Sher, and T. B. Nutman.** 2003. Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. *Blood* **102**:672-81.
 57. **Chvalova, K., V. Brabec, and J. Kasparkova.** 2007. Mechanism of the formation of DNA-protein cross-links by antitumor cisplatin. *Nucleic Acids Res* **35**:1812-21.
 58. **Coderre, J. A., S. M. Beverley, R. T. Schimke, and D. V. Santi.** 1983. Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:2132-6.
 59. **Coelho, A. C., S. M. Beverley, and P. C. Cotrim.** 2003. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* **130**:83-90.
 60. **Coelho, A. C., N. Messier, M. Ouellette, and P. C. Cotrim.** 2007. Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*.
 61. **Coelho, A. C., E. H. Yamashiro-Kanashiro, S. F. Bastos, R. A. Mortara, and P. C. Cotrim.** 2006. Intracellular location of the ABC transporter PRP1 related to pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* **150**:378-83.

62. **Cole, S. P., K. E. Sparks, K. Fraser, D. W. Loe, C. E. Grant, G. M. Wilson, and R. G. Deeley.** 1994. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* **54**:5902-10.
63. **Cooper, K. L., K. J. Liu, and L. G. Hudson.** 2007. Contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase signaling in arsenite-stimulated hemoxygenase-1 production. *Toxicol Appl Pharmacol* **218**:119-27.
64. **Cotrim, P. C., L. K. Garrity, and S. M. Beverley.** 1999. Isolation of Genes Mediating Resistance to Inhibitors of Nucleoside and Ergosterol Metabolism in *Leishmania* by Overexpression/Selection. *J Biol Chem* **274**:37723-37730.
65. **Cowen, L. E., J. B. Anderson, and L. M. Kohn.** 2002. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **56**:139-65.
66. **Croft, S. L., K. D. Neame, and C. A. Homewood.** 1981. Accumulation of [¹²⁵Sb]sodium stibogluconate by *Leishmania mexicana amazonensis* and *Leishmania donovani* in vitro. *Comp Biochem Physiol C* **68C**:95-8.
67. **Croft, S. L., S. Sundar, and A. H. Fairlamb.** 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* **19**:111-26.
68. **Croft, S. L., and V. Yardley.** 2002. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des* **8**:319-42.
69. **Cunningham, M. L., and A. H. Fairlamb.** 1995. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. *Eur J Biochem* **230**:460-8.
70. **Dasgupta, B., K. Roychoudhury, S. Ganguly, P. Kumar Sinha, S. Vimal, P. Das, and S. Roy.** 2003. Antileishmanial drugs cause up-regulation of interferon-gamma receptor 1, not only in the monocytes of visceral leishmaniasis cases but also in cultured THP1 cells. *Ann Trop Med Parasitol* **97**:245-57.
71. **Davies, J., and G. D. Wright.** 1997. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol* **5**:234-40.
72. **De Craecker, S., C. Verbruggen, P. K. Rajan, K. Smith, A. Haemers, and A. H. Fairlamb.** 1997. Characterization of the peptide substrate specificity of glutathionylspermidine synthetase from *Crithidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasitol* **84**:25-32.

73. **Decuypere, S., S. Rijal, V. Yardley, S. De Doncker, T. Laurent, B. Khanal, F. Chappuis, and J. C. Dujardin.** 2005. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4616-21.
74. **Deeley, R. G., and S. P. Cole.** 1997. Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). *Semin Cancer Biol* **8**:193-204.
75. **Delgado, G., C. A. Parra-Lopez, L. E. Vargas, R. Hoya, M. Estupinan, F. Guzman, A. Torres, C. Alonso, I. D. Velez, C. Spinel, and M. E. Patarroyo.** 2003. Characterizing cellular immune response to kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) during *Leishmania (Viannia) panamensis* infection using dendritic cells (DCs) as antigen presenting cells (APCs). *Parasite Immunol* **25**:199-209.
76. **Denton, H., J. C. McGregor, and G. H. Coombs.** 2004. Reduction of antileishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol dependent reductase TDR1. *Biochem J* **1**.
77. **DeRisi, J., B. van den Hazel, P. Marc, E. Balzi, P. Brown, C. Jacq, and A. Goffeau.** 2000. Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants. *FEBS Lett* **470**:156-60.
78. **Descoteaux, S., P. S. Shen, P. Ayala, E. Orozco, and J. Samuelson.** 1992. P-glycoprotein genes of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* **23**:23-5.
79. **Desjeux, P., and J. Alvar.** 2003. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* **97 Suppl 1**:3-15.
80. **Dey, S., M. Ouellette, J. Lightbody, B. Papadopoulou, and B. P. Rosen.** 1996. An ATP-dependent As(III)-glutathione transport system in membrane vesicles of *Leishmania tarentolae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:2192-7.
81. **Dey, S., B. Papadopoulou, A. Haimeur, G. Roy, K. Grondin, D. Dou, B. P. Rosen, and M. Ouellette.** 1994. High level arsenite resistance in *Leishmania tarentolae* is mediated by an active extrusion system. *Mol Biochem Parasitol* **67**:49-57.
82. **Diehl, S., F. Diehl, N. El-Sayed, C. Clayton, and J. Hoheisel.** 2002. Analysis of stage-specific gene expression in the bloodstream and the procyclic form of *Trypanosoma brucei* using a genomic DNA-microarray. *Mol Biochem Parasitol* **123**:115.

83. **Dogra, N., C. Warburton, and W. R. McMaster.** 2007. Leishmania major abrogates IFN- γ induced gene expression in human macrophages on a global scale. *Infect Immun.*
84. **Drummel-Smith, J., V. Brochu, I. Girard, N. Messier, and M. Ouellette.** 2003. Proteome mapping of the protozoan parasite leishmania and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Mol Cell Proteomics* **2**:146-55.
85. **Drummel-Smith, J., I. Girard, N. Trudel, and M. Ouellette.** 2004. Differential protein expression analysis of Leishmania major reveals novel roles for methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in methotrexate resistance. *J Biol Chem* **279**:33273-80.
86. **Drummond, G. S., and A. Kappas.** 1981. Potent heme-degrading action of antimony and antimony-containing parasitocidal agents. *J Exp Med* **153**:245-56.
87. **Duncan, R. C., P. Salotra, N. Goyal, N. S. Akopyants, S. M. Beverley, and H. L. Nakhasi.** 2004. The application of gene expression microarray technology to kinetoplastid research. *Curr Mol Med* **4**:611-21.
88. **El Fadili, A., C. Kundig, and M. Ouellette.** 2002. Characterization of the folylpolyglutamate synthetase gene and polyglutamylation of folates in the protozoan parasite Leishmania. *Mol Biochem Parasitol* **124**:63-71.
89. **El Fadili, A., D. Richard, C. Kundig, and M. Ouellette.** 2003. Effect of polyglutamylation of methotrexate on its accumulation and the development of resistance in the protozoan parasite Leishmania. *Biochem Pharmacol* **66**:999-1008.
90. **El Fadili, K., N. Messier, P. Leprohon, G. Roy, C. Guimond, N. Trudel, N. G. Saravia, B. Papadopoulou, D. Legare, and M. Ouellette.** 2005. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in Leishmania infantum axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1988-93.
91. **Ellenberger, T. E., and S. M. Beverley.** 1987. Biochemistry and regulation of folate and methotrexate transport in Leishmania major. *J Biol Chem* **262**:10053-8.
92. **Ephros, M., A. Bitnun, P. Shaked, E. Waldman, and D. Zilberstein.** 1999. Stage-Specific Activity of Pentavalent Antimony against Leishmania donovani Axenic Amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:278-282.

93. **Fairlamb, A. H., and A. Cerami.** 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol* **46**:695-729.
94. **Fauchon, M., G. Lagniel, J. C. Aude, L. Lombardia, P. Soularue, C. Petat, G. Marguerie, A. Sentenac, M. Werner, and J. Labarre.** 2002. Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Mol Cell* **9**:713-23.
95. **Fernandes, L., C. Rodrigues-Pousada, and K. Struhl.** 1997. Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol Cell Biol* **17**:6982-93.
96. **Ferreira-Pinto, K. C., A. L. Miranda-Vilela, C. Anacleto, A. P. Fernandes, M. C. Abdo, M. L. Petrillo-Peixoto, and E. S. Moreira.** 1996. *Leishmania (V.) guyanensis*: isolation and characterization of glucantime-resistant cell lines. *Can J Microbiol* **42**:944-9.
97. **Ferreira Cdos, S., P. S. Martins, C. Demicheli, C. Brochu, M. Ouellette, and F. Frezard.** 2003. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biometals* **16**:441-6.
98. **Fischer, H. P., and C. Freiberg.** 2007. Applications of transcriptional profiling in antibiotics discovery and development. *Prog Drug Res* **64**:21, 23-47.
99. **Foucher, A. L., A. McIntosh, G. Douce, J. Wastling, A. Tait, and C. M. Turner.** 2006. A proteomic analysis of arsenical drug resistance in *Trypanosoma brucei*. *Proteomics* **6**:2726-32.
100. **Foucher, A. L., B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 2006. Prefractionation by digitonin extraction increases representation of the cytosolic and intracellular proteome of *Leishmania infantum*. *J Proteome Res* **5**:1741-50.
101. **Frezard, F., C. Demicheli, C. S. Ferreira, and M. A. Costa.** 2001. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:913-6.
102. **Frommel, T. O., and A. E. Balber.** 1987. Flow cytofluorimetric analysis of drug accumulation by multidrug-resistant *Trypanosoma brucei brucei* and *T. b. rhodesiense*. *Mol Biochem Parasitol* **26**:183-91.

103. **Gagnon, D., A. Foucher, I. Girard, and M. Ouellette.** 2006. Stage specific gene expression and cellular localization of two isoforms of the serine hydroxymethyltransferase in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **in press**.
104. **Garami, A., and T. Ilg.** 2001. Disruption of mannose activation in *Leishmania mexicana*: GDP-mannose pyrophosphorylase is required for virulence, but not for viability. *Embo J* **20**:3657-66.
105. **Garami, A., A. Mehlert, and T. Ilg.** 2001. Glycosylation defects and virulence phenotypes of *Leishmania mexicana* phosphomannomutase and dolicholphosphate-mannose synthase gene deletion mutants. *Mol Cell Biol* **21**:8168-83.
106. **Garlapati, S., E. Dahan, and M. Shapira.** 1999. Effect of acidic pH on heat shock gene expression in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **100**:95-101.
107. **Genois, N., B. Barbeau, M. Olivier, and M. J. Tremblay.** 2001. Inhibition of HIV-1-mediated syncytium formation and virus replication by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani* is due to an effect on early events in the virus life cycle. *Clin Exp Immunol* **124**:32-42.
108. **Ghosh, M., J. Shen, and B. P. Rosen.** 1999. Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:5001-5006.
109. **Gmuender, H., K. Kuratli, K. Di Padova, C. P. Gray, W. Keck, and S. Evers.** 2001. Gene expression changes triggered by exposure of *Haemophilus influenzae* to novobiocin or ciprofloxacin: combined transcription and translation analysis. *Genome Res* **11**:28-42.
110. **Goodman, A. L., and S. Lory.** 2004. Analysis of regulatory networks in *Pseudomonas aeruginosa* by genomewide transcriptional profiling. *Curr Opin Microbiol* **7**:39-44.
111. **Gourbal, B., N. Sonuc, H. Bhattacharjee, D. Legare, S. Sundar, M. Ouellette, B. P. Rosen, and R. Mukhopadhyay.** 2004. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem* **279**:31010-7.
112. **Goyard, S., H. Segawa, J. Gordon, M. Showalter, R. Duncan, S. J. Turco, and S. M. Beverley.** 2003. An in vitro system for developmental and genetic studies of *Leishmania donovani* phosphoglycans. *Mol Biochem Parasitol* **130**:31-42.

113. **Gregus, Z., A. Gyurasics, and I. Csanaky.** 2000. Biliary and urinary excretion of inorganic arsenic: monomethylarsonous acid as a major biliary metabolite in rats. *Toxicol Sci* **56**:18-25.
114. **Grondin, K., A. Haimeur, R. Mukhopadhyay, B. P. Rosen, and M. Ouellette.** 1997. Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene *gshI* and of the ABC transporter gene *pgpA* in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*. *Embo J* **16**:3057-65.
115. **Guerin, P. J., P. Olliaro, S. Sundar, M. Boelaert, S. L. Croft, P. Desjeux, M. K. Wasunna, and A. D. Bryceson.** 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* **2**:494-501.
116. **Guimond, C., N. Trudel, C. Brochu, N. Marquis, A. E. Fadili, R. Peytavi, G. Briand, D. Richard, N. Messier, B. Papadopoulou, J. Corbeil, M. G. Bergeron, D. Legare, and M. Ouellette.** 2003. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* **31**:5886-96.
117. **Gustin, M. C., J. Albertyn, M. Alexander, and K. Davenport.** 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:1264-300.
118. **Haas, W., D. Kaushal, J. Sublett, C. Obert, and E. I. Tuomanen.** 2005. Vancomycin stress response in a sensitive and a tolerant strain of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **187**:8205-10.
119. **Haimeur, A., C. Brochu, P. Genest, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 2000. Amplification of the ABC transporter gene *PGPA* and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol* **108**:131-5.
120. **Haimeur, A., C. Brochu, P. Genest, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 2000. Amplification of the ABC transporter gene *PGPA* and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol* **108**:131-135.
121. **Haimeur, A., G. Conseil, R. G. Deeley, and S. P. Cole.** 2004. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab* **5**:21-53.

122. **Haimeur, A., C. Guimond, S. Pilote, R. Mukhopadhyay, B. P. Rosen, R. Poulin, and M. Ouellette.** 1999. Elevated levels of polyamines and trypanothione resulting from overexpression of the ornithine decarboxylase gene in arsenite-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol* **34**:726-735.
123. **Haimeur, A., and M. Ouellette.** 1998. Gene amplification in *Leishmania tarentolae* selected for resistance to sodium stibogluconate [In Process Citation]. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:1689-94.
124. **Handman, E.** 2001. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev* **14**:229-43.
125. **Harris, R. M., D. C. Webb, S. M. Howitt, and G. B. Cox.** 2001. Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**:5008-14.
126. **Hart, D. T., W. J. Lauwers, G. Willemsens, H. Vanden Bossche, and F. R. Opperdoes.** 1989. Perturbation of sterol biosynthesis by itraconazole and ketoconazole in *Leishmania mexicana mexicana* infected macrophages. *Mol Biochem Parasitol* **33**:123-34.
127. **Hausmann, K. a. H., N. .** 1996. Protozoology. Thieme Medical Publishers, Inc., New York
128. **Henderson, D. M., S. Hanson, T. Allen, K. Wilson, D. E. Coulter-Karis, M. L. Greenberg, M. S. Hershfield, and B. Ullman.** 1992. Cloning of the gene encoding *Leishmania donovani* S-adenosylhomocysteine hydrolase, a potential target for antiparasitic chemotherapy. *Mol Biochem Parasitol* **53**:169-83.
129. **Herwaldt, B. L.** 1999. Leishmaniasis. *Lancet* **354**:1191-9.
130. **Holzer, T. R., W. R. McMaster, and J. D. Forney.** 2006. Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* **146**:198-218.
131. **Holzmuller, P., D. Sereno, M. Cavaleyra, I. Mangot, S. Daulouede, P. Vincendeau, and J. L. Lemesre.** 2002. Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Infect Immun* **70**:3727-35.

132. **Holzmueller, P., D. Sereno, and J. L. Lemesre.** 2005. Lower nitric oxide susceptibility of trivalent antimony-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4406-9.
133. **Hooshdaran, M. Z., K. S. Barker, G. M. Hilliard, H. Kusch, J. Morschhauser, and P. D. Rogers.** 2004. Proteomic analysis of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2733-5.
134. **Hooshdaran, M. Z., G. M. Hilliard, and P. D. Rogers.** 2005. Application of proteomic analysis to the study of azole antifungal resistance in *Candida albicans*. *Methods Mol Med* **118**:57-70.
135. **Hyde, J. E.** 2002. Mechanisms of resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. *Microbes Infect* **4**:165-74.
136. **Ilgoutz, S. C., J. L. Zawadzki, J. E. Ralton, and M. J. McConville.** 1999. Evidence that free GPI glycolipids are essential for growth of *Leishmania mexicana*. *Embo J* **18**:2746-55.
137. **Inselburg, J., D. J. Bzik, and T. Horii.** 1987. Pyrimethamine resistant *Plasmodium falciparum*: overproduction of dihydrofolate reductase by a gene duplication. *Mol Biochem Parasitol* **26**:121-34.
138. **Ishikawa, T., Z. S. Li, Y. P. Lu, and P. A. Rea.** 1997. The GS-X pump in plant, yeast, and animal cells: structure, function, and gene expression. *Biosci Rep* **17**:189-207.
139. **Ivens, A. C., C. S. Peacock, E. A. Wortley, L. Murphy, G. Aggarwal, M. Berriman, E. Sisk, M. A. Rajandream, E. Adlem, R. Aert, A. Anupama, Z. Apostolou, P. Attipoe, N. Bason, C. Bauser, A. Beck, S. M. Beverley, G. Bianchetti, K. Borzym, G. Bothe, C. V. Bruschi, M. Collins, E. Cadag, L. Ciarloni, C. Clayton, R. M. Coulson, A. Cronin, A. K. Cruz, R. M. Davies, J. De Gaudenzi, D. E. Dobson, A. Duesterhoeft, G. Fazelina, N. Fosker, A. C. Frasch, A. Fraser, M. Fuchs, C. Gabel, A. Goble, A. Goffeau, D. Harris, C. Hertz-Fowler, H. Hilbert, D. Horn, Y. Huang, S. Klages, A. Knights, M. Kube, N. Larke, L. Litvin, A. Lord, T. Louie, M. Marra, D. Masuy, K. Matthews, S. Michaeli, J. C. Mottram, S. Muller-Auer, H. Munden, S. Nelson, H. Norbertczak, K. Oliver, S. O'Neil, M. Pentony, T. M. Pohl, C. Price, B. Purnelle, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, R. Reinhardt, M. Rieger, J. Rinta, J. Robben, L. Robertson, J. C. Ruiz, S. Rutter, D. Saunders, M. Schafer, J. Schein, D.**

- C. Schwartz, K. Seeger, A. Seyler, S. Sharp, H. Shin, D. Sivam, R. Squares, S. Squares, V. Tosato, C. Vogt, G. Volckaert, R. Wambutt, T. Warren, H. Wedler, J. Woodward, S. Zhou, W. Zimmermann, D. F. Smith, J. M. Blackwell, K. D. Stuart, B. Barrell, et al. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**:436-42.
140. **Jang, J. H., and Y. J. Surh.** 2004. Bcl-2 attenuation of oxidative cell death is associated with up-regulation of gamma-glutamylcysteine ligase via constitutive NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **279**:38779-86.
141. **Jardim, A., V. Funk, R. M. Caprioli, and R. W. Olafson.** 1995. Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *Biochem J* **305 (Pt 1)**:307-13.
142. **Jardim, A., S. Hanson, B. Ullman, W. D. McCubbin, C. M. Kay, and R. W. Olafson.** 1995. Cloning and structure-function analysis of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *Biochem J* **305 (Pt 1)**:315-20.
143. **Jiang, T., Z. Guo, B. Dai, M. Kang, D. K. Ann, H. J. Kung, and Y. Qiu.** 2004. Bidirectional regulation between tyrosine kinase Etk/BMX and tumor suppressor p53 in response to DNA damage. *J Biol Chem* **279**:50181-9.
144. **Juan, C., M. D. Macia, O. Gutierrez, C. Vidal, J. L. Perez, and A. Oliver.** 2005. Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4733-8.
145. **Kala, S. V., M. W. Neely, G. Kala, C. I. Prater, D. W. Atwood, J. S. Rice, and M. W. Lieberman.** 2000. The MRP2/cMOAT transporter and arsenic-glutathione complex formation are required for biliary excretion of arsenic. *J Biol Chem* **275**:33404-8.
146. **Katzung, B. G.** 1995. Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut
Basic & Clinical Pharmacology:pp. 1046.
147. **Kim, Y. J., Y. G. Chai, and J. C. Ryu.** 2005. Selenoprotein W as molecular target of methylmercury in human neuronal cells is down-regulated by GSH depletion. *Biochem Biophys Res Commun* **330**:1095-102.
148. **Kitchin, K. T.** 2001. Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* **172**:249-61.

149. **Kitchin, K. T., and S. Ahmad.** 2003. Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis. *Toxicol Lett* **137**:3-13.
150. **Klokouzas, A., S. Shahi, S. B. Hladky, M. A. Barrand, and H. W. van Veen.** 2003. ABC transporters and drug resistance in parasitic protozoa. *Int J Antimicrob Agents* **22**:301-17.
151. **Kündig, C., A. Haimeur, D. Légaré, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 1999. Increased transport of pteridines compensates for mutations in the high affinity folate transporter and contributes to methotrexate resistance in the protozoan parasite *Leishmania tarentolae*. *Embo J* **18**:2342-2351.
152. **Kündig, C., E. Leblanc, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 1999. Role of the locus and of the resistance gene on gene amplification frequency in methotrexate resistant *Leishmania tarentolae*. *Nucleic Acids Res* **27**:3653-9.
153. **Lamontagne, J., and B. Papadopoulou.** 1999. Developmental Regulation of Spliced Leader RNA Gene in *Leishmania donovani* Amastigotes Is Mediated by Specific Polyadenylation. *J Biol Chem* **274**:6602-6609.
154. **Lawrence, F., and M. Robert-Gero.** 1985. Induction of heat shock and stress proteins in promastigotes of three *Leishmania* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:4414-7.
155. **Leandro, C., and L. Campino.** 2003. Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. *Int J Antimicrob Agents* **22**:352-7.
156. **Leblanc, E., B. Papadopoulou, C. Bernatchez, and M. Ouellette.** 1998. Residues involved in co-factor and substrate binding of the short-chain dehydrogenase/reductase PTR1 producing methotrexate resistance in *Leishmania* [In Process Citation]. *Eur J Biochem* **251**:768-74.
157. **Lecureur, V., D. Lagadic-Gossmann, and O. Fardel.** 2002. Potassium antimonyl tartrate induces reactive oxygen species-related apoptosis in human myeloid leukemic HL60 cells. *Int J Oncol* **20**:1071-6.
158. **Legare, D., S. Cayer, A. K. Singh, D. Richard, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 2001. ABC proteins of *Leishmania*. *J Bioenerg Biomembr* **33**:469-74.
159. **Légaré, D., B. Papadopoulou, G. Roy, R. Mukhopadhyay, A. Haimeur, S. Dey, K. Grondin, C. Brochu, B. P. Rosen, and M. Ouellette.** 1997. Efflux systems and increased trypanothione levels in arsenite-resistant *Leishmania*. *Exp Parasitol* **87**:275-82.

160. **Legare, D., D. Richard, R. Mukhopadhyay, Y. D. Stierhof, B. P. Rosen, A. Haimeur, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 2001. The Leishmania ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem* **276**:26301-7.
161. **Légaré, D., D. Richard, R. Mukhopadhyay, Y. D. Stierhof, B. P. Rosen, A. Haimeur, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 2001. The Leishmania ABC protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem* **276**:26301-26307.
162. **Leifso, K., G. Cohen-Freue, N. Dogra, A. Murray, and W. R. McMaster.** 2007. Genomic and proteomic expression analysis of Leishmania promastigote and amastigote life stages: the Leishmania genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol* **152**:35-46.
163. **Leprohon, P., D. Legare, I. Girard, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 2006. Modulation of Leishmania ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot Cell* **5**:1713-25.
164. **Levy, S. B.** 2002. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*:65S-71S.
165. **Li, Z. S., M. Szczypka, Y. P. Lu, D. J. Thiele, and P. A. Rea.** 1996. The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S- conjugate pump. *J Biol Chem* **271**:6509-17.
166. **Lin, Y. F., A. R. Walmsley, and B. P. Rosen.** 2006. An arsenic metallochaperone for an arsenic detoxification pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:15617-22.
167. **Lin, Y. F., J. Yang, and B. P. Rosen.** 2007. ArsD residues Cys12, Cys13 and Cys18 form an As(III) binding site required for arsenic metallochaperone activity. *J Biol Chem*.
168. **Lira, R., L. M. Contreras, R. M. Rita, and J. A. Urbina.** 2001. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *J Antimicrob Chemother* **47**:537-46.
169. **Liu, X. D., and D. J. Thiele.** 1997. Yeast metallothionein gene expression in response to metals and oxidative stress. *Methods* **11**:289-99.
170. **Lo, J. F., H. F. Wang, M. F. Tam, and T. C. Lee.** 1992. Glutathione S-transferase pi in an arsenic-resistant Chinese hamster ovary cell line. *Biochem J* **288**:977-82.

171. **Lovegrove, F. E., L. Pena-Castillo, N. Mohammad, W. C. Liles, T. R. Hughes, and K. C. Kain.** 2006. Simultaneous host and parasite expression profiling identifies tissue-specific transcriptional programs associated with susceptibility or resistance to experimental cerebral malaria. *BMC Genomics* **7**:295.
172. **Lovelace, J. K., D. M. Dwyer, and M. Gottlieb.** 1986. Purification and characterization of the extracellular acid phosphatase of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* **20**:243-51.
173. **Lovelace, J. K., and M. Gottlieb.** 1986. Comparison of extracellular acid phosphatases from various isolates of *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg* **35**:1121-8.
174. **Lugo de Yarbuh, A., N. Anez, Y. Petit de Pena, J. L. Burguera, and M. Burguera.** 1994. Antimony determination in tissues and serum of hamsters infected with *Leishmania garnhami* and treated with meglumine antimoniate. *Ann Trop Med Parasitol* **88**:37-41.
175. **Lux, H., N. Heise, T. Klenner, D. Hart, and F. R. Opperdoes.** 2000. Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **111**:1-14.
176. **Majiduddin, F. K., I. C. Materon, and T. G. Palzkill.** 2002. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *Int J Med Microbiol* **292**:127-37.
177. **Marquis, N., B. Gourbal, B. P. Rosen, R. Mukhopadhyay, and M. Ouellette.** 2005. Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol* **57**:1690-9.
178. **Marr, J. J.** 1991. Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and American trypanosomiasis. *J Lab Clin Med* **118**:111-9.
179. **Martinez, S., and J. J. Marr.** 1992. Allopurinol in the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *N Engl J Med* **326**:741-4.
180. **Maser, P., C. Sutterlin, A. Kralli, and R. Kaminsky.** 1999. A nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei* involved in drug resistance. *Science* **285**:242-4.
181. **McAtee, C. P., P. S. Hoffman, and D. E. Berg.** 2001. Identification of differentially regulated proteins in metronidazole resistant *Helicobacter pylori* by proteome techniques. *Proteomics* **1**:516-21.
182. **McConville, M. J., and J. E. Ralton.** 1997. Developmentally regulated changes in the cell surface architecture of *Leishmania* parasites. *Behring Inst Mitt*:34-43.

183. **McConville, M. J., L. F. Schnur, C. Jaffe, and P. Schneider.** 1995. Structure of Leishmania lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem J* **310 (Pt 3)**:807-18.
184. **McDermott, P. F., R. D. Walker, and D. G. White.** 2003. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *Int J Toxicol* **22**:135-43.
185. **McMaster, W. R., C. J. Morrison, M. H. MacDonald, and P. B. Joshi.** 1994. Mutational and functional analysis of the Leishmania surface metalloproteinase GP63: similarities to matrix metalloproteinases. *Parasitology* **108 Suppl**:S29-36.
186. **McMurry, L. M., B. H. Park, V. Burdett, and S. B. Levy.** 1987. Energy-dependent efflux mediated by class L (tetL) tetracycline resistance determinant from streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* **31**:1648-50.
187. **McNicoll, F., J. Drummelsmith, M. Muller, E. Madore, N. Boilard, M. Ouellette, and B. Papadopoulou.** 2006. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in Leishmania infantum. *Proteomics* **6**:3567-81.
188. **Meister, A., and M. E. Anderson.** 1983. Glutathione. *Annu Rev Biochem* **52**:711-60.
189. **Menezes, R. A., C. Amaral, A. Delaunay, M. Toledano, and C. Rodrigues-Pousada.** 2004. Yap8p activation in Saccharomyces cerevisiae under arsenic conditions. *FEBS Lett* **566**:141-6.
190. **Miller, M. A., S. E. McGowan, K. R. Gantt, M. Champion, S. L. Novick, K. A. Andersen, C. J. Bacchi, N. Yarlett, B. E. Britigan, and M. E. Wilson.** 2000. Inducible resistance to oxidant stress in the protozoan leishmania chagasi. *J Biol Chem* **275**:33883-9.
191. **Mittal, M. K., S. Rai, Ashutosh, Ravinder, S. Gupta, S. Sundar, and N. Goyal.** 2007. Characterization of natural antimony resistance in leishmania donovani isolates. *Am J Trop Med Hyg* **76**:681-8.
192. **Mongodin, E., J. Finan, M. W. Climo, A. Rosato, S. Gill, and G. L. Archer.** 2003. Microarray transcription analysis of clinical Staphylococcus aureus isolates resistant to vancomycin. *J Bacteriol* **185**:4638-43.
193. **Mookerjee Basu, J., A. Mookerjee, P. Sen, S. Bhaumik, P. Sen, S. Banerjee, K. Naskar, S. K. Choudhuri, B. Saha, S. Raha, and S. Roy.** 2006. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via

- phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1788-97.
194. **Mougneau, E., F. Altare, A. E. Wakil, S. Zheng, T. Coppola, Z. E. Wang, R. Waldmann, R. M. Locksley, and N. Glaichenhaus.** 1995. Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science* **268**:563-6.
195. **Mukherjee, A., P. K. Padmanabhan, S. Singh, G. Roy, I. Girard, M. Chatterjee, M. Ouellette, and R. Madhubala.** 2006. Molecular analysis of antimony-resistant Indian field isolates of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* **in press**.
196. **Mukherjee, A., P. K. Padmanabhan, S. Singh, G. Roy, I. Girard, M. Chatterjee, M. Ouellette, and R. Madhubala.** 2007. Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* **59**:204-11.
197. **Mukhopadhyay, R., S. Dey, N. Xu, D. Gage, J. Lightbody, M. Ouellette, and B. P. Rosen.** 1996. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:10383-7.
198. **Mukhopadhyay, R., and B. P. Rosen.** 2002. Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environ Health Perspect* **110 Suppl 5**:745-8.
199. **Mukhopadhyay, R., and B. P. Rosen.** 2001. The phosphatase C(X)5R motif is required for catalytic activity of the *Saccharomyces cerevisiae* Acr2p arsenate reductase. *J Biol Chem* **276**:34738-42.
200. **Mukhopadhyay, R., and B. P. Rosen.** 1998. *Saccharomyces cerevisiae* ACR2 gene encodes an arsenate reductase. *FEMS Microbiol Lett* **168**:127-36.
201. **Mukhopadhyay, R., J. Shi, and B. P. Rosen.** 2000. Purification and characterization of Acr2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *J Biol Chem*.
202. **Ng, W. L., K. M. Kazmierczak, G. T. Robertson, R. Gilmour, and M. E. Winkler.** 2003. Transcriptional regulation and signature patterns revealed by microarray analyses of *Streptococcus pneumoniae* R6 challenged with sublethal concentrations of translation inhibitors. *J Bacteriol* **185**:359-70.
203. **Nucifora, G., L. Chu, T. K. Misra, and S. Silver.** 1989. Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:3544-8.

204. **Odermatt, A., H. Suter, R. Krapf, and M. Solioz.** 1992. An ATPase operon involved in copper resistance by *Enterococcus hirae*. *Ann N Y Acad Sci* **671**:484-6.
205. **Odermatt, A., H. Suter, R. Krapf, and M. Solioz.** 1993. Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem* **268**:12775-9.
206. **Olivier, M., R. Badaro, F. J. Medrano, and J. Moreno.** 2003. The pathogenesis of Leishmania/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. *Ann Trop Med Parasitol* **97 Suppl 1**:79-98.
207. **Olivier, M., D. J. Gregory, and G. Forget.** 2005. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* **18**:293-305.
208. **Ortiz, D. F., T. Ruscitti, K. F. McCue, and D. W. Ow.** 1995. Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J Biol Chem* **270**:4721-8.
209. **Ouellette, M., J. Drummelsmith, and B. Papadopolou.** 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* **7**:257-66.
210. **Ouellette, M., F. Fase-Fowler, and P. Borst.** 1990. The amplified H circle of methotrexate-resistant leishmania tarentolae contains a novel P-glycoprotein gene. *Embo J* **9**:1027-33.
211. **Ouellette, M., A. Haimeur, K. Grondin, D. Legare, and B. Papadopolou.** 1998. Amplification of ABC transporter gene *pgpA* and of other heavy metal resistance genes in *Leishmania tarentolae* and their study by gene transfection and gene disruption. *Methods Enzymol* **292**:182-93.
212. **Ouellette, M., E. Hettema, D. Wust, F. Fase-Fowler, and P. Borst.** 1991. Direct and inverted DNA repeats associated with P-glycoprotein gene amplification in drug resistant *Leishmania*. *Embo J* **10**:1009-16.
213. **Ouellette, M., D. Legare, A. Haimeur, K. Grondin, G. Roy, C. Brochu, and B. Papadopolou.** 1998. ABC transporters in *Leishmania* and their role in drug resistance. *Drug Resist Updat* **1**:43-8.
214. **Ouellette, M., D. Légaré, and B. Papadopolou.** 2001. Multidrug resistance and ABC transporters in parasitic protozoa. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**:201-6.

215. **Ouellette, M., and B. Papadopoulou.** 1993. Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. *Parasitol Today* **9**:150-3.
216. **Papadopoulou, B., J. Drummelsmith, and M. Ouellette.** 2004. Proteomics to Explore Pathogenesis and Drug Resistance Mechanisms in Protozoan Parasites. *In* H. Hondermarck (ed.), *Biomedical and Pharmaceutical applications of proteomics*. Kluwer Academic Publisher.
217. **Papadopoulou, B., G. Roy, S. Dey, B. P. Rosen, and M. Ouellette.** 1994. Contribution of the *Leishmania* P-glycoprotein-related gene *ltgpa* to oxyanion resistance. *J Biol Chem* **269**:11980-6.
218. **Papadopoulou, B., G. Roy, W. Mourad, E. Leblanc, and M. Ouellette.** 1994. Changes in folate and pterin metabolism after disruption of the *Leishmania* H locus short chain dehydrogenase gene. *J Biol Chem* **269**:7310-5.
219. **Papadopoulou, B., G. Roy, and M. Ouellette.** 1992. A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of *Leishmania*. *Embo J* **11**:3601-8.
220. **Pathak, M. K., and T. Yi.** 2001. Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *J Immunol* **167**:3391-7.
221. **Perez-Victoria, F. J., S. Castanys, and F. Gamarro.** 2003. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2397-403.
222. **Perez-Victoria, F. J., F. Gamarro, M. Ouellette, and S. Castanys.** 2003. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem* **278**:49965-71. Epub 2003 Sep 27.
223. **Perez-Victoria, F. J., M. P. Sanchez-Canete, K. Seifert, S. L. Croft, S. Sundar, S. Castanys, and F. Gamarro.** 2006. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist Updat* **9**:26-39.
224. **Perez-Victoria, J. M., F. J. Perez-Victoria, A. Parodi-Talice, I. A. Jimenez, A. G. Ravelo, S. Castanys, and F. Gamarro.** 2001. Alkyl-Lysophospholipid Resistance in Multidrug-Resistant *Leishmania tropica* and Chemosensitization by a Novel P-Glycoprotein-Like Transporter Modulator. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2468-74.

225. **Pimenta, P. F., E. M. Saraiva, and D. L. Sacks.** 1991. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Exp Parasitol* **72**:191-204.
226. **Proudfoot, L., P. Schneider, M. A. Ferguson, and M. J. McConville.** 1995. Biosynthesis of the glycolipid anchor of lipophosphoglycan and the structurally related glycoinositolphospholipids from *Leishmania major*. *Biochem J* **308 (Pt 1)**:45-55.
227. **Quijada, L., M. Soto, and J. M. Requena.** 2005. Genomic DNA macroarrays as a tool for analysis of gene expression in *Leishmania*. *Exp Parasitol* **111**:64-70.
228. **Radabaugh, T. R., and H. V. Aposhian.** 2000. Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: reduction of arsenate to arsenite by human liver arsenate reductase. *Chem Res Toxicol* **13**:26-30.
229. **Rais, S., A. Perianin, M. Lenoir, A. Sadak, D. Rivollet, M. Paul, and M. Deniau.** 2000. Sodium stibogluconate (Pentostam) potentiates oxidant production in murine visceral leishmaniasis and in human blood. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2406-10.
230. **Rensing, C., B. Fan, R. Sharma, B. Mitra, and B. P. Rosen.** 2000. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:652-6.
231. **Righetti, P. G., A. Castagna, P. Antonioli, and E. Boschetti.** 2005. Prefractionation techniques in proteome analysis: the mining tools of the third millennium. *Electrophoresis* **26**:297-319.
232. **Roberts, C. W., R. McLeod, D. W. Rice, M. Ginger, M. L. Chance, and L. J. Goad.** 2003. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol* **126**:129-42.
233. **Roberts, L. S. a. J., J.J. .** 2000. Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology. McGraw-Hill Higher Education, Boston.
234. **Roberts, W. L., J. D. Berman, and P. M. Rainey.** 1995. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:1234-9.
235. **Roberts, W. L., W. J. McMurray, and P. M. Rainey.** 1998. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). *Antimicrob Agents Chemother* **42**:1076-82.

236. **Roberts, W. L., and P. M. Rainey.** 1993. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:1842-6.
237. **Rodriguez, N. E., H. K. Chang, and M. E. Wilson.** 2004. Novel program of macrophage gene expression induced by phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *Infect Immun* **72**:2111-22.
238. **Rosen, B. P.** 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett* **529**:86-92.
239. **Rosen, B. P.** 1999. Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol* **7**:207-12.
240. **Rosen, B. P.** 1999. The role of efflux in bacterial resistance to soft metals and metalloids. *Essays Biochem* **34**:1-15.
241. **Rosen, B. P.** 2002. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **133**:689-93.
242. **Ryter, S. W., J. Alam, and A. M. Choi.** 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* **86**:583-650.
243. **Salotra, P., R. C. Duncan, R. Singh, B. V. Subba Raju, G. Sreenivas, and H. L. Nakhasi.** 2006. Upregulation of surface proteins in *Leishmania donovani* isolated from patients of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Microbes Infect.*
244. **Santa-Rita, R. M., H. Santos Barbosa, M. N. Meirelles, and S. L. de Castro.** 2000. Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* **75**:219-28.
245. **Santos Ferreira, C., P. S. Martins, C. Demicheli, C. Brochu, M. Ouellette, and F. Frezard.** 2003. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biometals* **16**:441-6.
246. **Sapunaric, F. M., and S. B. Levy.** 2005. Substitutions in the interdomain loop of the Tn10 TetA efflux transporter alter tetracycline resistance and substrate specificity. *Microbiology* **151**:2315-22.
247. **Saxena, A., E. A. Worthey, S. Yan, A. Leland, K. D. Stuart, and P. J. Myler.** 2003. Evaluation of differential gene expression in *Leishmania major* Friedlin procyclics and metacyclics using DNA microarray analysis. *Mol Biochem Parasitol* **129**:103-14.

248. **Schneider, M. P., E. I. Boesen, and D. M. Pollock.** 2007. Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**:731-59.
249. **Schneider, P., J. P. Rosat, J. Bouvier, J. Louis, and C. Bordier.** 1992. Leishmania major: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Exp Parasitol* **75**:196-206.
250. **Seifert, K., S. Matu, F. Javier Perez-Victoria, S. Castanys, F. Gamarro, and S. L. Croft.** 2003. Characterisation of Leishmania donovani promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int J Antimicrob Agents* **22**:380-7.
251. **Sereno, D., M. Cavaleyra, K. Zemzoumi, S. Maquaire, A. Ouaiissi, and J. L. Lemesre.** 1998. Axenically Grown Amastigotes of Leishmania infantum Used as an In Vitro Model To Investigate the Pentavalent Antimony Mode of Action. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:3097-3102.
252. **Sereno, D., P. Holzmuller, I. Mangot, G. Cuny, A. Ouaiissi, and J. L. Lemesre.** 2001. Antimonial-mediated DNA fragmentation in Leishmania infantum amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2064-9.
253. **Sereno, D., and J. L. Lemesre.** 1997. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:972-6.
254. **Sereno, D., and J. L. Lemesre.** 1997. In vitro life cycle of pentamidine-resistant amastigotes: stability of the chemoresistant phenotypes is dependent on the level of resistance induced [In Process Citation]. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:1898-903.
255. **Shaked-Mishan, P., N. Ulrich, M. Ephros, and D. Zilberstein.** 2001. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in Leishmania donovani. *J Biol Chem* **276**:3971-6.
256. **Shi, W., J. Dong, R. A. Scott, M. Y. Ksenzenko, and B. P. Rosen.** 1996. The role of arsenic-thiol interactions in metalloregulation of the ars operon. *J Biol Chem* **271**:9291-7.
257. **Shi, W., J. Wu, and B. P. Rosen.** 1994. Identification of a putative metal binding site in a new family of metalloregulatory proteins. *J Biol Chem* **269**:19826-9.
258. **Soualhine, H., V. Brochu, F. Menard, B. Papadopoulou, K. Weiss, M. G. Bergeron, D. Legare, J. Drummel-Smith, and M. Ouellette.** 2005. A proteomic analysis of

- penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals a novel role for PstS, a subunit of the phosphate ABC transporter. *Mol Microbiol* **58**:1430-40.
259. **Sudhandiran, G., and C. Shaha.** 2003. Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Biol Chem* **278**:25120-32. Epub 2003 Apr 21.
260. **Sun, H., S. C. Yan, and W. S. Cheng.** 2000. Interaction of antimony tartrate with the tripeptide glutathione implication for its mode of action. *Eur J Biochem* **267**:5450-7.
261. **Sundar, S.** 2003. Diagnosis of kala-azar--an important stride. *J Assoc Physicians India* **51**:753-5.
262. **Szczyпка, M. S., J. A. Wemmie, W. S. Moye-Rowley, and D. J. Thiele.** 1994. A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* **269**:22853-7.
263. **Tamas, M. J., and R. Wysocki.** 2001. Mechanisms involved in metalloloid transport and tolerance acquisition. *Curr Genet* **40**:2-12.
264. **Thaithong, S., S. W. Chan, S. Songsomboon, P. Wilairat, N. Seesod, T. Sueblinwong, M. Goman, R. Ridley, and G. Beale.** 1992. Pyrimethamine resistant mutations in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **52**:149-57.
265. **Thomas, D., and Y. Surdin-Kerjan.** 1997. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:503-32.
266. **Thorsen, M., Y. Di, C. Tangemo, M. Morillas, D. Ahmadpour, C. Van der Does, A. Wagner, E. Johansson, J. Boman, F. Posas, R. Wysocki, and M. J. Tamas.** 2006. The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Mol Biol Cell* **17**:4400-10.
267. **Thorsen, M., G. Lagniel, E. Kristiansson, C. Junot, O. Nerman, J. Labarre, and M. J. Tamas.** 2007. Quantitative transcriptome, proteome and sulfur metabolite profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* response to arsenite. *Physiol Genomics*.
268. **Tsukaguchi, H., C. Shayakul, U. V. Berger, B. Mackenzie, S. Devidas, W. B. Guggino, A. N. van Hoek, and M. A. Hediger.** 1998. Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *J Biol Chem* **273**:24737-43.

269. **Tsukaguchi, H., S. Weremowicz, C. C. Morton, and M. A. Hediger.** 1999. Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *Am J Physiol* **277**:F685-96.
270. **Vergnes, B., B. Gourbal, I. Girard, S. Sundar, J. Drummelsmith, and M. Ouellette.** 2007. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics* **6**:88-101.
271. **Vermitsky, J. P., K. D. Earhart, W. L. Smith, R. Homayouni, T. D. Edlind, and P. D. Rogers.** 2006. Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. *Mol Microbiol* **61**:704-22.
272. **Vernhet, L., A. Courtois, N. Allain, L. Payen, J. P. Anger, A. Guillouzo, and O. Fardel.** 1999. Overexpression of the multidrug resistance-associated protein (MRP1) in human heavy metal-selected tumor cells. *FEBS Lett* **443**:321-5.
273. **Vickers, T. J., and A. H. Fairlamb.** 2004. Trypanothione S-transferase activity in a trypanosomatid ribosomal elongation factor 1B. *J Biol Chem* **279**:27246-56.
274. **Webster, P., and D. G. Russell.** 1993. The flagellar pocket of trypanosomatids. *Parasitol Today* **9**:201-206.
275. **Weise, F., Y. D. Stierhof, C. Kuhn, M. Wiese, and P. Overath.** 2000. Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells. *J Cell Sci* **113**:4587-4603.
276. **Wiese, S., K. A. Reidegeld, H. E. Meyer, and B. Warscheid.** 2007. Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* **7**:340-50.
277. **Willsky, G. R., and M. H. Malamy.** 1980. Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **144**:356-65.
278. **Wilson, C. M., S. K. Volkman, S. Thaithong, R. K. Martin, D. E. Kyle, W. K. Milhous, and D. F. Wirth.** 1993. Amplification of *pfmdr 1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Mol Biochem Parasitol* **57**:151-60.
279. **Wilson, M., J. DeRisi, H. H. Kristensen, P. Imboden, S. Rane, P. O. Brown, and G. K. Schoolnik.** 1999. Exploring drug-induced alterations in gene expression in

- Mycobacterium tuberculosis by microarray hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:12833-8.
280. **Wolfgang, M. C., V. T. Lee, M. E. Gilmore, and S. Lory.** 2003. Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev Cell* **4**:253-63.
281. **Wu, Y., Y. El Fakhry, D. Sereno, S. Tamar, and B. Papadopoulou.** 2000. A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol Biochem Parasitol* **110**:345-57.
282. **Wyllie, S., M. L. Cunningham, and A. H. Fairlamb.** 2004. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* **279**:39925-32.
283. **Wyllie, S., and A. H. Fairlamb.** 2006. Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. *Biochem Pharmacol* **71**:257-67.
284. **Wysocki, R., P. Bobrowicz, and S. Ulaszewski.** 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *J Biol Chem* **272**:30061-6.
285. **Wysocki, R., C. C. Chery, D. Wawrzycka, M. Van Hulle, R. Cornelis, J. M. Thevelein, and M. J. Tamas.** 2001. The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **40**:1391-401.
286. **Wysocki, R., P. K. Fortier, E. Maciaszczyk, M. Thorsen, A. Leduc, A. Odhagen, G. Owsianik, S. Ulaszewski, D. Ramotar, and M. J. Tamas.** 2004. Transcriptional activation of metalloloid tolerance genes in *Saccharomyces cerevisiae* requires the AP-1-like proteins Yap1p and Yap8p. *Mol Biol Cell* **15**:2049-60.
287. **Yan, J., A. D. Kline, H. Mo, M. J. Shapiro, and E. R. Zartler.** 2003. The effect of relaxation on the epitope mapping by saturation transfer difference NMR. *J Magn Reson* **163**:270-6.
288. **Yan, S., F. Li, K. Ding, and H. Sun.** 2003. Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony(III) and trypanothione. *J Biol Inorg Chem* **8**:689-97.

289. **Yan, S., I. L. Wong, L. M. Chow, and H. Sun.** 2003. Rapid reduction of pentavalent antimony by trypanothione: potential relevance to antimonial activation. *Chem Commun (Camb)*:266-7.
290. **Yang, H. C., J. Cheng, T. M. Finan, B. P. Rosen, and H. Bhattacharjee.** 2005. Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **187**:6991-7.
291. **Yeates, C.** 2002. Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter Reed Army Institute). *Curr Opin Investig Drugs* **3**:1446-52.
292. **Yi, T., M. K. Pathak, D. J. Lindner, M. E. Ketterer, C. Farver, and E. C. Borden.** 2002. Anticancer activity of sodium stibogluconate in synergy with IFNs. *J Immunol* **169**:5978-85.
293. **Young, J. A., and E. A. Winzeler.** 2005. Using expression information to discover new drug and vaccine targets in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Pharmacogenomics* **6**:17-26.
294. **Zakharyan, R. A., G. Tsaprailis, U. K. Chowdhury, A. Hernandez, and H. V. Aposhian.** 2005. Interactions of sodium selenite, glutathione, arsenic species, and omega class human glutathione transferase. *Chem Res Toxicol* **18**:1287-95.
295. **Zaman, G. J., J. Lankelma, O. van Tellingen, J. Beijnen, H. Dekker, C. Paulusma, R. P. Oude Elferink, F. Baas, and P. Borst.** 1995. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:7690-4.
296. **Zhanel, G. G., M. Dueck, D. J. Hoban, L. M. Vercaigne, J. M. Embil, A. S. Gin, and J. A. Karlowsky.** 2001. Review of macrolides and ketolides: focus on respiratory tract infections. *Drugs* **61**:443-98.
297. **Zhao, C., B. Papadopoulou, and M. J. Tremblay.** 2004. *Leishmania infantum* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network. *Clin Immunol* **113**:81-8.
298. **Zhou, Y., N. Messier, M. Ouellette, B. P. Rosen, and R. Mukhopadhyay.** 2004. *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. *J Biol Chem* **279**:37445-51.