

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté

par

PETITDIDIER-LESIN Élodie

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**La PSA (Promastigote Surface Antigen) soluble de
Leishmania induit, sous forme recombinante ou peptidique,
une réponse immune protectrice chez le chien**

Soutenu le 10 décembre 2015 devant le jury suivant :

DE. Belamie Emmanuel	- Président
Pr. Marty Pierre	- Rapporteur
Pr. Delbecq Stéphane	- Examineur
Dr. Lemesre Jean-Loup	- Tuteur Scientifique
Pr. Dupressoir Thierry	- Tuteur Pédagogique

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. LEMESRE Jean-Loup

Institut de Recherche pour le Développement, UMR IRD/CIRAD INTERTRYP, 911 Av
Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5 (Directeur : Dr. SOLANO Philippe)

Et de

Pr. DUPRESSOIR Thierry, DE

Pathologie comparée des invertébrés, UMR 1333-INRA/Université de Montpellier, Place
Eugène Bataillon – CC 101, 34095 Montpellier cedex 5 (Directrice : Dr. VOLKOFF Anne-
Nathalie)

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté

par

PETITDIDIER-LESIN Élodie

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**La PSA (Promastigote Surface Antigen) soluble de
Leishmania induit, sous forme recombinante ou peptidique,
une réponse immune protectrice chez le chien**

Soutenu le 10 décembre 2015 devant le jury suivant :

DE. Belamie Emmanuel	- Président
Pr. Marty Pierre	- Rapporteur
Pr. Delbecq Stéphane	- Examineur
Dr. Lemesre Jean-Loup	- Tuteur Scientifique
Pr. Dupressoir Thierry	- Tuteur Pédagogique

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. LEMESRE Jean-Loup

Institut de Recherche pour le Développement, UMR IRD/CIRAD INTERTRYP, 911 Av
Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5 (Directeur : Dr. SOLANO Philippe)

Et de

Pr. DUPRESSOIR Thierry, DE

Pathologie comparée des invertébrés, UMR 1333-INRA/Université de Montpellier, Place
Eugène Bataillon – CC 101, 34095 Montpellier cedex 5 (Directrice : Dr. VOLKOFF Anne-
Nathalie)

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu le Dr. Jean-Loup Lemesre, Directeur de Recherche à l'Institut de Recherche pour le Développement, d'avoir encadré ce travail, de l'autonomie qu'il m'accorde et surtout de la confiance qu'il me témoigne depuis des années ... une confiance qui me permet d'évoluer et de m'épanouir dans mon métier, merci infiniment.

Je remercie le Pr. Pierre Marty, professeur des universités, praticien hospitalier au centre hospitalier universitaire de Nice et vice-doyen de la faculté de Médecine pour les Relations Internationales, d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail, mais aussi le Pr. Stéphane Delbecq, Directeur de l'Unité 'Vaccination anti-parasitaire' au Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de Montpellier, d'avoir accepté de l'examiner.

Je remercie également Monsieur Emmanuel Belamie, Directeur d'Études à l'École Pratique des Hautes Études, Institut Charles Gerhardt de Montpellier, de me faire l'honneur de présider ce jury.

Je remercie le Pr. Thierry Dupressoir, Directeur d'Études à l'École Pratique des Hautes Études, de m'avoir accompagné durant ces cinq années de formation.

Merci à Gérard Cuny, ex-Directeur de l'Unité INTERTRYP, parti en retraite et aujourd'hui doctorant en Histoire (mes respects !), et à Philippe Solano, notre nouveau Directeur d'Unité, de m'avoir accordé la réalisation de cette formation mais aussi pour leur bonne humeur et leur sympathie. Merci également à tous les membres de l'Unité et surtout à l'équipe 'Leish' pour leur patience et leur compréhension face à mon manque de disponibilité pendant la rédaction de mon mémoire.

Un grand merci au Dr. Rachel Bras-Gonçalves, Chargée de Recherche à l'IRD, pour son soutien, sa présence, ses conseils, les nombreuses discussions et réflexions scientifiques qui m'ont permis de mener à bien ce travail, pour son amitié depuis maintenant presque dix ans (déjà !) ... et aussi ... pour les fraises Tagada et bonbons en tout genre, le fameux Shrek et la reine d'Angleterre ... tu as su trouver les outils indispensables pour me remonter le moral et me redonner un coup de boost quand il le fallait ... et enfin, pour tous les bons moments passés ensemble en mission en Inde et en Tunisie, merci infiniment ...

J'aimerais également remercier Julie Pagniez, notre Ingénieur d'Études experte en biologie moléculaire, pour son aide technique dans le domaine et sa disponibilité.

Un grand merci aussi à Pierre Becquart, Chargé de Recherche à l'IRD, pour tous les moments de distraction ainsi que ses précieux conseils, notamment pour la rédaction de ce manuscrit.

Merci à Sophie Bonnel et Renaud Veyrier pour leur bonne humeur et tous les fous rires ... des grands moments qui m'ont marqué ... votre passage parmi nous restera inoubliable.

Merci également à Pascal Boutinaud et Nathalie Barougier pour leur aide technique à l'animalerie et leur disponibilité.

Merci à Francine et Valou pour les pauses divertissantes qui m'ont permis de lever un peu le nez de mon manuscrit.

Enfin, je tiens à remercier Sylvain, Heia, Alex, Nico, Guigui ... et tout particulièrement Oliv, pour leur présence à mes côtés, leur soutien, les week-ends 'grimpe', l'alpinisme, les vacances à l'autre bout du monde ... tous ces bons moments passés ensemble, les sensations fortes, qui m'ont permis de souffler durant toute cette période.

Sommaire

Abréviations	v
Liste des figures et tableaux	vii
Synthèse bibliographique	ix
1. Les leishmanioses	1
1.1. Épidémiologie	1
1.2. Symptomatologie	2
1.2.1. La leishmaniose cutanée	2
1.2.2. La leishmaniose cutanéomuqueuse	3
1.2.3. La leishmaniose viscérale	3
2. Les leishmanies, agents de la leishmaniose	6
2.1. Les principaux acteurs	6
2.1.1. Le parasite <i>Leishmania</i>	6
2.1.2. Le phlébotome, vecteur des leishmanies	6
2.1.3. Les réservoirs des leishmanies	8
2.2. Cycle biologique	9
2.2.1. Chez le vecteur	10
2.2.2. Chez l'hôte vertébré	10
2.3. Les antigènes leishmaniens	11
2.3.1. Les antigènes de surface	11
2.3.2. Les antigènes excrétés-sécrétés	11
2.3.3. Les interactions antigènes parasitaires – macrophage	12
3. Réponse immunitaire face à l'infection par <i>Leishmania</i>	13
3.1. Notion de résistance/susceptibilité de l'hôte à l'infection leishmanienne	13
3.2. Les premières étapes de l'infection	15
3.3. L'initiation de la réponse immune acquise et la destruction des amastigotes	16
4. Traitement des leishmanioses	17
4.1. Traitement de la leishmaniose cutanée	17
4.2. Traitement de la leishmaniose cutanéomuqueuse	18
4.3. Traitement de la leishmaniose viscérale	18
5. Vaccination	19
5.1. Les vaccins de première et seconde génération	19
5.2. Le vaccin peptidique	21

5.2.1.	Les avantages du vaccin peptidique	21
5.2.2.	Présentation des peptides au système immunitaire.....	22
5.2.3.	Objectifs du vaccin peptidique contre la leishmaniose humaine.....	22
Introduction au mémoire		23
1.	Développement d'un vaccin canin de première génération.....	23
2.	Identification de l'immunogène majeur des AES	24
3.	Production de la protéine recombinante	25
4.	Conception d'un parasite surexprimant <i>LiPSA-50S</i>	26
5.	Objectif de l'étude.....	27
Matériel et méthodes.....		28
1.	Étude du rôle biologique de la protéine <i>LiPSA-50S</i>	28
1.1.	Culture <i>in vitro</i> des formes promastigotes de leishmanies.....	28
1.2.	Vérification des souches de <i>Leishmania</i>	28
1.2.1.	Quantification de l'expression du gène <i>LiPSA-50S</i> par RT-qPCR.....	28
1.2.2.	Détection de la protéine <i>LiPSA-50S</i> dans les surnageants de culture parasitaire.....	29
1.2.2.1	Culture <i>in vitro</i> des différentes souches parasitaires	29
1.2.2.2	Récolte et préparation des AES	30
1.2.2.3	Gel SDS-PAGE et Western Blot	30
1.2.3.	Détection de la protéine membranaire <i>LiPSA-50S</i> à la surface des parasites par cytométrie en flux.....	31
1.3.	Tests d'infectiosité <i>in vitro</i>	32
1.3.1.	Récolte et préparation des macrophages péritonéaux murins.....	32
1.3.2.	Infection des macrophages par les parasites	32
1.4.	Étude de la virulence et de la pathogénicité des leishmanies transgéniques <i>in vivo</i>	33
1.4.1.	Infection des souris	33
1.4.2.	Détermination de la charge parasitaire.....	35
1.4.3.	Détermination de la capacité des splénocytes à proliférer	36
1.4.4.	Dosage des immunoglobulines dans les sérums.....	37
1.4.4.1	Quantification des immunoglobulines G totales et de leurs isotypes.....	37
1.4.4.2	Quantification des immunoglobulines G totales et de leurs isotypes dirigés contre la protéine <i>LaPSA-38S</i>	37
1.4.5.	Étude de la fonction des anticorps contenus dans les sérums des souris infectées.....	38
1.4.5.1	Effet des sérums de souris sur l'infectiosité <i>in vitro</i> des promastigotes vis-à-vis des macrophages	39
1.4.5.2	Évaluation de la cytotoxicité dépendante du complément.....	40

2. Utilisation de la protéine recombinante native purifiée <i>LaPSA-38S</i> et sa partie carboxy-terminale comme candidats vaccins : essai de vaccination chez le chien	41
2.1. Chiens utilisés dans l'étude	41
2.2. Candidats vaccins	41
2.3. Protocoles d'immunisation, d'épreuve infectieuse expérimentale et prélèvements de matériels biologiques	41
2.4. Suivis cliniques.....	43
2.5. Suivis immunologiques.....	43
2.5.1. Immunité à médiation cellulaire	43
2.5.1.1 Effets leishmanicides	43
2.5.1.2 Dosage du monoxyde d'azote dans les surnageants d'effets leishmanicides.....	44
2.5.1.3 Dosage de l'IFN- γ dans les surnageants d'effets leishmanicides	45
2.5.2. Immunité à médiation humorale	45
2.5.2.1 Détection des IgG2 dirigées contre <i>LaPSA-38S</i> ou <i>LaPSA-12S</i> dans les sérums.....	45
2.5.2.2 Effet neutralisant des sérums sur l'infectiosité <i>in vitro</i> des parasites vis-à-vis des macrophages	46
2.6. Suivis parasitologiques	47
2.6.1. Analyse parasitologique qualitative par culture parasitaire	47
2.6.2. Analyse parasitologique quantitative par PCR	47
3. Utilisation de peptides issus de la protéine <i>LaPSA-12S</i> comme candidats vaccins : essai de vaccination peptidique chez le chien	48
3.1. Chiens utilisés dans l'étude	48
3.2. Candidat vaccin	48
3.3. Protocoles d'immunisation, d'épreuve infectieuse expérimentale et prélèvements de matériels biologiques	49
3.4. Suivis des chiens.....	50
Résultats	51
1. Étude du rôle biologique de la protéine <i>LiPSA-50S</i>	51
1.1. Vérification des souches de <i>Leishmania</i>	51
1.1.1. Quantification de l'expression du gène <i>LiPSA-50S</i>	51
1.1.2. Vérification de la production de <i>LiPSA-50S</i> excrétée-sécrétée.....	51
1.1.3. Vérification de la production de PSA membranaire.....	53
1.2. La surexpression de la protéine <i>LiPSA-50S</i> augmente la virulence du parasite <i>in vitro</i>	54
1.3. Virulence et pathogénicité des leishmanies transgèniques <i>in vivo</i>	55
1.3.1. La surexpression de <i>LiPSA-50S</i> empêche le parasite de s'installer dans la rate	55

1.3.2.	Étude de la réponse immune à médiation cellulaire.....	55
1.3.3.	Étude de la réponse humorale	56
1.3.3.1	L'infection des souris par <i>Ldi</i> SENS induit une production d'immunoglobulines G	56
1.3.3.2	Rôle des anticorps dirigés contre la protéine <i>LiPSA-50S</i>	58
1.4.	La primo-infection par la souche surexprimant <i>LiPSA-50S</i> protège la souris d'une infection expérimentale à <i>Ldi</i> WT.....	60
2.	Développement d'un vaccin recombinant de seconde génération	61
2.1.	L'immunisation des chiens avec les protéines <i>LaPSA-38S</i> ou <i>LaPSA-12S</i> induit une réponse immunitaire à médiation cellulaire et humorale	62
2.1.1.	L'immunisation des chiens avec les protéines recombinantes induit une réponse immunitaire à médiation cellulaire de type Th1.....	62
2.1.2.	L'immunisation des chiens avec les protéines recombinantes induit la production d'anticorps spécifiques	64
2.1.2.1	Détection des IgG2 dirigées contre <i>LiESAp</i> et les protéines <i>LaPSA-38S</i> et <i>LaPSA-12S</i>	64
2.1.2.2	Les anticorps produits inhibent la prolifération <i>in vitro</i> des promastigotes de <i>L. infantum</i>	65
2.2.	L'immunisation avec les protéines recombinantes protège les chiens d'une infection expérimentale à <i>L. infantum</i>	66
3.	Développement d'un vaccin peptidique	68
3.1.	L'immunisation des chiens avec les peptides induit une réponse immunitaire à médiation cellulaire et humorale	68
3.1.1.	L'immunisation des chiens avec les peptides induit une réponse immunitaire à médiation cellulaire de type Th1	68
3.1.2.	L'immunisation des chiens avec les peptides induit la production d'anticorps spécifiques.....	71
3.2.	L'immunisation avec les peptides protège les chiens d'une infection expérimentale à <i>L. infantum</i>	72
	Discussion	74
	Conclusion et perspectives	83
	Références bibliographiques	87
	Annexes	94

Abréviations

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AES : Antigènes excrétés-sécrétés

ARN : Acide ribonucléique

BCG : Vaccin bilié de Calmette et Guérin (vaccin contre la tuberculose)

BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine

BSA : Bovine Serum Albumine

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

ConA : Concanavalin A

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes

CR : Récepteur au complément

CTL : Lymphocytes T cytotoxiques

DC : Cellules dendritiques

DO : Densité Optique

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ENVL : École Nationale Vétérinaire de Lyon

FcR : Récepteur de la partie constante des immunoglobulines

FML : Fucose-Mannose Ligand

FnR : Récepteur de la fibronectine

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

Gp63 : Glycoprotéine 63

GPI : Glycosyl-Phosphatidyl Inositol

HRP : Horseradish Peroxydase

IDR : Intradermo-réaction

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IP : Indice Parasitaire

kDa : kiloDalton

LaPSA-38S : Protéine PSA d'un poids moléculaire théorique de 38.6 kDa, naturellement excrétée-sécrétée par les formes promastigotes et amastigotes de *Leishmania amazonensis* (Accession Number GenBank : ACY70940.1)

LaPSA-12S : Protéine tronquée correspondant à la partie carboxy-terminale de LaPSA-38S d'un poids moléculaire théorique de 12.6 kDa (Accession Number GenBank : ACY70939.1)

LC : Leishmaniose cutanée

LCD : Leishmaniose cutanée diffuse

LCL : Leishmaniose cutanée localisée

LCM : Leishmaniose cutanéomuqueuse

Ldi SENS : Parasite *Leishmania infantum* transfecté avec le plasmide pTEX contenant le gène *LiPSA-50S* (Accession Number GenBank : FJ974055)

Ldi WT : parasite sauvage *Leishmania infantum* (référence OMS : MHOM/MA/67/ITMAP-263, clone 2, zymodème MON-1)

Ldi pTEX : Parasite *Leishmania infantum* transfecté avec le plasmide vide pTEX

LiESAp : Antigènes excrétés-sécrétés de promastigotes de *Leishmania infantum*

LiPSA-50S : Protéine PSA d'un poids moléculaire de 49.2 kDa, naturellement excrétée-sécrétée par les formes promastigotes de *Leishmania infantum* (Accession Number GenBank : ACY70941.1)

LPG : Lipophosphoglycane

LRR : Leucine-Rich Repeat

LV : Leishmaniose viscérale

MDP : Muramyl dipeptide

NK : Natural Killer

NO : Monoxyde d'azote

NOSi : NO Synthase inductible

OPD : Ortho Phénylène Diamine

PBMC : Cellules mononucléées du sang périphérique

PCR : Polymerase Chain Reaction

PKDL : Leishmaniose cutanée post kala-azar

PSA : Promastigote Surface Antigen

RT : Rétrotranscription

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

Slc11a1 : Solute carrier family 11a member 1

SVF : Sérum de veau foetal

TCR : Récepteur des cellules T

TGF : Tumor Growth Factor

Th : Lymphocytes T helpers

TNF : Tumor Necrosis Factor

Treg : Lymphocytes T régulateurs

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Liste des figures et tableaux

Figure 1. Répartition géographique des leishmanioses viscérale et dermique post kala azar, cutanée et muco-cutanée	1
Figure 2. Taxonomie des leishmanies	6
Figure 3. Un phlébotome prenant son repas sanguin sur un sujet humain	8
Figure 4. Cycle évolutif des leishmanies	9
Figure 5. Schéma de production de la PSA recombinante native de <i>L. amazonensis</i> (LaPSA-38S) chez <i>L. tarentolae</i>	26
Figure 6. Étude du rôle biologique de la protéine LiPSA-50S. Plan de l'expérimentation animale.	34
Figure 7. Planning de l'étude. Immunisation des chiens avec les protéines recombinantes, infection expérimentale et prélèvements à différents temps	42
Figure 8. Planning de l'étude. Immunisation des chiens avec les peptides, infection expérimentale et prélèvements à différents temps.....	49
Figure 9. Quantification par RT-qPCR de l'expression du gène <i>LiPSA-50S</i>	51
Figure 10. Révélation par Western blot de la protéine <i>LiPSA-50S</i>	52
Figure 11. Détection de la protéine <i>LiPSA-50S</i> à la surface des parasites	53
Figure 12. Virulence des leishmanies transgènes <i>in vitro</i>	54
Figure 13. Cinétique des charges parasitaires des rates de souris infectées.....	55
Figure 14. Analyse de la prolifération cellulaire face à une stimulation par la protéine <i>LaPSA-38S</i>	56
Figure 15. Cinétique du pourcentage d'immunoglobulines G et leurs isotypes dirigées contre la protéine <i>LiPSA-50S</i> dans les sérums des souris.....	57
Figure 16. Dosage des immunoglobulines G et leurs isotypes dirigées contre la protéine <i>LiPSA-50S</i> dans les sérums des souris.	58
Figure 17. Détermination de la capacité neutralisante ou opsonisante des anticorps	59
Figure 18. Détermination de la capacité des anticorps à activer les molécules du complément	60
Figure 19. Charge parasitaire des rates des souris primo-infectées par <i>Ldi</i> WT et <i>Ldi</i> SENS et challengées par <i>Ldi</i> WT.....	61
Figure 20. Activité leishmanicide des macrophages issus de chiens immunisés avec <i>LaPSA-38S</i> , <i>LaPSA-12S</i> ou ayant reçu le placebo.	62
Figure 21. Dosage des nitrites par la réaction de Griess dans les surnageants de co-culture.....	63
Figure 22. Dosage de l'IFN-g par ELISA dans les surnageants de co-culture.....	64
Figure 23. Evolution du taux d'anticorps IgG2 dirigés contre <i>LiESAp</i> , <i>LaPSA-38S</i> et <i>LaPSA-12S</i>	65
Figure 24. Effet des sérums des chiens immunisés sur la croissance parasitaire	66

Figure 25. Suivi parasitologique des chiens immunisés avec les protéines <i>LaPSA-38S</i> , <i>LaPSA-12S</i> ou ayant reçu le placebo	67
Figure 26. Activité leishmanicide des macrophages issus de chiens immunisés avec les peptides	69
Figure 27. Dosage de l'IFN-g par ELISA dans les surnageants de co-culture.....	70
Figure 28. Dosage des nitrites par la réaction de Griess dans les surnageants de co-culture.....	70
Figure 29. Evolution du taux d'anticorps IgG2 dirigés contre <i>LiESAp</i> et le peptide E34PC.....	71
Figure 30. Suivi parasitologique des chiens immunisés avec les peptides ou ayant reçu le placebo...	73

Tableau I. Tableau récapitulatif des différentes formes de leishmanioses.....	page 5
Tableau II. Les phlébotomes vecteurs des leishmanioses humaines.....	page 7
Tableau III. Quelques exemples de vaccins de première et seconde génération	page 20
Tableau IV. Composition des groupes de souris pour l'infection expérimentale.....	page 35

Synthèse bibliographique

1. Les leishmanioses

Les leishmanioses sont des parasitoses dues à des protozoaires flagellés appartenant au genre *Leishmania* et transmis à l'homme ou l'animal par la piqûre d'un phlébotome femelle infecté. Malgré les avancées de la recherche, les leishmanioses restent aujourd'hui encore un véritable problème de santé publique de par le nombre de personnes touchées, l'étendue de la zone géographique couverte ainsi que la diversité et la gravité des formes cliniques observées. Les manifestations cliniques varient en fonction de l'espèce parasitaire responsable et peuvent évoluer vers trois formes de leishmaniose : la leishmaniose cutanée (LC), la leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM), et la leishmaniose viscérale (LV).

1.1. Épidémiologie

Les différentes formes de leishmanioses sévissent sur quatre continents, essentiellement dans les régions tropicales et subtropicales [1]. Elles sont endémiques dans 98 pays, principalement en développement. On distingue les leishmanioses de l'Ancien Monde (Sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient et Asie) et celles du Nouveau Monde (Amériques du Nord, du Sud et Centrale). On estime que 350 millions de personnes sont exposées au parasite [2]. Plus de 2 millions de nouveaux cas de leishmanioses sont recensés chaque année dont 300 000 cas de LV (90% au Bangladesh, au Brésil, en Ethiopie, en Inde, au Népal, au Soudan et au Soudan du Sud) (**Figure 1 A**, d'après [3]) et 1 million de cas de LC (principalement en Afghanistan, en Algérie, en Arabie Saoudite, au Brésil, en Colombie, au Pakistan, au Pérou, en République arabe syrienne, en République islamique d'Iran, et en Tunisie) ou de LCM (principalement au Brésil, dans l'état plurinational de Bolivie et au Pérou) (**Figure 1 B**) [3, 4]. Pourtant, la leishmaniose reste l'une des maladies les plus négligées dans le monde.

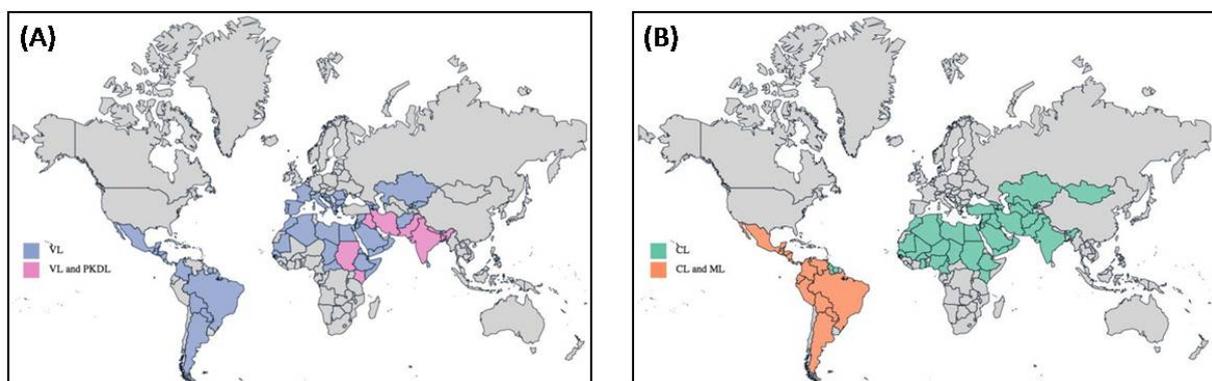


Figure 1. Répartition géographique des leishmanioses (A) viscérale (LV) et dermique post kala azar (PKDL), (B) cutanée (LC) et muco-cutanée (LCM).

1.2.Symptomatologie

Les manifestations cliniques chez l'homme sont très diverses et peuvent évoluer vers trois formes de leishmaniose (récapitulées dans le tableau I) :

1.2.1. La leishmaniose cutanée

La LC est la forme la plus répandue dans le monde. Le premier signe clinique correspond à une piqûre d'insecte persistante qui s'élargit pour aboutir finalement à la formation d'une lésion non douloureuse. L'apparence et l'étendue de la lésion varient non seulement en fonction de l'espèce parasitaire mais aussi des facteurs génétiques et de l'étendue de la réponse immunitaire de l'hôte. La LC survient habituellement sur des zones corporelles exposées et accessibles à l'insecte vecteur tels que le visage, le cou ou encore les membres.

La LC de l'Ancien Monde se manifeste tout d'abord par une papule indolore au point d'inoculation qui évolue au fil des semaines vers un nodule présentant une croûte en son centre, sous laquelle se trouve un ulcère induré et sec [5]. La guérison spontanée se fait sur plusieurs mois voire plusieurs années. Le nodule peut laisser une cicatrice et des altérations persistantes au niveau de la pigmentation de la peau. La LC de l'Ancien Monde est provoquée par 5 espèces de leishmanies : *Leishmania infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* et *L. donovani* (leishmaniose cutanée post kala-azar) [2].

La LC du Nouveau Monde peut prendre différentes formes et la guérison est moins spontanée que celle de l'Ancien Monde. On distingue la leishmaniose cutanée localisée (LCL), pour laquelle la progression des symptômes est similaire à celle de l'Ancien Monde, le nodule peut toutefois se manifester par un ulcère humide pouvant être associé à une lymphadénopathie [6]. La LCL est provoquée par de multiples espèces de leishmanies telles que *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* ou encore *L. infantum* (*chagasi*).

Les lésions cutanées peuvent également se disséminer et se manifester sous la forme de multiples lésions non-ulcéreuses qui peuvent être très étendues (plus d'une centaine de lésions) et de gravité variable [7]. Cette forme de LC est appelée leishmaniose cutanée diffuse (LCD). Elle conduit à des lésions cutanées chroniques réfractaires à tout traitement, et est provoquée par deux espèces de leishmanies : *L. mexicana* et *L. amazonensis*. Une autre forme de leishmaniose cutanée décrite comme la leishmaniose cutanée disséminée diffère de la LCD et provoque des lésions souvent ulcérées avec une évolution subaigüe et non-chronique. L'évolution vers la forme cutanéomuqueuse est fréquente dans la forme disséminée. La leishmaniose cutanée disséminée est attribuée à des infestations par *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensi* et *L. amazonensis* [2].

1.2.2. La leishmaniose cutanéomuqueuse

La LCM appartient aux leishmanioses du Nouveau Monde. La majorité des cas signalés se trouve en Bolivie, au Brésil et au Pérou. Elle est provoquée principalement par *L. braziliensis* et *L. panamensis*, deux espèces qui se caractérisent par leur propension à causer des métastases au niveau des muqueuses de la cavité buccale et des voies respiratoires supérieures par dissémination lymphatique ou sanguine. Les lésions nasales sont constantes, avec des nodules et une infiltration au niveau de la partie antérieure du cartilage de la cloison nasale, entraînant l'obstruction des narines et ensuite une perforation de la cloison avec affaissement et élargissement du nez. Chez un tiers des patients, d'autres muqueuses sont atteintes, à savoir, par ordre de fréquence, celles du pharynx, du palais, du larynx, de la trachée et de la lèvre supérieure. Au stade final, des mutilations importantes sont observées, avec obstruction et destruction du nez, du pharynx et du larynx. Cette forme de leishmaniose ne guérit presque jamais spontanément. La surinfection bactérienne est fréquente, la pneumonie intercurrente étant la cause de décès la plus courante chez les patients atteints de LCM [2].

1.2.3. La leishmaniose viscérale

La LV est la forme la plus grave de la maladie car létale en l'absence de traitement ou en cas d'échec du traitement.

La LV de l'Ancien Monde peut être endémique, sporadique ou épidémique avec, dans chaque cas, des caractéristiques cliniques différentes. Dans les régions où la LV est endémique, la maladie est plutôt chronique et touche principalement les enfants âgés de 1 à 5 ans. La période d'incubation varie de 10 jours à plus d'un an. Les symptômes habituels sont la fièvre, un malaise général, des tremblements ou des frissons, une perte de poids, de l'anorexie et une gêne au niveau de l'hypochondre gauche. Les signes cliniques consistent ordinairement en une splénomégalie, accompagnée ou non d'hépatomégalie, une fonte musculaire et une décoloration des muqueuses. Une pigmentation brune de la peau du visage, des mains, des pieds et de l'abdomen s'observe couramment en Inde. Dans ce pays, la maladie est plus connue sous le nom de Kala-Azar, qui signifie en hindi « fièvre noire » ou « fièvre mortelle ».

La LV sporadique peut être contractée par des personnes étrangères à une zone d'endémie, quel que soit leur âge. La fièvre débute de façon brutale 3 semaines à 2 ans après l'exposition. Ces patients présentent un risque accru de complications rares telles qu'une anémie hémolytique aigüe sévère, des lésions rénales aigües et des hémorragies au niveau des muqueuses [2].

Dans la LV anthroponosique épidémique (transmissible d'un sujet humain à un autre), les sujets de tout âge sont exposés. Des formes aigües sont possibles et la mortalité est habituellement élevée.

Dans le Nouveau Monde, la LV est endémique ou sporadique. La plupart des cas s'observent chez les enfants de moins de 10 ans.

Sur le continent indien et en Afrique subsaharienne, la LV est essentiellement causée par *L. donovani* et l'Homme constitue le seul réservoir connu du parasite. Dans le bassin méditerranéen et au Proche et Moyen Orient, la LV est causée par *L. infantum*. En Amérique Latine, c'est l'espèce *L. infantum (chagasi)* qui est en cause [8]. Le chien constitue le principal réservoir de ces deux dernières espèces [9-11].

En l'absence de traitement, la LV aboutit généralement à la mort du patient, mais un traitement efficace peut conduire à une guérison. Cependant, 6 mois à une ou plusieurs années après la guérison, des macules peuvent apparaître sur n'importe quelle partie du corps (souvent confondues avec les lésions du vitiligo ou de la lèpre), et peuvent se transformer ultérieurement en infiltrations papulaires ou nodulaires, notamment au niveau du visage. Cette manifestation correspond à la leishmaniose cutanée post kala-azar (PKDL). Elle est présente dans toutes les régions où *L. donovani* est endémique mais c'est en Afrique Orientale et sur le sous-continent indien qu'elle est la plus courante (50% et 10% respectivement des malades atteints de LV font une PKDL) [2] (**Tableau I**).

Tableau I. Tableau récapitulatif des différentes formes de leishmanioses

Leishmanioses		Répartition géographique	Espèces parasitaires	Photos
Leishmanioses cutanées	Leishmaniose cutanée	Ancien Monde	<i>L. infantum</i> <i>L. tropica</i> <i>L. major</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. donovani</i>	 Photo de l'OMS prise par C. Black pour la Journée mondiale de la Santé 2014
	Leishmaniose cutanée localisée	Nouveau Monde	<i>L. mexicana</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. chagasi</i>	 Briend V., (2006). Les leishmanioses cutanées au C.H.U. de Nantes de 1997 à 2006. Thèse de doctorat en médecine générale, 117 p.
	Leishmaniose cutanée diffuse	Nouveau Monde	<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i>	 [En ligne]. (Consulté le 27/01/2015). http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/leishmanioses/site/html/4_2.html
	Leishmaniose cutanée disséminée	Nouveau Monde	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. amazonensis</i>	 [En ligne]. (Consulté le 22/10/2015). http://www.ars.guyane.sante.fr/fileadmin/GUYANE/fichiers/Qualite_et_Performance/Omedit/evenements/Pr_Couppie_Leishmaniose_light.pdf
Leishmaniose cutanéomuqueuse		Nouveau Monde	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>	 [En ligne]. (Consulté le 27/01/2015). http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=leishmaniose+cutanéomuqueuse&lang=4
Leishmaniose viscérale		Ancien Monde	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	 Photo de l'OMS prise par C. Black pour la Journée mondiale de la Santé 2014
		Nouveau Monde	<i>L. Chagasi</i>	

2. Les leishmanies, agents de la leishmaniose

2.1. Les principaux acteurs

2.1.1. Le parasite *Leishmania*

Les leishmanies sont des parasites protozoaires flagellés appartenant à l'ordre des *Kinetoplastidae*, à la famille des *Trypanosomatidae* et au genre *Leishmania* Ross, 1903 [12] (Figure 2, d'après [2]). La classification de *Leishmania* a été initialement basée sur des critères éco-biologiques, tels que les vecteurs, la distribution géographique, le tropisme, les propriétés antigéniques et les manifestations cliniques [13-15]. Tous les membres du genre *Leishmania* Ross, 1903 sont des parasites de mammifères. Les deux sous-genres, *Leishmania* et *Viannia*, sont séparés sur la base de leur localisation dans l'intestin du vecteur. Grâce au développement des outils moléculaires (analyse isoenzymatique), les leishmanies ont pu être divisées, par la suite, en complexes d'espèces basés sur des critères intrinsèques tels que les données immunologiques, biochimiques et génétiques. Aujourd'hui, 30 espèces ont été identifiées et environ 20 sont pathogènes pour l'Homme [16].

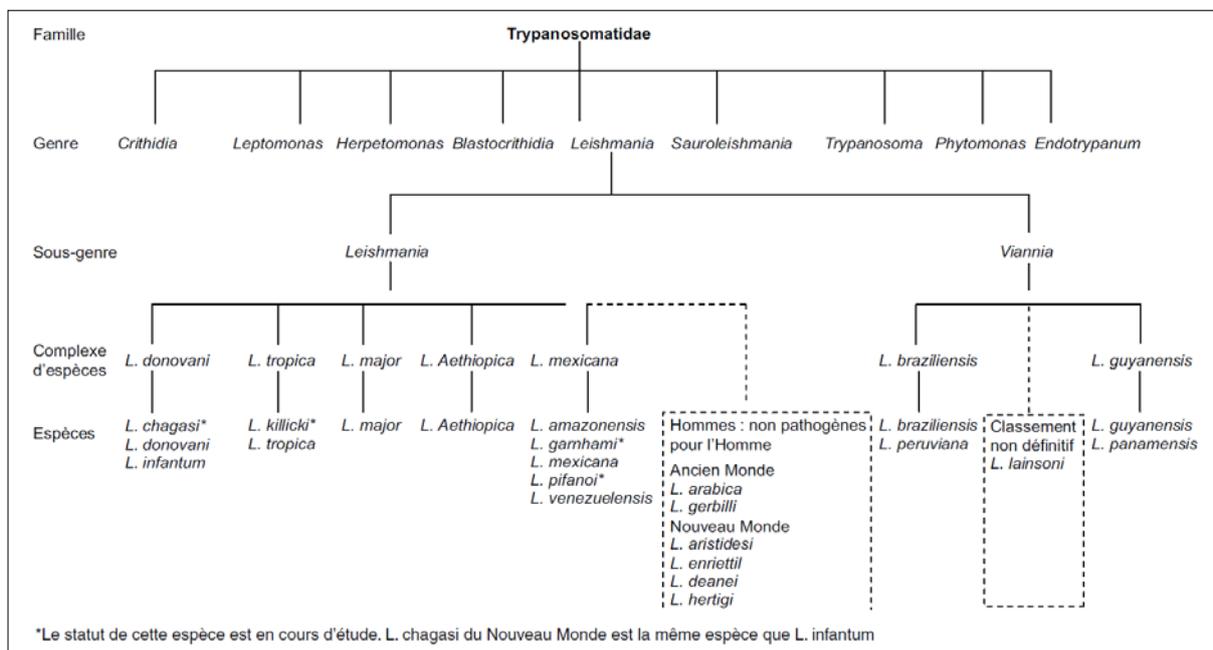


Figure 2. Taxonomie des leishmanies

2.1.2. Le phlébotome, vecteur des leishmanies

Les phlébotomes (Figure 3), aussi appelés « mouches des sables », sont des diptères de petite taille (2 à 5mm), dont seules les femelles sont hématophages. Ils appartiennent à la famille des *Psychodidae* et à la sous-famille des *Phlebotominae*. Les phlébotomes du genre *Phlebotomus*

transmettent les leishmanies de l’Ancien Monde, alors que les phlébotomes du genre *Lutzomyia* transmettent les leishmanies du Nouveau Monde [17] (**Tableau II**).

Tableau II. Les phlébotomes vecteurs des leishmanioses humaines

Ancien Monde : genre <i>Phlebotomus</i>			
Sous-genres	Espèces	Parasites transmis	Foyers endémiques
<i>Phlebotomus</i>	<i>duboscqui</i> <i>papatasi</i>	<i>L. major</i> <i>L. major</i>	Kenya, Senegal Iran, Israël, Jordanie, Maroc, Arabie Saoudite, Tunisie, Russie
<i>Paraphlebotomus</i>	<i>salehi</i> <i>alexandri</i> <i>sergenti</i>	<i>L. major</i> <i>L. infantum</i> <i>L. tropica</i>	Inde (Rajasthan) Chine Maroc, Arabie Saoudite, Russie
<i>Larroussius</i>	<i>ariasi</i> <i>major neglectus</i> <i>perfiliewi</i> <i>pernicius</i> <i>tobbi</i> <i>longipes</i> <i>perdifer</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. infantum</i> <i>L. infantum</i> <i>L. infantum</i> <i>L. infantum</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. aethiopica</i>	France, Espagne Grèce Italie Algérie, France, Italie, Malte, Espagne Chypre Éthiopie Éthiopie, Kenya
<i>Synphlebotomus</i>	<i>martini</i> <i>rossi</i>	<i>L. donovani</i> <i>L. tropica</i>	Kenya Namibie
<i>Adlerius</i>	<i>chinensis</i> <i>longiductus</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. infantum</i>	Chine Russie
<i>Euphlebotomus</i>	<i>argentipes</i>	<i>L. donovani</i>	Inde
Nouveau Monde : genre <i>Lutzomyia</i>			
Sous-genres	Espèces	Parasites transmis	Foyers endémiques
<i>Nyssomyia</i>	<i>anduzei</i> <i>flaviscutellata</i> <i>olmea olmeca</i> <i>trapidoi</i> <i>umbratilis</i> <i>whitmani</i> <i>ylephiletor</i>	<i>L. guyanensis</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>	Brésil Brésil (bassin amazonien), Colombie, Guyane Française Belize, sud du Mexique Colombie, Costa Rica, Panama Nord du Brésil, Colombie, Guyane Française Brésil Brésil Costa Rica, Panama
<i>Psychodopygus</i>	<i>carrerae carrerae</i> <i>llanos martinsi</i> <i>panamensis</i> <i>yucumensis</i> <i>wellcomei</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. braziliensis</i>	Bolivie Bolivie Panama Bolivie Brésil
<i>Verrucarum</i>	<i>spinicrassa</i>	<i>L. braziliensis</i>	Colombie
<i>Lutzomyia</i>	<i>gomezi</i> <i>longipalpis</i>	<i>L. panamensis</i> <i>L. chagasi</i>	Panama Bolivie, Brésil, Colombie



Figure 3. Un phlébotome prenant son repas sanguin sur un sujet humain. Photo de l'OMS prise par S. Stammers pour la Journée Mondiale de la Santé 2014.

Sur 1000 espèces connues de phlébotomes, environ 70 transmettent la leishmaniose. La compétence vectorielle semble être contrôlée, entre autre, par la capacité du parasite à résister aux enzymes protéolytiques sécrétées au cours de la digestion du repas sanguin chez l'insecte [18].

2.1.3. Les réservoirs des leishmanies

Les leishmanioses peuvent s'inscrire dans deux grandes catégories en fonction de l'origine de l'infestation humaine. On distingue les **leishmanioses zoonotiques**, pour lesquelles les hôtes réservoirs sont des animaux sauvages et des animaux commensaux ou domestiques, et les **leishmanioses anthroponotiques**, pour lesquelles le réservoir est uniquement constitué par l'Homme. Pour que la qualité d'hôte réservoir soit reconnue, un état d'équilibre doit s'observer entre l'agent pathogène et les mécanismes de défense de l'organisme qui l'héberge. Un vrai réservoir doit pouvoir permettre la survie du parasite jusqu'à la prochaine saison de transmission, et être infestant pour le vecteur. Par conséquent, identifier les réservoirs de leishmanies nécessite des études écologiques poussées.

De nombreux réservoirs de leishmanies ont ainsi été identifiés. C'est le cas par exemple de la grande gerbille (*Rhombomys opimus*) qui constitue l'hôte réservoir primaire de *L. major* dans les steppes de l'Asie centrale [19] ou encore du paresseux, réservoir de *L. guyanensis* au Brésil et en Guyane française [20].

En 1908 à Tunis, Charles Nicolle et Charles Comte identifient les canidés comme principaux réservoirs du complexe *L. infantum*. Ce complexe est présent de la Chine nord-orientale à la Méditerranée occidentale. *L. chagasi*, son homonyme dans le Nouveau Monde, est présent du Mexique au Nord de l'Argentine (bien que 90% des cas soient retrouvés au Brésil). Du fait de l'étendue géographique de *L. infantum*, il est donc nécessaire de ne pas sous-estimer le rôle de ces animaux dans le cycle de transmission, d'autant plus que 50% des chiens parasités sont des porteurs asymptomatiques [2].

2.2. Cycle biologique

Les leishmanies passent par deux principaux stades de développement caractéristiques de l'hôte dans lequel elles évoluent (**Figure 4 A**, modifié d'après [21]). Lorsqu'elles sont dans le tractus digestif de l'insecte vecteur, elles se trouvent sous la forme de promastigotes (**Figure 4 B**). Cette forme extracellulaire fusiforme est caractérisée par la présence d'un flagelle permettant la mobilité du parasite. Chez l'hôte vertébré, ces formes promastigotes se différencient en amastigotes sphériques de plus petites tailles (**Figure 4 C**), dépourvus de flagelle émergent, et à multiplication intracellulaire obligatoire au sein des cellules du système réticulo-histiocytaire (macrophages, cellules dendritiques ...).

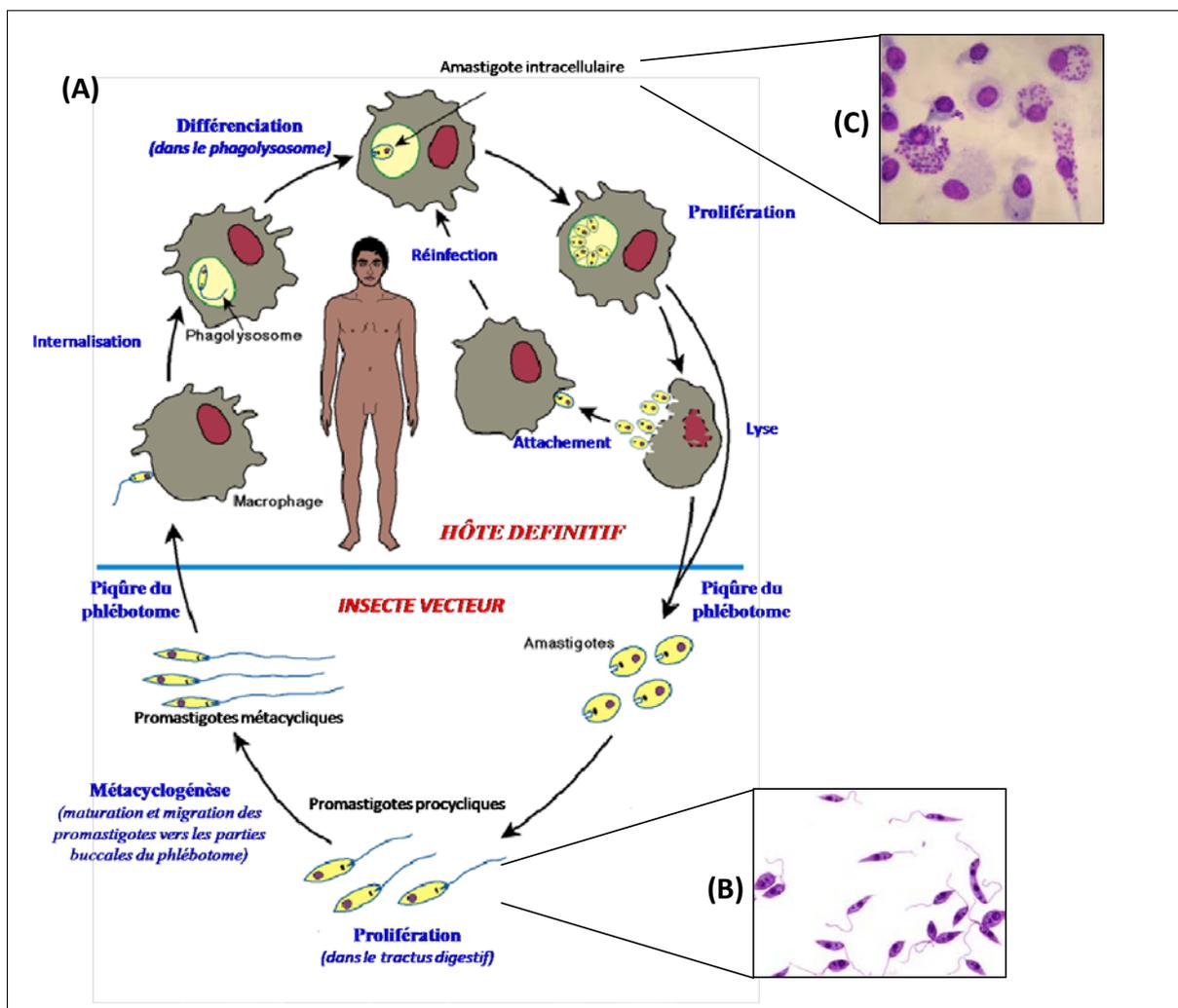


Figure 4. Cycle évolutif des leishmanies. (A) Cycle biologique des leishmanies chez l'hôte définitif et l'insecte vecteur, (B) promastigotes de *L. braziliensis* colorés au Giemsa ([En ligne] (consulté le 06/02/2015). <http://imgarcade.com/1/leishmania-braziliensis-promastigote/>), (C) macrophages humains infectés par des amastigotes de *L. infantum* (photo prise par Bruno Bucheton, IRD de Montpellier)

2.2.1. Chez le vecteur

Lors de son repas sanguin, une femelle phlébotome saine peut ingérer des parasites présents dans le derme de l'hôte vertébré en aspirant des macrophages infectés. Ces macrophages sont ensuite lysés dans le tractus digestif du vecteur. Les amastigotes libérés se transforment alors en promastigotes dits « de division » (**promastigotes procycliques**). Ces derniers, non infectieux, colonisent l'intestin médian où ils vont se multiplier activement. Sous l'influence du pH, qui s'acidifie peu à peu lorsque le parasite remonte le tractus digestif vers les parties buccales, les formes de division vont arriver à maturation et réaliser leur métacyclogénèse, c'est-à-dire devenir infectieuses (**promastigotes métacycliques**). La métacyclogénèse signifie que les parasites se préparent pour survivre dans l'hôte vertébré. Autrement dit, les parasites initient l'expression de molécules leur permettant de résister à un environnement hostile chez l'hôte vertébré. La métacyclogénèse s'accompagne donc de modifications morphologiques mais aussi protéiques, comme l'augmentation de l'expression de la glycoprotéine 63 (gp63), qui confère aux parasites matures la capacité de résister à la lyse par le complément [22]. Des modifications des propriétés biochimiques des molécules de surface du parasite s'observent également. C'est le cas par exemple pour le lipophosphoglycane (LPG), dont les modifications au cours de la métacyclogénèse confèrent une barrière contre la lyse médiée par le complément et facilite également l'attachement des parasites aux macrophages et, par conséquent, leur internalisation dans leur cellule hôte définitive [23].

2.2.2. Chez l'hôte vertébré

Un phlébotome femelle infecté peut injecter, lors de son repas sanguin, entre 10 et 100 parasites dans le derme de l'hôte vertébré [24]. Ces parasites, sous la forme de promastigotes métacycliques, vont infecter des cellules effectrices de l'immunité telles que les macrophages. Les macrophages représentent les cellules hôtes définitives du parasite. Après phagocytose des parasites par le macrophage (formation de la vacuole parasitophore), les promastigotes se différencient en amastigotes et se divisent activement. La multiplication des formes amastigotes aboutit à l'éclatement de la cellule hôte, permettant la colonisation des macrophages avoisinants. Le phénomène adaptatif du parasite au sein des cellules du système réticulo-histiocytaire est remarquable, ce qui distingue la leishmaniose de la plupart des pathologies parasitaires. Une nouvelle piqûre par un phlébotome va provoquer la contamination de ce dernier et permettre au parasite de perpétuer son cycle.

2.3. Les antigènes leishmaniens

2.3.1. Les antigènes de surface

Dans les années 1980, trois antigènes majeurs de surface ont été découverts.

Le **lipophosphoglycane** (LPG) est la principale protéine de surface des formes promastigotes, et n'est pas exprimée chez les formes amastigotes. Le LPG joue non seulement un rôle important dans le cycle biologique des promastigotes (plus particulièrement au cours de la métacytogénèse [25]) mais constitue également un facteur de virulence [26].

La **glycoprotéine 63** (gp63) est la protéase majeure de surface des promastigotes. Il s'agit d'une métalloprotéase qui jouerait également un rôle dans la virulence des deux formes parasitaires. En plus de protéger le promastigote de la lyse médiée par le complément, elle interviendrait également de façon directe dans l'interaction membranaire parasite/macrophage [27].

Les **PSA** (Promastigote Surface Antigen) constituent une des classes majeures de protéines exprimées à la surface des formes promastigotes de *Leishmania* tandis qu'elles restent faiblement exprimées chez les formes amastigotes [28]. Il s'agit d'une famille multigénique de glycoprotéines, ancrées à la surface du parasite par une ancre GPI (Glycosyl-Phosphatidylinositol). Cette famille de PSA est caractérisée par des domaines répétés riches en leucine (LRR), situés dans la partie centrale de la protéine, et constitués d'un nombre variable de motifs, allant de 2 à 25 acides aminés selon les espèces de leishmanies [29]. Les domaines LRR sont principalement connus pour être impliqués dans les interactions protéine-protéine et protéine-glycolipides [30]. De nombreuses protéines contenant des domaines LRR sont ainsi impliquées dans les interactions hôte-pathogène. C'est le cas par exemple des internalines présentes chez *Listeria monocytogenes*, qui sont des protéines de surface jouant un rôle clé dans l'interaction et l'internalisation de ces bactéries au sein de leur cellule hôte [31]. Les PSA possèdent également un domaine riche en cystéines dans leur partie carboxy-terminale, très probablement impliqué dans la structure tridimensionnelle de la protéine.

2.3.2. Les antigènes excrétés-sécrétés

Les antigènes excrétés-sécrétés (AES) possèdent une fonction paracrine, c'est-à-dire qu'ils sont capables d'agir à distance du parasite sur les autres cellules, ce qui leur confère une grande importance dans les mécanismes d'infection et de défense des parasites. Lorsque le cycle de vie des parasites est reproduit *in vitro*, ces antigènes sont retrouvés dans les surnageants de culture, il est donc possible d'en disposer d'une quantité suffisante pour les étudier.

C'est en 2008 que la première analyse protéomique du sécrétome de *Leishmania* a été réalisée en profondeur [32]. Dans cette étude, les auteurs ont considéré qu'au moins 151 protéines étaient sécrétées par *L. donovani*. De manière surprenante, les analyses bioinformatiques ont révélé que seulement deux d'entre elles contenaient un peptide signal de sécrétion dans leur partie N-terminale, ce qui suggère que les leishmanies utiliseraient principalement des mécanismes non classiques pour la sécrétion des protéines (voie de sécrétion indépendante du réticulum endoplasmique et du Golgi). Différents travaux ont été menés afin d'identifier le sécrétome d'autres espèces de leishmanies. C'est le cas par exemple d'une étude protéomique qui a permis d'identifier 42 protéines sécrétées par *L. braziliensis*, et seulement deux de ces protéines ont été prédites pour être sécrétées par la voie classique [33].

L'étude des facteurs de virulence sécrétés par les leishmanies est d'une grande importance. En effet, le sécrétome représente une classe importante de protéines pouvant contrôler une multitude de processus biologiques et physiologiques. Les molécules sécrétées peuvent agir à distance chez l'hôte et pourraient jouer différents rôles (signal, stimulus, médiateur soluble, immunomodulateur...). Elles constituent des cibles privilégiées de la réponse immunitaire puisqu'elles peuvent être rapidement présentées aux lymphocytes T sans lyse préalable des parasites. De plus, elles peuvent participer au dialogue ou conflit moléculaire précoce qui s'instaure entre les leishmanies et leurs cellules hôtes. Les facteurs extracellulaires représentent donc une source d'antigènes intéressante pour le développement de vaccins et de médicaments.

2.3.3. Les interactions antigènes parasitaires – macrophage

Un certain nombre de molécules parasitaires et de molécules de surface du macrophage (cellule du système immunitaire de l'hôte) sont impliquées dans l'interaction entre les leishmanies et le macrophage, initiant ainsi leur phagocytose.

Les premières études ont permis de démontrer que le LPG, présent à la surface des parasites, permettait aux promastigotes de se lier à différents récepteurs de surface des macrophages, tels que le récepteur au mannose-fucose [34-36] ou encore le récepteur 3 du complément (CR3) [34, 37]. Il a également été montré que la gp63 présentait une similitude de structure avec le domaine de liaison Arg-Gly-Asp (RGD) de la fibronectine. Les récepteurs CR3 et de la fibronectine (FnR), qui appartiennent à la famille des intégrines, reconnaissent les peptides portant la séquence RGD, dont la gp63 [38]. Chez *L. infantum*, il a été montré que la PSA-2 était capable de se lier au CR3 du macrophage [39].

En présence de facteurs sériques, les composants du système du complément jouent également un rôle important dans l'adhésion des promastigotes aux macrophages. Les promastigotes métacycliques, formes infectieuses, sont insensibles à l'action lytique du complément. Cependant, l'opsonisation des parasites par les molécules du complément augmente leur interaction avec les macrophages [40, 41]. C'est le cas par exemple des promastigotes de *L. major* qui accumulent à leur surface le composant C3b par liaison avec le LPG [42]. Également, la protéine de surface parasitaire gp63 possède la capacité de cliver la molécule du complément C3b en une forme inactive, iC3b, le ligand naturel du récepteur macrophagique CR1 [43]. L'attachement des promastigotes aux macrophages s'effectue alors par l'intermédiaire des récepteurs macrophagiques CR1 et CR3.

Enfin, d'autres facteurs sériques, tels que les immunoglobulines, interviennent également dans l'attachement des parasites aux macrophages, à travers des récepteurs Fc (FcR) présents à la surface [44, 45]. Il a d'ailleurs été montré que cette voie d'internalisation des amastigotes à l'intérieur des macrophages activait des voies de signalisations permettant de promouvoir la croissance intracellulaire des parasites [46]. Ces mécanismes sont donc à la charnière entre l'attachement des parasites aux cellules cibles et l'échappement au système immunitaire.

3. Réponse immunitaire face à l'infection par *Leishmania*

La majorité des travaux d'immunologie a été réalisée sur le modèle expérimental murin de laboratoire. Ces travaux ont permis d'élucider une partie des mécanismes qui gouvernent la différenciation dichotomique des lymphocytes T CD4+ naïfs en cellules (i) de type Th2 productrices d'interleukine 4 (IL-4), d'IL-10 et d'IL-13, caractéristiques d'une réponse à médiation humorale ou (ii) de type Th1 productrices d'IL-12 et d'interféron γ (IFN- γ), caractéristiques ici d'une réponse à médiation cellulaire.

3.1. Notion de résistance/susceptibilité de l'hôte à l'infection leishmanienne

Au sein des populations vivant en zone d'endémie, il est frappant de constater une grande variabilité interindividuelle de susceptibilité/résistance naturelle de l'hôte à la maladie pour une espèce donnée de parasite.

Les infections asymptomatiques sont habituellement définies par un test sérologique positif, la détection de parasites par PCR (Polymerase Chain Reaction) ou une intradermo-réaction (IDR) à la leishmanine, positive chez des individus en bonne santé [47]. Certaines études prospectives ont

comparé l'incidence des infections asymptomatiques à l'incidence des infections symptomatiques par *L. donovani* et *L. infantum*. Elles ont révélé un ratio de 1 : 2.4 au Soudan [48], 5.6 : 1 en Ethiopie [49], 18 : 1 au Brésil [50], 50 : 1 en Espagne [51] ou encore 8.9 : 1 en Inde et au Népal [52, 53]. Elles démontrent qu'un grand nombre de personnes infectées par *Leishmania* développent une réponse immunitaire efficace et ne manifestent pas de signes cliniques. Ces sujets sont ainsi capables de contrôler voire d'éradiquer l'infection ou de rester porteurs asymptomatiques pendant plusieurs années.

D'autres sujets sont, quant à eux, incapable de contrôler la dissémination et la multiplication des parasites et développent des symptômes cliniques plus ou moins sévères.

La malnutrition, l'immunosuppression (SIDA par exemple, Syndrome d'Immunodéficience Acquise), la grossesse, l'âge, les facteurs génétiques et les capacités immunologiques, sont autant de facteurs de risque associés au développement d'une leishmaniose.

La malnutrition altère la réponse immune et conduit à favoriser la viscéralisation du parasite suite à l'infection par *L. donovani* [54, 55]. Les enfants mal nourris, avec un apport modéré ou faible en protéines énergétiques, ont ainsi 9 fois plus de risque de développer une leishmaniose viscérale [56].

Les leishmanioses, chez les individus infectés par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), sont souvent la conséquence de la réactivation d'une infection latente. La multiplication accélérée des parasites et leur dissémination à de multiples sites de l'organisme proviennent de l'immunosuppression progressive des cellules T [57].

Certaines espèces de leishmanies pathogènes pour l'homme le sont également pour les animaux de laboratoire, comme la souris ou le hamster. La sensibilité aux leishmanies de différentes lignées de souris consanguines est sous contrôle génétique et dépend essentiellement des réponses immunes innée et acquise [58]. Ainsi, les souris C57BL/6 et C3H sont naturellement résistantes à l'infection par diverses espèces de leishmanies et d'autres, telles que les souris BALB/c, sont incapables de contrôler l'infection et développent progressivement la maladie. De ce fait, un certain nombre d'études de gènes candidats associés à la susceptibilité/résistance de l'hôte face à l'infection ont été menées chez la souris. Les études génétiques sur l'immunité innée (gène *Slc11a1* (Solute carrier family 11a member 1) le plus étudié [59, 60]), et l'immunité acquise (gènes codant les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) [61]), se sont avérées importantes. Les plus récentes concernent des analyses de gènes impliqués dans le contrôle des réponses immunes Th1 et Th2.

3.2. Les premières étapes de l'infection

Après la piqûre par le phlébotome, les leishmanies sont confrontées à la réponse immunitaire innée de l'hôte durant les premières phases de l'infection. Ce sont les protéines du complément qui entrent d'abord en jeu. L'activation de ces protéines par la voie classique entraîne la fixation de C3 sur la membrane plasmique des leishmanies et son clivage en C3b. La fixation du C3b au LPG ou à la protéine gp63 du parasite induit la formation du complexe lytique C5b-9 et provoque la destruction du parasite. Cependant, les leishmanies sont capables de résister à la lyse médiée par le complément. La gp63 par exemple favorise la lyse de C3b et sa conversion en molécule inactive C3bi [43].

Les polynucléaires neutrophiles [62] et les cellules NK (Natural Killer) [63, 64] constituent une des premières lignes de défense contre le parasite. En raison de leur courte durée de vie, les polynucléaires neutrophiles sont soupçonnés de servir uniquement de cellules hôtes intermédiaires. En effet, ces cellules pourraient être utilisées par les parasites comme « chevaux de Troie » pour entrer silencieusement dans les macrophages [65]. Les cellules NK sont capables de lyser directement les parasites grâce à leur activité cytotoxique [66]. Ces cellules sont également les premières sources d'IFN- γ qui va permettre de mettre en place une réponse immunitaire plus spécifique contre le parasite, en particulier la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes de type Th1.

Les macrophages sont également recrutés sur le site de l'infection et leur interaction avec les parasites va significativement influencer le devenir de l'infection. Les leishmanies étant des parasites intracellulaires obligatoires, les macrophages sont indispensables à leur survie, leur réplication et leur différenciation. Les macrophages phagocytent les leishmanies extracellulaires mais aussi les polynucléaires neutrophiles infectés en cours d'apoptose. Les macrophages deviennent les cellules hôtes définitives essentielles à la réplication des parasites, mais aussi les cellules effectrices responsables de la destruction des parasites. L'infection des macrophages par les promastigotes induit généralement la production de facteurs chimiotactiques (MIP-1 α , MCP-1) et de cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6) qui amplifient la réaction inflammatoire en attirant et en activant d'autres cellules du système immunitaire. La capacité des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), comme les macrophages et les DC, de produire de l'IL-12 et d'autres cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-1) durant les phases précoces de l'infection représente une étape critique [67, 68]. En effet, l'IL-12 joue un rôle clé dans la génération d'une réponse protectrice spécifique contre l'infection des leishmanies. L'IL-12, produite par les macrophages et les DC, entraîne la différenciation et la prolifération des cellules Th1, mais aussi l'activation des cellules NK qui vont sécréter de l'IFN- γ .

3.3. L'initiation de la réponse immune acquise et la destruction des amastigotes

Après phagocytose des parasites par le macrophage, les promastigotes se différencient en amastigotes à l'intérieur des vacuoles parasitophores. Ces vacuoles contiennent en particulier des protéines lysosomales et leur membrane est associée à plusieurs protéines impliquées dans le processus de dégradation et d'apprêtement des antigènes. Les macrophages et les DC dégradent les antigènes leishmaniens en peptides et les présentent à leur surface sous forme de complexes stables avec les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces complexes sont ensuite présentés aux lymphocytes T, initiant la réponse immunitaire acquise. En effet, les lymphocytes T possèdent à leur surface des récepteurs (TCR, Récepteur des cellules T) qui reconnaissent les complexes peptide antigénique-CMH II. Dans le cas d'une immunité protectrice, les lymphocytes T CD4⁺ se différencient en lymphocytes de type Th1. Les lymphocytes Th1 sécrètent des cytokines habituellement associées à l'inflammation telles que l'IL-2, l'IFN- γ et le GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) qui induisent une réponse immune à médiation cellulaire (induction des activités microbicides des macrophages et activation des lymphocytes T cytotoxiques). D'autres lymphocytes T sont impliqués dans l'induction d'une protection persistante. C'est le cas des lymphocytes T CD8⁺ producteurs d'IFN- γ (qui participent à l'activation classique des macrophages infectés [69]) et des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (qui relarguent des perforines et granzymes capables de lyser ou d'induire l'apoptose de la cellule cible, respectivement [70]).

La production d'IFN- γ par les lymphocytes Th1 induit l'expression de la NO synthase inductible (iNOS) chez les macrophages infectés. L'induction de la iNOS macrophagique dépend à la fois de la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T et les cellules NK, et de la sécrétion autocrine de TNF- α par les macrophages. Une fois activée, cette enzyme dégrade la L-arginine pour aboutir à la synthèse de monoxyde d'azote (NO), molécule cytotoxique agissant contre de nombreux pathogènes intracellulaires dont les leishmanies [71]. Il a été montré que le NO provoquait une mort cellulaire rapide des amastigotes intracellulaires, ceux-ci présentant des caractéristiques morphologiques semblables à celles de l'apoptose [72].

Il est intéressant de noter que les manifestations cliniques chez l'Homme sont une conséquence de l'interaction spécifique entre une espèce donnée de leishmanie et le système immunitaire de l'hôte. Par exemple, diverses réponses cellulaires sont observées entre les différentes formes de leishmaniose cutanée. Une absence de réponse Th1 a été trouvée chez les patients atteints de leishmaniose cutanée diffuse, alors que les personnes atteintes de lésions cutanées guérissant spontanément développent une réponse de type Th1 [73]. Dans le cas d'une leishmaniose viscérale, le profil cytokinique s'oriente vers une mixité Th1/Th2, puisque l'IFN- γ et l'IL-10 sont facilement

détectés chez les patients durant la phase active de la maladie [74]. Un rôle dans la pathogenèse de la LCM a aussi été récemment rapporté pour les cellules Th17 produisant des cytokines telles que l'IL-17, ainsi que pour les polynucléaires neutrophiles dont le recrutement au niveau des sites inflammatoires serait favorisé par l'IL-17. Ces cellules ont été détectées dans les lésions de LCM [75, 76], et de LCL [77, 78].

Concernant l'immunité à médiation humorale, l'infection par *Leishmania* est caractérisée chez l'Homme par l'apparition d'anticorps anti-leishmanies dans le sérum des patients. Dans le cas d'une LC, les anticorps sont présents en petite quantité durant la phase active de la maladie [79]. En revanche, des concentrations élevées d'anticorps sont détectées chez les patients atteints de LV [80]. Cependant, il semble que l'immunité à médiation humorale n'intervienne que peu dans les mécanismes effecteurs de résistance à l'infection. Dans la littérature, le rôle des anticorps au cours d'une leishmaniose expérimentale murine est assez controversé. Certains auteurs montrent que les anticorps anti-leishmanies participent à la progression de la maladie [81], alors que d'autres suggèrent que les anticorps peuvent jouer un rôle dans la génération d'une immunité protectrice [82, 83]. Les chiens naturellement infectés par *Leishmania infantum* produisent des immunoglobulines G. Il a été montré qu'une production d'anticorps d'isotype IgG1 était associée à la progression de la maladie (chiens symptomatiques) alors qu'une production d'IgG2 était associée aux infections asymptomatiques [84].

4. Traitement des leishmanioses

4.1. Traitement de la leishmaniose cutanée

Contrairement à une LC du Nouveau Monde, la plupart des lésions de l'Ancien Monde guérissent spontanément. Néanmoins, l'abstention thérapeutique est rarement admise, et ce, pour plusieurs raisons : les lésions localisées sur des zones non couvertes comme le visage peuvent provoquer une gêne esthétique pour le patient, l'évolution spontanée peut être longue (certaines lésions perdurent pendant des années avant de guérir) et enfin, la lésion peut évoluer en une cicatrice invalidante en l'absence de traitement. Le traitement contre la LC est donc surtout destiné à accélérer la guérison, réduire les cicatrices et prévenir la dissémination vers les muqueuses. Les dérivés de l'antimoine pentavalent, administrés par voie parentérale, constituent le traitement de première intention[2]. Ces dérivés de l'antimoine (antimoniote de méglumine (Glucantime®) ou stibogluconate de sodium (Pentostam®)) sont largement prescrits en dépit de leur toxicité, de leur coût élevé et de la voie d'administration souvent difficile. Dans certains pays, comme en Tunisie, les nombreux effets

indésirables et le rapport bénéfice/risque de ce traitement toxique sont discutés, et la question se pose de savoir si ce traitement doit continuer à être administré en première intention [85]. D'autres options thérapeutiques peuvent être prescrites, telles que des traitements topiques (pommade à la paromomycine [86, 87]), la thermothérapie [88-90] ou encore la cryothérapie [91, 92].

4.2. Traitement de la leishmaniose cutanéomuqueuse

La leishmaniose cutanéomuqueuse est traitée par des dérivés de l'antimoine administrés par voie intramusculaire ou intraveineuse [93]. Cependant, le traitement n'est pas efficace contre toutes les LCM. Lorsque le larynx, les cordes vocales ou la trachée sont atteints, le taux de guérison après traitement par des antimoniés systémiques reste faible, et les rechutes ou les récurrences peuvent être fréquentes. En revanche, si les lésions restent localisées au niveau du nez et de la cavité buccale, le taux de guérison est élevé. L'issue du traitement dépend donc de la localisation des lésions.

4.3. Traitement de la leishmaniose viscérale

Depuis plus de 70 ans, les dérivés de l'antimoine pentavalent constituent, malgré leur toxicité, les médicaments de première intention pour le traitement de la leishmaniose viscérale. Cependant, de nombreux cas de résistance ont vu le jour. En Inde par exemple, et plus particulièrement dans l'état du Bihar, environ 60% des personnes atteintes de LV ne répondent plus au traitement par le stibogluconate de sodium (Pentostam®) [94]. Le désoxycholate d'amphotéricine B et la pentamidine ont ensuite été utilisés en deuxième intention. Au cours des 10 dernières années, les formes galéniques lipidiques de l'amphotéricine B, la miltéfosine et la paromomycine ont été homologuées pour le traitement de la LV. Malheureusement, des cas de résistance ont aussi été rapportés avec la pentamidine, la miltéfosine [95, 96] mais aussi la paromomycine [97].

La monothérapie aboutissant bien souvent à l'émergence de phénomènes de résistance, des combinaisons de traitements sont de plus en plus étudiées. C'est le cas par exemple de l'association de l'amphotéricine B liposomale (AmBisome®, administré par voie intraveineuse) avec de la miltéfosine (administré *per os*) qui s'est révélée efficace en Inde où, sur les 127 patients inclus dans l'étude et traités avec cette association médicamenteuse, 124 ont été guéris [98]. Cependant, cette stratégie exige toujours des administrations longues des médicaments, et le coût ainsi que les effets toxiques demeurent des obstacles majeurs.

Le traitement idéal contre la LV, encore inexistant, devrait guérir le patient, réduire le risque de développer une PKDL et limiter la transmission de parasites résistants.

5. Vaccination

5.1. Les vaccins de première et seconde génération

Il a été observé que la plupart des individus ayant déjà contracté l'une des formes de leishmanioses au cours de leur vie deviennent résistants à une infection ultérieure, ce qui laisse penser que la mise au point d'un vaccin est possible [99]. La vaccination a été initiée au début du 20^{ème} siècle avec l'inoculation de parasites vivants virulents. Cette pratique a été appelée « leishmanisation ». Des exsudats de lésions actives étaient inoculés à des enfants en bonne santé, sur une partie couverte du corps, dans le but d'induire une lésion auto-cicatrisante et une protection contre l'apparition de lésions multiples sur le visage ou sur les parties exposées du corps [100]. La leishmanisation a ainsi été pratiquée dans plusieurs pays (Iran, URSS ...) pendant plus de 60 ans [101-103]. Cette pratique a ensuite été abandonnée en raison du risque d'apparition de lésions graves et du fait qu'un organisme vivant et virulent soit introduit chez l'Homme [104]. Plus tard, divers antigènes leishmaniens ont été explorés en tant que candidats vaccins. Ces antigènes incluent des parasites tués ou atténués (vaccins de première génération), des protéines recombinantes de leishmanies, des ADN ou encore des peptides synthétiques (vaccins de seconde génération). Malgré les avancés de la recherche, il n'existe pas encore de vaccin contre la leishmaniose humaine mais de nombreuses préparations vaccinales sont à l'étude dans le monde (**Tableau III**). Les principaux défis pour le développement d'un vaccin sont la complexité associée à l'antigénicité, la variabilité des réponses immunitaires induites chez l'hôte, la variabilité présente dans les différentes espèces de *Leishmania*, mais aussi les coûts associés au développement du produit [105].

En considérant la réglementation qui concerne les vaccins à visée humaine et les critères de commercialisation, l'utilisation de vaccins de première génération ne représente pas une solution durable pour un usage à grande échelle [3]. C'est pourquoi les recherches se sont désormais focalisées sur les protéines leishmaniennes. Diverses protéines excrétées-sécrétées par les leishmanies ont été identifiées et étudiées pour leur potentiel immunogène. Ces protéines jouent un rôle important dans la virulence du parasite en raison de leur participation active dans l'infection et l'inhibition de la réponse immune de l'hôte. Ces protéines étant importantes dans la pathogénèse de la leishmaniose, nous pouvons penser qu'elles puissent induire une immunité durable contre la maladie.

Tableau III. Quelques exemples de vaccins de première et seconde génération.

Vaccins de 1^{ère} génération : parasites entiers tués ou atténués, extraits antigéniques bruts			
Composition vaccin	Cible	Zone géographique	Etat d'avancement
Leishvacin® : 5 espèces parasitaires tuées	Leishmanioses cutanée et cutanéomuqueuse humaines	Brésil	Pas de protection durable [106]
<i>L. amazonensis</i> atténué	Leishmanioses cutanée et cutanéomuqueuse humaines	Colombie	Pas de protection durable [107]
3 espèces locales tuées + BCG	Leishmaniose cutanée humaine	Équateur	Pas de protection durable [108]
<i>L. major</i> tué + BCG	Leishmaniose cutanée humaine	Iran	Pas protection durable [109]
Canileish® : AES de <i>L. infantum</i> + QA-21	Leishmaniose viscérale canine	Europe	Protection durable [110, 111], commercialisation en 2011
Vaccins de 2^{nde} génération : protéines parasitaires purifiées (protéines recombinantes ou natives)			
Composition vaccin	Cible	Zone géographique	Etat d'avancement
Leishmune® : Fucose-mannose-ligand de <i>L. donovani</i> + saponines	Leishmaniose viscérale canine	Brésil	Commercialisation en 2011 [112]
Leish-111f : protéine recombinante de fusion (3 protéines de <i>L. major</i>)	Leishmanioses humaines	Colombie (Phase I), Inde (Phase I), Brésil (Phase II)	Résultats non publiés (https://clinicaltrials.gov)
Leish-Tec® : protéine recombinante A2	Leishmaniose viscérale canine	Brésil	Commercialisation en 2007 [113]

Des antigènes définis, délivrés sous forme d'ADN plasmidique, d'ADN vectoriel ou de protéine recombinante en présence d'adjuvant, se sont souvent avérés efficaces sur des modèles animaux. De nombreux animaux constituent des réservoirs de leishmanies, permettant de perpétuer le cycle de transmission des parasites. Le chien en est un exemple puisqu'il est le principal hôte réservoir naturel à *Leishmania infantum/chagasi*. Il a d'ailleurs été montré que les chiens porteurs de leishmanies étaient impliqués dans la transmission de la leishmaniose viscérale à l'homme [9]. La vaccination humaine mais aussi animale est donc une nécessité pour interrompre la transmission de la leishmaniose et contribuer à son élimination. Bien que les vaccins protéiques aient évolué en produits à usage vétérinaire, seules les protéines recombinantes peuvent atteindre le stade de l'homologation en ce qui concerne la vaccination humaine [3]. Un autre type de vaccin est aujourd'hui à l'étude, le vaccin peptidique.

5.2. Le vaccin peptidique

L'utilisation de peptides dans la conception de vaccins de seconde génération est de plus en plus étudiée. Cette approche permet de sélectionner de manière précise les composants d'un candidat vaccin, en distinguant de courts épitopes peptidiques représentant la ou les régions immunogènes majeures d'un antigène, et permet une orientation précise de la réponse immunitaire [114].

5.2.1. Les avantages du vaccin peptidique

En comparaison avec les vaccins conventionnels, les peptides synthétiques présentent plusieurs avantages, en particulier en termes de sécurité et de facilité d'utilisation [114] :

- L'absence de matériel infectieux, donc aucun risque de réversion pouvant conduire à la virulence (possible avec des vaccins utilisant des pathogènes vivants atténués) ;
- La possibilité d'exclure des séquences délétères à partir de la séquence entière de l'antigène (séquences oncogènes ou impliquées dans des maladies auto-immunes) ;
- Des groupements lipidiques, carbohydrates et phosphates peuvent être aisément ajoutés afin d'améliorer l'immunogénicité, la stabilité et la solubilité ;
- Les peptides peuvent être facilement caractérisés et purifiés par des techniques analytiques bien établies (chromatographie en phase liquide, spectrométrie de masse) ;
- Sur le plan économique, la production de ces peptides peut être assurée à grande échelle ;
- Les préparations peptidiques peuvent être lyophilisées et conservées à température ambiante facilitant leur stockage, transport et distribution ;
- Aucun risque d'intégration ou de recombinaison génétique, problème souvent rencontré avec les vaccins à ADN ;
- Les vaccins peptidiques peuvent être conçus de manière à inclure de multiples déterminants antigéniques provenant du même pathogène ou de plusieurs pathogènes.

Toutefois, les nombreux avantages sont contrebalancés par quelques inconvénients : la faible immunogénicité des peptides simples et la nécessité de stimuler de manière puissante les cellules T et de susciter une mémoire immunologique. Ces inconvénients peuvent être néanmoins surmontés par l'utilisation d'adjuvants, l'ajout de composés lipopeptidiques ou la présentation directe aux cellules dendritiques [114].

5.2.2. Présentation des peptides au système immunitaire

Dans l'immunité, les lymphocytes T détectent des peptides étrangers présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui sont exprimées à la surface des cellules présentatrice d'antigène (CPA) de l'hôte. Les lymphocytes T helpers (Th ou CD4+) reconnaissent les molécules du CMH de classe II complexées à des peptides issus de protéines exogènes. Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL ou CD8+) reconnaissent les molécules du CMH de classe I complexées à des peptides issus de protéines intracellulaires. Ainsi, toutes les cellules nucléées présentent, à leur surface, des peptides dérivés de protéines intracellulaires liés au CMH I, alors que les peptides issus des protéines exogènes sont principalement présentés par les molécules du CMH II à la surface des CPA dites « professionnelles » telles que les cellules dendritiques ou les macrophages. Une présentation croisée est également possible. Elle permet aux antigènes extracellulaires d'être présentés aux lymphocytes T CD8+ restreints aux molécules du CMH de classe I, et aux antigènes cytosoliques d'être présentés aux lymphocytes T CD4+ dans le contexte du CMH de classe II.

Les gènes du CMH codent pour une famille d'antigènes cellulaires qui aide le système immunitaire à reconnaître le soi du non-soi. Pour être présentés aux cellules immunitaires, les peptides doivent être complexés aux molécules du CMH de classe I ou de classe II. Les molécules du CMH (ou HLA pour l'homme, Human Leucocyte Antigen) sont très polymorphes, et ce polymorphisme concerne principalement les résidus situés dans le sillon où se fixe le peptide, donnant à chaque variant allélique un motif de liaison distinct [115]. La variation naturelle dans les gènes HLA doit donc être prise en compte pour la conception d'un vaccin peptidique. En dépit de cet important polymorphisme, les molécules du CMH de classes I et II peuvent être rassemblées en groupes, appelés « supertypes ». Ces supertypes représentent des ensembles de molécules qui partagent des spécificités de liaison peptidique. Ce rassemblement en supertypes permet ainsi une réduction significative du nombre d'épitopes requis pour offrir une bonne couverture vaccinale contre un pathogène donné.

5.2.3. Objectifs du vaccin peptidique contre la leishmaniose humaine

Un vaccin peptidique contre la leishmaniose serait donc composé d'un mélange d'épitopes antigéniques dérivés de protéines leishmaniennes relativement bien conservées entre les espèces. Dans le but d'induire une réponse immunitaire suffisante, le vaccin peptidique devra contenir des épitopes affins pour les molécules HLA de classe I (épitopes qui pourront induire des réponses CTL) et de classe II (épitopes Th) et un ou plusieurs épitopes lymphocytaires B spécifiques.

Introduction au mémoire

1. Développement d'un vaccin canin de première génération

Après de nombreuses années de recherches académiques et précliniques, et de développement industriel (partenariat public/privé), le premier vaccin contre la leishmaniose viscérale canine, CaniLeish[®], a pu être mis au point par notre équipe et commercialisé en Europe depuis 2011.

Dans un premier temps, la conception du vaccin a nécessité la mise au point d'un milieu de culture asérique complètement défini [116]. Ce milieu nous a permis de disposer d'une quantité relativement importante de facteurs naturellement excrétés-sécrétés par les leishmanies, dépourvus de tout contaminant protéique extérieur. CaniLeish[®] est ainsi composé d'un extrait d'antigènes excrétés-sécrétés par les promastigotes de *L. infantum* (LiESAp) formulé avec un adjuvant, le QA-21 [110].

Les essais cliniques réalisés ces dernières années ont permis de démontrer qu'une immunisation avec des protéines natives excrétées-sécrétées par *L. infantum* était capable de conférer, chez le chien, une réponse immune cellulaire de type Th1 protectrice contre une infection expérimentale à *L. infantum* [110] mais aussi chez des chiens naturellement exposés [111]. De plus, cette immunisation induisait une réponse humorale par la production d'IgG2 majoritairement [117]. En étudiant la fonction de ces anticorps induits par la vaccination (LiESAp couplé à l'adjuvant MDP, Muramyl dipeptide), il a été montré que ces IgG2 avaient un effet leishmanicide sur les parasites (promastigotes et amastigotes) et réduisaient l'infectiosité *in vitro* des amastigotes pré-incubés avec les sérums des chiens vaccinés vis-à-vis des macrophages canins [118].

L'injection du vaccin CaniLeish[®] génère non seulement une réponse immunitaire protectrice chez le chien, mais cette réponse reste encore efficace un an après l'administration du vaccin [119, 120]. L'existence d'un vaccin à usage vétérinaire, dirigé contre un hôte réservoir du parasite, pourrait diminuer indirectement les risques de transmission de la maladie à l'homme, en empêchant la continuité du cycle réservoir-phlébotome-homme.

La production de CaniLeish[®] nécessite la mise en œuvre de cultures massives de parasites pour en extraire les AES. Or, ce procédé n'est pas adapté à une vaccination à grande échelle. L'utilisation de ce vaccin ne peut donc être envisagée pour une vaccination à visée humaine. De ce fait, nos recherches se sont donc orientées vers le développement d'un vaccin de seconde génération, composé de la plus petite fraction des AES capable de reproduire les effets protecteurs induit par le vaccin canin CaniLeish[®].

2. Identification de l'immunogène majeur des AES

Des études menées par la suite au laboratoire ont montré que les sérums des chiens vaccinés avec les AES de *L. infantum* reconnaissent principalement un antigène immunodominant d'un poids moléculaire de 54 kDa. De plus, ces mêmes sérums étaient capables de reconnaître, parmi les AES de *L. amazonensis*, un antigène immunodominant d'un poids moléculaire de 45 kDa. Afin d'identifier et de caractériser ces antigènes immunodominants, un anticorps monoclonal de souris (F5) a été produit par immunisation avec des AES de promastigotes de *L. amazonensis*. Cet anticorps F5 est capable de reconnaître les cibles antigéniques provenant à la fois des AES des promastigotes de *L. amazonensis* et de *L. infantum*. Cet anticorps F5 a été utilisé pour cribler une banque d'expression d'ADN complémentaire (ADNc) des formes promastigotes et amastigotes de *L. amazonensis*. Un des clones identifiés codait pour une nouvelle protéine excrétée-sécrétée par *L. amazonensis* d'un poids moléculaire théorique de 38.6 kDa (protéine *LaPSA-38S*), présentant une homologie de séquence significative avec les protéines de la famille des PSA (Promastigote Surface Antigen). Un criblage d'une banque cosmétique de promastigotes de *L. infantum*, réalisé en utilisant comme sonde radiomarquée l'ADN codant la protéine *LaPSA-38S*, a permis d'identifier un nouveau gène, *LiPSA-50S* (GenBank FJ974055), codant une protéine excrétée-sécrétée de *L. infantum* appartenant également à la famille des PSA, d'un poids moléculaire théorique de 49.2 kDa (*LiPSA-50S*) [121].

Les PSA sont des protéines membranaires ou sécrétées de *Leishmania*. Il s'agit d'une famille multigénique de glycoprotéines, ancrées à la surface du parasite par une ancre GPI (Glycosyl-Phosphatidyl Inositol), ou sécrétées dans le milieu extracellulaire par la présence d'un peptide signal de sécrétion. Cette famille de PSA est caractérisée par des domaines répétés riches en leucine (LRR, Leucin Rich Repeat), situés dans la partie centrale de la protéine, et constitués d'un nombre variable de motifs de 24 à 25 acides-aminés (de 3 à 15 répétitions selon la PSA et l'espèce de leishmanie) [29]. Ces LRR ont un motif structural particulier, ce qui les implique dans les interactions protéine-protéine lors de transductions de signaux, d'adhésion, ou encore lors d'interactions protéines-acides nucléiques [30, 122]. Les PSA possèdent également un domaine riche en cystéine dans leur partie carboxy-terminale, très probablement impliqué dans la structure tridimensionnelle de la protéine [29].

La PSA est présente à la fois chez les formes promastigotes et amastigotes [28, 123], et est fortement exprimée chez les promastigotes métacycliques [123]. Il a été montré que la PSA est impliquée dans l'attachement du parasite et l'invasion des macrophages [39]. De plus, elle joue un rôle important dans la résistance contre la lyse médiée par le complément [124]. Toutes ces caractéristiques suggèrent ainsi que la PSA constituerait un facteur de virulence majeur.

En 1995, la PSA-2 native de *L. major* a été utilisée dans des essais de vaccination chez la souris. Les tests ont montré qu'elle conférait un bon niveau de protection, contrairement à la PSA-2 recombinante produite chez *Escherichia coli*. Ces résultats ont permis de conclure que cette protéine, sous sa forme native, possédait des propriétés immunologiques remarquables [125].

3. Production de la protéine recombinante

La PSA recombinante native de *L. amazonensis* a été produite au laboratoire grâce à un système d'expression de gènes utilisant *Leishmania tarentolae*, commercialisé par la société Jena Bioscience (« *Leishmania tarentolae* Gene Expression Starter kit »). Ce système d'expression de protéines recombinantes présente plusieurs avantages : (i) il utilise comme vecteur d'expression *L. tarentolae*, un parasite qui n'infecte que les lézards et est, par conséquent, non pathogène pour l'homme ; (ii) il permet l'intégration du gène d'expression dans le locus 18S ARNr du chromosome qui possède un taux de transcription très élevé, et permet ainsi l'obtention d'une quantité abondante de PSA recombinante ; (iii) il conserve et reproduit l'ensemble des processus de maturation des protéines de leishmanies (dont les modifications post-traductionnelles), ce qui permet l'obtention d'une PSA recombinante de conformation identique à celle de la PSA naturellement excrétée-sécrétée par le parasite.

Avant le clonage directionnel du gène codant la protéine LaPSA-38S (gène *LaPSA-38S*, GenBank FJ974054) dans le vecteur d'expression pF4X1.4sat, le site d'ancrage GPI a été remplacé par une étiquette (*tag*) histidine par mutagenèse dirigée. Cette mutation permet ainsi de retrouver la PSA recombinante native uniquement dans les surnageants de culture et non à la surface des parasites, et de purifier cette protéine sur colonne HisTrap FF (Amersham Biosciences) (**Figure 5**).

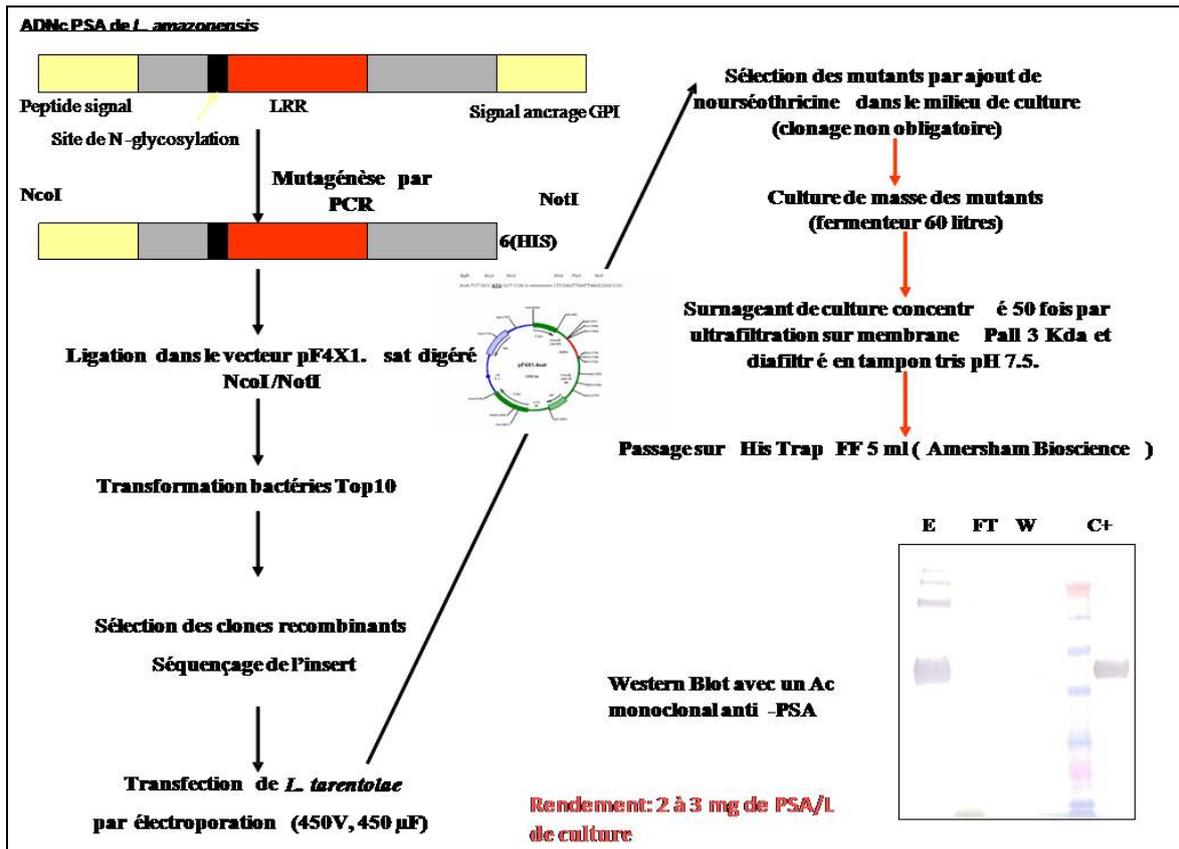


Figure 5. Schéma de production de la PSA recombinante native de *L. amazonensis* (LaPSA-38S) chez *L. tarentolae*

Le parasite *L. tarentolae* surexprimant la protéine LaPSA-38S excrétée-sécrétée, a été confié à notre partenaire industriel VIRBAC. La production à l'échelle industrielle, dans les bonnes pratiques de fabrication, nous garantit l'obtention d'une grande quantité de protéines natives purifiées et de qualité.

4. Conception d'un parasite surexprimant LiPSA-50S

Le gène *LiPSA-50S* a été cloné en position sens (permettant la surexpression de la protéine *LiPSA-50S*) dans le vecteur d'expression pTEX [126], puis transfecté par électroporation chez la forme promastigote de *L. infantum*. Les parasites transformés ont ensuite été sélectionnés sous pression antibiotique par addition de généticine (le vecteur d'expression pTEX contenant le gène de résistance à cet antibiotique). Enfin, les parasites transformés ont été clonés par la technique de micromanipulation. Un certain nombre de clones ont été caractérisés et comparés au niveau moléculaire (niveau d'expression des transcrits, niveau de production de la protéine *LiPSA-50S*).

5. Objectif de l'étude

Les données de la littérature semblent montrer que les PSA sont essentielles au développement des leishmanies et nous ont amené à nous poser les questions suivantes : (i) les PSA ont-elles un rôle de facteur de virulence et/ou de pathogénicité ? (ii) ont-elles des propriétés immunologiques remarquables ? et (iii) ont-elles un potentiel vaccinal pour une immunoprophylaxie contre les leishmanioses ?

Le but de ce travail est donc, dans un premier temps, d'étudier le rôle biologique fonctionnel de cette protéine d'intérêt. L'accès à un outil biologique tel que des promastigotes de *L. infantum* surexprimant *LiPSA-50S*, permet d'étudier la répercussion de ces changements génétiques sur le pouvoir infectieux des parasites (i) *in vitro*, vis-à-vis de macrophages péritonéaux murins et (ii) *in vivo*, dans un modèle d'infection expérimentale chez la souris.

La production et la purification de la protéine recombinante *LaPSA-38S* sous sa forme native permet d'envisager l'étude de son potentiel vaccinal comme vaccin de seconde génération. Un essai de vaccination chez le chien permettra de déterminer si cette protéine recombinante native purifiée est capable de reproduire les effets protecteurs induits par le vaccin canin CaniLeish® ?

Prenant en considération les avantages d'un vaccin peptidique énoncés dans le chapitre Synthèse bibliographique-section 5.3.1, les plus petites parties à fort potentiel immunologique de la protéine *LaPSA-38S* ont été identifiées. Des peptides ont ainsi été sélectionnés au sein de la séquence protéique de la protéine *LaPSA-12S* (protéine correspondant à la partie carboxy-terminale de *LaPSA-38S*). Leur capacité à induire une réponse immune efficace et une protection des chiens vaccinés à l'encontre d'une infection expérimentale à *Leishmania infantum* sera évaluée.

Matériel et méthodes

1. Étude du rôle biologique de la protéine *LiPSA-50S*

1.1. Culture *in vitro* des formes promastigotes de leishmanies

Dans cette étude, trois souches parasitaires sont utilisées :

- Une souche de *Leishmania infantum* sauvage, portant la référence OMS suivante : MHOM/MA/67/ITMAP-263, clone 2, zymodème MON-1. Pour faciliter la rédaction et la lecture, elle sera nommée ***Ldi WT*** ;
- La souche *Ldi WT* transfectée par électroporation avec le plasmide vide pTEX [126], qui sera nommée ici ***Ldi pTEX*** ;
- La souche *Ldi WT* transfectée par électroporation avec le plasmide pTEX contenant le gène *LiPSA-50S* en position sens, elle sera nommée ici ***Ldi SENS***.

Les formes promastigotes de *Ldi WT* sont cultivées en milieu synthétique complet et en condition sérique : le milieu RPMI 1640 supplémenté de 2mM de L-Glutamine, 100 UI/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 5% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes. Les parasites sont ensuite incubés à 26°C pendant 6 à 7 jours. Les cultures sont repiquées à raison de 10⁶ parasites par mL, dans des boîtes de culture (TPP®) non ventilées.

Les formes promastigotes de *Ldi pTEX* et *Ldi SENS* sont cultivées dans le même milieu de culture synthétique complet que la souche sauvage. L'ajout de l'antibiotique G418 (Généticine®), à une concentration de 50 µg/mL, est indispensable pour la sélection des mutants puisqu'ils ont acquis la résistance à cet antibiotique apportée par la présence du vecteur plasmidique.

1.2. Vérification des souches de *Leishmania*

1.2.1. Quantification de l'expression du gène *LiPSA-50S* par RT-qPCR

Les formes promastigotes des différentes souches sont récoltées en phase stationnaire de croissance (7 jours), culotées par centrifugation à 3000g pendant 10 minutes puis conservées à -20°C dans une solution de conservation des ARN (RNA protect Cell Reagent, Qiagen). Trois culots de 3.10⁷ parasites sont ainsi réalisés pour chaque souche. Les ARN totaux de ces culots parasitaires sont ensuite extraits à l'aide du kit « Nucleospin RNA XS » (Machery Nagel) suivant les instructions du fournisseur. L'ARN est quantifié au Nanodrop™ à 260nm et 1,5 µg sont rétrotranscrits en ADNc à l'aide du kit « Superscript Vilo cDNA synthesis » (Invitrogen), suivant les instructions du fournisseur. La

rétrotranscription est réalisée en trois exemplaires (triplicats). Chaque échantillon d'ADNc est dilué à une concentration finale de 50 ng/μL.

Une PCR quantitative est réalisée pour analyser le niveau d'expression du gène au sein des différentes souches parasitaires étudiées, en utilisant des amorces conçues pour amplifier spécifiquement le gène *LiPSA-50S* (**Annexe 1**).

La différence du taux d'expression par rapport à la souche *Ldi* WT est basée sur la méthodologie $2^{\Delta\Delta Ct}$ (différence des valeurs de Ct) [127]. L'efficacité de la PCR est réalisée sur un mélange des différents ADNc utilisés (concentration initiale de 5 ng/μL et dilutions en série de 10 en 10) afin d'obtenir une courbe étalon correspondant au couple d'amorces utilisées. Le graphique Ct = f(log concentration ADNc) est réalisé et la valeur de la pente est calculée. L'efficacité de chaque couple d'amorces est alors calculée comme suit : $E = 10^{(-1/pente)}$. Si E = 2, alors l'efficacité de la PCR est de 100%.

Le ratio représentatif du différentiel d'expression est ensuite calculé selon la formule :

$$(E_{\text{gène d'intérêt}})^{\Delta(\text{Ct Témoin} - \text{Ct échantillon}) \text{ du gène d'intérêt}} / (E_{\text{gène de référence}})^{\Delta(\text{Ct Témoin} - \text{Ct échantillon}) \text{ du gène de référence}}$$

Le gène d'intérêt correspond au gène codant la protéine *LiPSA-50S*, le gène de référence est le gène codant la GAPDH, le témoin est l'ADNc de la souche *Ldi* WT et l'échantillon correspond à l'ADNc de la souche *Ldi* pTEX ou *Ldi* SENS.

L'analyse statistique est réalisée avec le logiciel GraphPad Prism®. Une comparaison de la moyenne de l'expression relative est effectuée par un test non paramétrique (Mann-Whitney-Wilcoxon) au risque alpha de 5%.

1.2.2. Détection de la protéine *LiPSA-50S* dans les surnageants de culture parasitaire

1.2.2.1 Culture *in vitro* des différentes souches parasitaires

Les formes promastigotes de *Ldi* WT sont cultivées en milieu synthétique complet dans des conditions asériques et axéniques. Pour cela, nous utilisons le milieu RPMI 199H, permettant l'obtention d'AES totalement dépourvus de contaminants sériques et cellulaires [116] (Brevet n° WO9426899, [128]). Ce milieu est composé du milieu RPMI 1640 concentré 1,1 fois, supplémenté de 10% de milieu 199 (Sigma-Aldrich), 1‰ de solution d'hémine (hémine à 0,5% en NaOH 1N), 2 mM de L-Glutamine, 100 UI/mL de pénicilline et 100μg/mL de streptomycine. Les parasites sont ensuite incubés à 26°C pendant 6 à 7 jours. Les cultures sont repiquées à raison de 10^6 parasites par mL, dans des boîtes de culture (TPP®) non ventilées.

Les formes promastigotes de *Ldi* pTEX et *Ldi* SENS sont cultivées dans le même milieu de culture synthétique complet que la souche sauvage. L'ajout de l'antibiotique G418 (Généticine®), à une concentration de 50 µg/mL, est indispensable pour la sélection des mutants.

1.2.2.2 Récolte et préparation des AES

Un volume de 100 mL de chaque culture parasitaire est centrifugé à 2000g pendant 10 minutes afin de récupérer les surnageants métabolisés par les parasites. Les surnageants de culture sont filtrés sur une membrane d'acétate de cellulose de 0,22 µm afin d'éliminer les éventuels parasites encore en suspension après centrifugation. Ils sont ensuite congelés avant d'être lyophilisés. Les lyophilisats sont repris dans 10 mL d'eau milliQ, et dialysés pendant 48h à 4°C (membrane de dialyse Spectra/Por®, seuil de rétention 3,5-5 kDa, Spectrum Laboratories). Les surnageants dialysés sont transférés dans des tubes de 50 mL, congelés et à nouveau lyophilisés. Les surnageants lyophilisés sont ensuite repris dans 500 µL d'eau milliQ. Les préparations d'AES sont donc concentrées 200 fois.

Le dosage des protéines est réalisé à 595nm selon la méthode de Bradford [129] en utilisant le réactif Biorad (Biorad Protein Assay Kit). Une gamme étalon de 5 à 20 µg/mL est préparée à partir d'une solution standard d'albumine bovine (BSA 1 mg/mL, Sigma-Aldrich).

1.2.2.3 Gel SDS-PAGE et Western Blot

Dans un premier temps, les échantillons sont mélangés à du tampon de charge 2X (Tris-HCl pH 6,8 0,5 M, Glycérol 0,05%, SDS 20%, bleu de bromophénol 0,5%). De la même façon, une gamme étalon de *La*PSA-38S est réalisée (6 points allant de 20 à 0,625 ng de protéine par piste (dilutions ½)). 500 ng de protéines issues des surnageants de culture concentrés 200 fois sont ensuite séparés selon leur poids moléculaire (utilisation du marqueur de poids moléculaire PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fisher Scientific) par SDS-PAGE selon Laemmli (Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

Une fois séparées, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Hybond ECL, GE Healthcare), en condition semi-sèche pendant 1h30 à 100 V (24 mA). La membrane est ensuite saturée une heure dans une solution bloquante TBS-lait 3% puis incubée une nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire (sérum de lapin immunisé avec *La*PSA-38S, dilué au 1/500 dans du TBS-lait 3%). Après 3 lavages dans du TBS-0,1% Tween 20, les anticorps fixés sont détectés par des anticorps secondaires anti-immunoglobulines de lapin couplés à la peroxydase (BD Pharmingen), dilués au 1/5000 dans du TBS-lait 3%. La membrane est incubée avec l'anticorps secondaire pendant 1 heure sous agitation lente et à température ambiante. Après 3 lavages successifs dans du TBS-0,1% Tween

20, les anticorps fixés sont révélés par chimioluminescence avec le réactif ECL+ (Pierce™ ECL 2 Western Blotting Substrate, Thermo Scientific) à 457 nm.

L'image est ensuite analysée avec le logiciel Image Quant™ (version 5.2). Ce logiciel permet de quantifier l'intensité des bandes, par détermination du nombre de pixels pour chaque bande. La purification de la protéine *LiPSA-50S* n'étant pas encore aboutie, la gamme étalon a été réalisée avec la protéine purifiée *LaPSA-38S*. Il a été montré que le sérum provenant d'un lapin immunisé avec les AES de *L. amazonensis* détectait de la même façon la protéine *LaPSA-38S* que la protéine *LiPSA-50S* [121]. La comparaison de l'intensité des bandes de nos échantillons avec l'intensité des bandes de la gamme étalon est donc possible, permettant ainsi la déduction de la quantité de protéine *LiPSA-50S* (équivalent *LaPSA-38S*) présente dans nos échantillons.

1.2.3. Détection de la protéine membranaire *LiPSA-50S* à la surface des parasites par cytométrie en flux

Pour chaque souche parasitaire, 10^6 parasites sont culotés à 2000g pendant 10 minutes, et les différents culots sont repris dans 100 μ L de tampon de marquage (PBS-SVF 1%). Un volume de 20 μ L d'anticorps monoclonal de souris anti-*LaPSA-38S* (mAb F5 d'isotype IgM monovalent) à 1 mg/mL sont ajoutés dans chaque tube. Les tubes sont incubés pendant 30 minutes à 4°C et à l'obscurité. Les parasites sont ensuite lavés avec 1 mL de tampon de marquage, centrifugés à 2000g pendant 10 minutes et les culots sont repris dans 100 μ L de tampon de marquage, auxquels sont ajoutés 20 μ L d'anticorps secondaire (PE-Rat anti-IgM de souris, BD Biosciences). Les tubes sont incubés 1 heure à 4°C et à l'obscurité. Les parasites sont à nouveau lavés avec 1 mL de tampon de marquage et les culots sont repris dans 400 μ L de tampon de marquage.

Un anticorps isotypique est également utilisé pour déterminer le niveau de fluorescence négative (utilisé pour soustraire le marquage non spécifique) des parasites marqués. Dans ce test, un anticorps monoclonal purifié d'isotype IgM produit chez la souris (BD Biosciences) est donc utilisé comme contrôle.

La fluorescence émise par les marquages membranaires est enfin détectée par cytométrie en flux (cytomètre FACS Canto, BD Biosciences) et analysée par l'utilisation du logiciel BD FACS Diva. Le niveau de fluorescence des parasites marqués sera comparé entre les différentes souches. Il permettra de révéler le niveau d'expression de la protéine membranaire *LiPSA-50S* à la surface des parasites.

1.3. Tests d'infectiosité *in vitro*

1.3.1. Récolte et préparation des macrophages péritonéaux murins

Des souris saines BALB/cByJ femelles (Charles River Laboratories) âgées de 8 semaines sont sacrifiées et disséquées de manière à découvrir le péritoine. Un volume de 5 mL de PBS est administré par injection intra-péritonéale. Après un bref massage du péritoine, le PBS est aspiré pour récupérer les macrophages. Les cellules sont centrifugées à 400g pendant 10 minutes à 4°C. En cas de présence résiduelle d'érythrocytes, une lyse est réalisée par re-suspension du culot avec 5 mL de tampon ACK (NH_4Cl 0,15 M, KHCO_3 1 mM, Na_2EDTA 0,1 mM), suivie d'une incubation de 5 minutes dans la glace. Les macrophages sont ensuite lavés 3 fois dans du PBS. Le culot final est repris dans 5 mL de milieu RPMI complet (RPMI 1640 supplémenté de 10% de SVF décomplémenté, 2 mM de L-Glutamine, 100 UI/mL de pénicilline et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de streptomycine) et dénombrés en cellule de Thoma avec du Bleu Trypan (colorant d'exclusion permettant de visualiser leur viabilité).

1.3.2. Infection des macrophages par les parasites

Après comptage, la concentration macrophagique est ajustée à $5 \cdot 10^5$ macrophages/mL. Un volume de 200 μL par puits de suspension macrophagique (soit 10^5 cellules) est ensuite déposé en chambre de culture 8 puits amovibles (Labtek®, Nalge Nunc International). Les cellules sont incubées à 37°C, sous atmosphère enrichie en CO_2 , pendant 2 heures (temps nécessaire pour que les macrophages adhèrent à la lame), puis délicatement lavées avec du PBS afin d'éliminer les lymphocytes présents. Les cellules sont à nouveau incubées pendant une nuit.

Le lendemain, les promastigotes des différentes souches parasitaires (*Ldi* WT, *Ldi* pTEX et *Ldi* SENS) sont mis en contact avec les macrophages à raison d'un ratio 10:1 (10 parasites pour 1 macrophage), puis incubés 2 heures à 37°C/5% CO_2 , temps nécessaire à l'attachement des parasites sur les macrophages. L'infection est stoppée par 3 lavages successifs des macrophages en PBS afin d'éliminer les parasites non attachés aux cellules. Les macrophages sont ensuite incubés pendant 3 jours à 37°C/5% CO_2 afin de permettre la multiplication des parasites à l'intérieur des macrophages. L'ensemble des cellules est ensuite fixé par 200 μL de méthanol pendant 5 minutes à température ambiante. Après élimination du méthanol, les chambres de culture Labtek® sont séchées et colorées au Giemsa (Sigma-Aldrich) dilué au $1/20^{\text{ème}}$ dans de l'eau osmosée, pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. La lecture est réalisée au microscope optique à immersion (grossissement x1000). Pour chaque puits, le comptage s'effectue sur un minimum de 300

macrophages. Le pourcentage de macrophages infectés ainsi que le nombre d'amastigotes par macrophage sont déterminés. L'Indice Parasitaire (IP) est calculé selon la formule :

$$\text{IP} = \% \text{ macrophages infectés} \times \text{nombre d'amastigotes par macrophage}$$

Pour chaque souche parasitaire, l'infection des macrophages est réalisée en triplicat.

La comparaison de l'IP entre les différentes souches permettra de déterminer la virulence des parasites. L'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism®. Le pourcentage de macrophages infectés est analysé par le test statistique du Chi², le nombre d'amastigotes par macrophage ainsi que l'indice parasitaire sont analysés par un test de Student, au risque alpha de 5%.

1.4. Étude de la virulence et de la pathogénicité des leishmanies transgéniques *in vivo*

1.4.1. Infection des souris

Un total de 132 souris BALB/cByJ (Charles River Laboratories) de même sexe, de même poids et de même âge est utilisé dans cette étude, et divisé en 4 groupes : (1) un groupe contrôle de souris non infectées, (2) un groupe de souris infectés par *Ldi* WT, (3) un groupe de souris infectées par *Ldi* pTEX et enfin (4) un groupe de souris infectées par *Ldi* SENS. Dans un premier temps, les parasites *Ldi* WT, *Ldi* pTEX et *Ldi* SENS sont centrifugés à 2000g pendant 10 minutes et lavés trois fois avec du PBS afin d'éliminer toute trace de milieu de culture. Les souris contrôles reçoivent 100 µL de PBS par injection intra-péritonéale. Les autres souris sont infectées par 5.10^7 parasites repris dans 100 µL de PBS (*Ldi* WT, *Ldi* pTEX ou *Ldi* SENS selon le groupe), par injection intra-péritonéale (**Figure 6**).

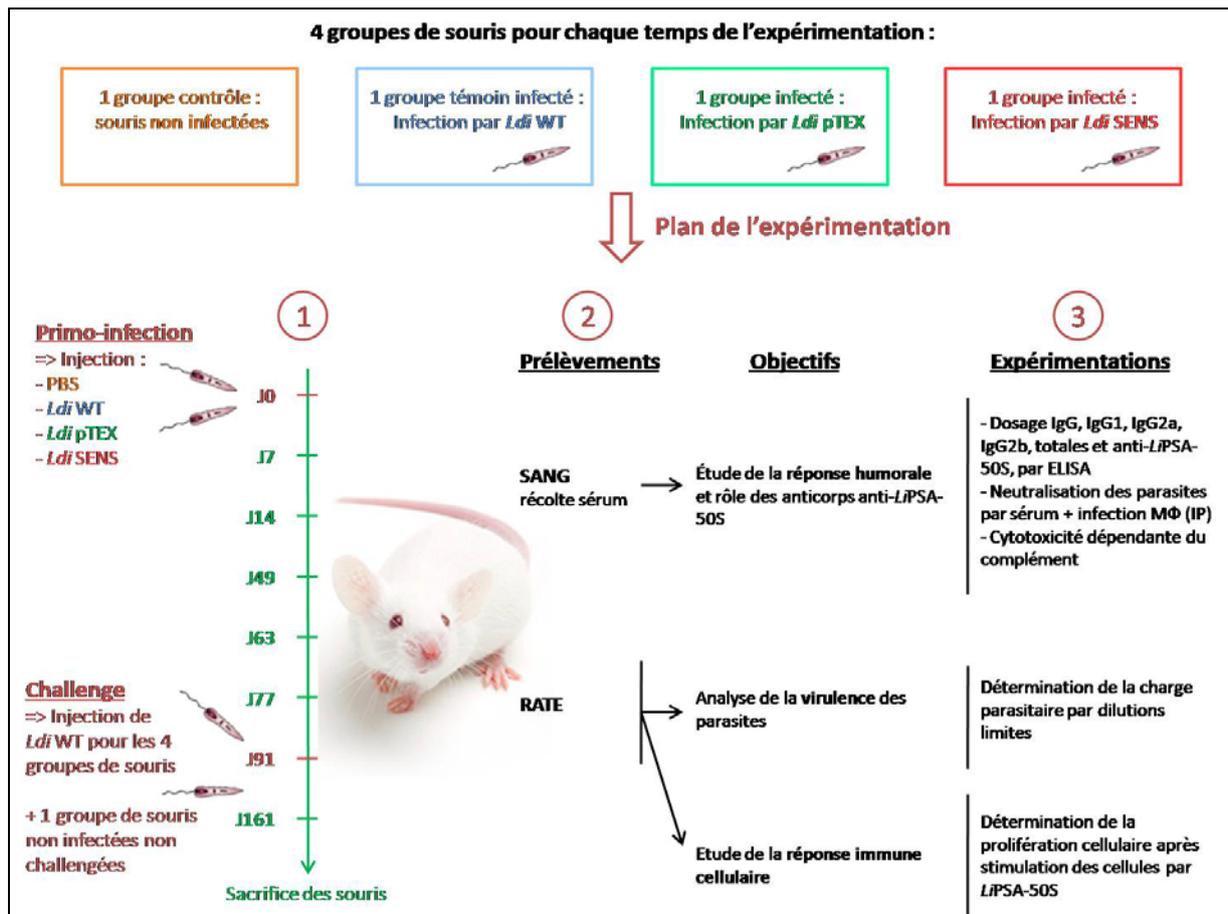


Figure 6. Étude du rôle biologique de la protéine *LIPSA*-50S. Plan de l'expérimentation animale.

Cinq à six souris par groupe sont sacrifiées à différents temps de l'expérimentation : J7, J14, J49, J63 et J77 post-infection (**Tableau IV**). Pour les souris restantes, une seconde épreuve infectieuse est réalisée avec le parasite *Ldi* WT 91 jours après la première épreuve, en recevant une injection de 5.10^7 *Ldi* WT /100 μ L de PBS en intra-péritonéale. Les souris sont ensuite sacrifiées au 70^{ème} jour post-challenge, soit 5 mois après la première infection.

Tableau IV. Composition des groupes de souris pour l'infection expérimentale

Nombre total de souris		30	30	30	42		
J0 : Infection (1 ^{ère} épreuve) ou contrôle		Ldi WT	Ldi pTEX	Ldi SENS	Contrôle PBS		
Nombre de souris	Sacrifice J7	5	5	5	6		
	Sacrifice J14	5	5	5	6		
	Sacrifice J49	5	5	5	6		
	Sacrifice J63	5	5	5	6		
	Sacrifice J77	5	5	5	6		
	J91 : Infection (2 ^{nde} épreuve) ou contrôle		Ldi WT	Ldi WT	Ldi WT	Ldi WT	PBS
	Sacrifice post-challenge J150 (5 mois total)	5	5	5	6	6	

Lors du sacrifice des souris, plusieurs tissus biologiques sont prélevés. Le sérum des souris est récolté à partir du sang total afin d'étudier la réponse humorale. La rate, un des organes cibles des parasites *Leishmania*, est extraite pour étudier la virulence des différentes souches parasitaires en analysant la charge parasitaire. Enfin, les splénocytes serviront également à étudier la réponse immunitaire à médiation cellulaire.

Le protocole a été soumis au Comité d'Éthique pour l'expérimentation animale Languedoc-Roussillon (CEEA-LR n°36) et a reçu un avis favorable (référence du protocole : CEEA-LR-11030).

1.4.2. Détermination de la charge parasitaire

Les rates sont extraites des souris, déposées dans un tube contenant 4 mL de milieu RPMI 1640, supplémenté de 2 mM de L-Glutamine, 100 UI/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 20% de SVF décomplémenté. Après avoir été pesées, elles sont dilacérées sur un tamis cellulaire constitué d'une grille en nylon de 100 µm (Cell Strainer, BD Biosciences). Les cellules sont ensuite replacées dans leur tube d'origine. Dans une plaque 96 puits, 150 µL de milieu complet RPMI 20% SVF sont distribués dans tous les puits sauf le premier puits d'une ligne sur deux. Un volume de 250 µL de suspension cellulaire issue de la dilacération de la rate est déposé dans le premiers puits de la ligne A et C (ou E et G, soit une ligne sur deux). Des dilutions limites sont réalisées de 2 en 2 avec 150 µL de suspension cellulaire à diluer, sur deux lignes de la plaque. Les plaques sont ensuite scellées avec du parafilm et incubées à 26°C pendant 15 jours. Les plaques sont ensuite examinées au microscope inversé (grossissement x400). L'absence ou la présence de parasites est notée pour chaque puits. Le titre final correspond à la dernière dilution pour laquelle le puits contient au moins un parasite. Le

nombre de parasites par gramme d'organe est calculé selon la formule suivante, d'après le protocole décrit par Buffet et *al.* [130] :

Charge parasitaire = (inverse de la dilution / poids de l'organe) x 400

L'analyse statistique est réalisée avec le logiciel GraphPad Prism®. Une comparaison de la moyenne des charges parasitaires est entreprise par un test non paramétrique (Mann-Whitney-Wilcoxon) au risque alpha de 5%.

1.4.3. Détermination de la capacité des splénocytes à proliférer

La détermination de la prolifération *in vitro* des cellules spléniques face à une stimulation par la protéine purifiée LaPSA-38S est réalisée de la façon suivante. Les lymphocytes présents dans la suspension cellulaire issue de la dilacération des rates de souris sont dénombrés par comptage microscopique après coloration au Bleu Trypan. Un volume de 100 µL de lymphocytes à 2.10^6 /mL est déposé en plaque 96 puits (soit 2.10^5 lymphocytes par puits), dans du milieu R5 complet (RPMI 1640 supplémenté de 2 mM de L-Glutamine, 100 UI/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine, 50 µM de 2-mercaptoethanol, 1 mM de pyruvate de sodium, 1X d'acides aminés non essentiels, et 10% de SVF décomplémenté). Différents stimuli sont ajoutés à chaque puits et en triplicat : 3 puits contrôles négatifs « non stimulés » pour lesquels 100 µL de milieu R5 complet sont ajoutés, 3 puits contrôles positifs pour lesquels 2 µg/mL de concanavalin A (ConA, mitogène non spécifique des lymphocytes T, Sigma-Aldrich) sont ajoutés et enfin 3 puits dans lesquels les cellules sont stimulées avec 5 µg/mL de LaPSA-38S. Les cellules sont incubées à 37°C/5% CO₂ pendant 5 jours. La prolifération cellulaire est alors déterminée par une méthode non radioactive, une technique ELISA utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre le BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine), révélé lui-même par un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (Kit « Cell Proliferation Biotrak Elisa System version 2 », Amersham, GE Healthcare). Ainsi, 16 heures avant la fin de la période d'incubation, 10 µM de BrdU sont ajoutés dans chaque puits. Il s'agit d'un analogue de la thymidine qui s'incorpore à l'ADN nouvellement synthétisé. Le lendemain, soit après 5 jours de stimulation cellulaire, les cellules sont fixées et l'ADN est dénaturé. Un anticorps anti-BrdU couplé à la peroxydase est ajouté. La révélation se fait par addition du substrat TMB (Tétraméthylbenzidine) pendant 15 minutes et la réaction est ensuite stoppée par ajout de H₂SO₄. La densité optique est mesurée au spectrophotomètre à 450 nm dans les 5 minutes après l'arrêt de la réaction.

Le pourcentage de prolifération spécifique est alors calculé comme suit :

% Prolifération = ((DO puits antigène – DO puits milieu) / (DO puits ConA – DO puits milieu)) x 100

L'analyse statistique est réalisée avec le logiciel GraphPad Prism®. Une comparaison de la moyenne de prolifération cellulaire est entreprise par un test non paramétrique (Mann-Whitney-Wilcoxon), au risque alpha de 5%.

1.4.4. Dosage des immunoglobulines dans les sérums

Les sérums des souris sont analysés afin de quantifier la concentration en immunoglobulines G (et leurs isotypes) totales et dirigées contre la protéine *LiPSA-50S*.

1.4.4.1 Quantification des immunoglobulines G totales et de leurs isotypes

Les immunoglobulines G non spécifiques, ainsi que leurs isotypes (IgG1, IgG2a et IgG2b) sont quantifiés par une technique d'ELISA sandwich. Des plaques 96 puits sont recouvertes par des anticorps de captures à raison de 5 µg/mL d'anticorps par puits, dans du tampon carbonate-bicarbonate (**Annexe 2**). Parallèlement, des gammes étalons sont réalisées en recouvrant par des immunoglobulines purifiées, sur 8 points allant de 0 à 1 mg/mL, en tampon carbonate-bicarbonate. Les plaques sont scellées et incubées à 37°C pendant 1h30 puis lavées avec 300 µL/puits de PBS – 0,05% Tween 20 (3 lavages). Les puits sont ensuite saturés avec 300 µL de PBS 1X-5%BSA et incubées à 37°C pendant 1h30. Après 3 lavages successifs, 100 µL de sérums de souris à tester sont ajoutés (voir dilutions en **Annexe 2**). Les plaques sont incubées à 37°C pendant 1 heure. Un volume de 100 µL d'anticorps secondaire couplé HRP dilué dans du PBS-0,05% Tween 20 est ajouté dans chaque puits. Les plaques sont incubées à 37°C pendant 30 minutes. Après 3 lavages successifs, un volume de 100 µL de solution de substrat est ajouté dans chaque puits (0,5 mg/mL d'OPD (Ortho-Phénylène Diamine, Sigma-Aldrich) en tampon citrate 50 mM supplémenté d'H₂O₂ (1 µL/mL). Les plaques sont incubées à température ambiante, sous agitation et à l'abri de la lumière, pendant 5 minutes. La réaction est stoppée par l'ajout de 50 µL/puits d'acide chlorhydrique 2N. La densité optique est mesurée par un spectrophotomètre à 490 nm.

Chaque échantillon est testé en triplicat. La concentration en immunoglobulines est calculée par rapport à la gamme étalon correspondante.

1.4.4.2 Quantification des immunoglobulines G totales et de leurs isotypes dirigés contre la protéine *LaPSA-38S*

Lorsqu'un animal est immunisé avec la protéine *LaPSA-38S* purifiée, les anticorps produits sont aussi bien capables de reconnaître la protéine *LaPSA-38S* que la protéine *LiPSA-50S*. Disposant uniquement de la protéine native purifiée *LaPSA-38S* (la purification de la protéine *LiPSA-50S* n'étant

pas encore possible), l'utilisation de la protéine *LaPSA-38S* permettra de quantifier les anticorps produits contre la protéine PSA dans les sérums des souris infectées.

Les immunoglobulines G, ainsi que leurs isotypes (IgG1, IgG2a et IgG2b), dirigés contre la protéine *LaPSA-38S* sont quantifiés par technique ELISA. La protéine purifiée *LaPSA-38S* est utilisée pour recouvrir une plaque 96 puits, à raison de 1 µg/mL de protéine par puits, en tampon carbonate-bicarbonate. Parallèlement, des gammes étalons sont réalisées en recouvrant par des immunoglobulines purifiées, sur 8 points allant de 0 à 1 mg/mL, en tampon carbonate-bicarbonate. Les plaques sont incubées à 37°C pendant 1h30 puis lavées avec 300 µL/puits de PBS-0,05% Tween 20 (3 lavages). Un volume de 100µL de sérums de souris à tester est ajouté par puits (voir dilutions en **Annexe 3**). Le protocole est ensuite identique à celui utilisé dans l'ELISA non spécifique (voir section 1.4.5.1).

Chaque échantillon est testé en triplicat. La concentration en immunoglobulines spécifiques est calculée par rapport à la gamme étalon correspondante, et sera exprimée en équivalent *LaPSA-38S*.

La concentration en immunoglobulines totales et en immunoglobulines dirigées contre la protéine *LIPSA-50S* (équivalent *LaPSA-38S*) est déterminée sur les 132 sérums issus des souris incluses dans l'étude. Le pourcentage d'anticorps spécifiques est également calculé pour chaque sérum et pour chaque immunoglobuline.

L'analyse statistique est réalisée avec le logiciel GraphPad Prism®. Une comparaison de la moyenne des concentrations d'immunoglobulines dirigées contre la protéine *LIPSA-50S* (équivalent *LaPSA-38S*) est entreprise par un test non paramétrique (Mann-Whitney-Wilcoxon), au risque alpha de 5%.

1.4.5. Étude de la fonction des anticorps contenus dans les sérums des souris infectées

Les sérums des souris infectées par les différentes souches parasitaires sont analysés afin de déterminer les fonctions des anticorps : les anticorps sont-ils neutralisants ou opsonisants ? Les anticorps induisent-ils une cytotoxicité dépendante du complément ?

Les sérums des souris infectées par *Ldi* WT, *Ldi* pTEX et *Ldi* SENS, ainsi que les sérums des souris témoins ayant reçu du PBS sont décomplémentés à 56°C pendant 30 minutes.

Les cultures parasitaires de *Ldi* WT, *Ldi* pTEX et *Ldi* SENS sont centrifugées à 2000g pendant 10 minutes. Trois lavages en PBS sont réalisés afin d'éliminer toute trace de SVF.

1.4.5.1 Effet des sérums de souris sur l'infectiosité *in vitro* des promastigotes vis-à-vis des macrophages

Les sérums des souris sont analysés afin d'étudier le pouvoir neutralisant ou opsonisant des anticorps qu'ils contiennent envers les parasites, et le rôle de ces anticorps sur l'infectiosité *in vitro* des parasites vis-à-vis des macrophages.

Des macrophages péritonéaux sont récoltés à partir de souris saines femelles BALB/cByJ âgées de 8 semaines, selon le protocole décrit à la section 1.3.1.

Un total de 2.10^7 parasites de chaque souche est centrifugé, et les culots sont repris par 50 μ L de sérums de souris correspondants (*Ldi* WT avec le sérum des souris infectées par *Ldi* WT, *Ldi* pTEX avec le sérum des souris infectées par *Ldi* pTEX, *Ldi* SENS avec le sérum des souris *Ldi* SENS et enfin *Ldi* WT avec le sérum des souris ayant reçu du PBS). Les parasites sont incubés à 4°C pendant 30 minutes puis lavés deux fois en PBS. Les parasites vivants sont dénombrés par cytométrie en flux, avec l'utilisation d'iodure de propidium. La concentration parasitaire est ajustée à 1.10^7 parasites/mL.

Plusieurs conditions sont testées : (1) les macrophages sont infectés par les parasites seuls (sans sérum), (2) les parasites incubés avec les sérums de souris sont mis en contact avec les macrophages, (3) le FcR (récepteur macrophagique connu pour jouer un rôle important dans la pénétration des parasites opsonisés par des anticorps à l'intérieur des macrophages) est bloqué puis les macrophages sont infectés par les parasites seuls (sans sérum) et (4) les parasites incubés avec les sérums de souris sont mis en contact avec les macrophages dont le FcR a été préalablement bloqué.

Le blocage du FcR macrophagique est réalisé par l'utilisation d'un anticorps purifié anti-FcR (Purified Rat anti-Mouse CD16/CD32 Mouse BD Fc Block™, Becton Dickinson). Une quantité de 0,8 μ g d'anti-FcR pour 1 million de cellules est ajoutée aux macrophages, et les cellules sont incubées à température ambiante pendant 5 minutes. L'infection des macrophages par les parasites coatés ou non (ratio 1 :10) est réalisée selon le protocole décrit à la section 1.3.2.

Après fixation et coloration des macrophages, le pourcentage de macrophages infectés ainsi que le nombre d'amastigotes par macrophage sont déterminés. L'Indice Parasitaire (IP) est déterminé selon la formule décrite à la section 1.3.2.

Pour chaque condition testée, l'infection des macrophages est réalisée en triplicat.

La comparaison de l'IP entre les différentes conditions testées permettra de déterminer l'effet des sérums des souris infectées sur la capacité des parasites à pénétrer à l'intérieur des macrophages.

L'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism®. Des tests de Student sont réalisés, au risque alpha de 5%.

1.4.5.2 Évaluation de la cytotoxicité dépendante du complément

Les sérums des souris infectées sont analysés afin de déterminer leur capacité à induire ou non une cytotoxicité dépendante du complément.

Un total de 1.10^7 parasites est culoté et resuspendu dans 50 μL de sérums de souris *poolés* auxquels sont ajoutés 950 μL de milieu RPMI complet sans SVF (RPMI 1640 supplémenté de 2 mM de L-Glutamine, 100 UI/mL de pénicilline et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de streptomycine). Chaque sérum rencontre chaque souche parasitaire. Un volume de 100 μL de parasites est distribué dans des puits d'une plaque 96 puits. Trois conditions sont testées pour chaque couple parasite/sérum : (i) 3 puits « *low control* » qui ne contiennent pas de complément, (ii) 3 puits « *high control* » pour lesquels le complément est remplacé par une solution de lyse cellulaire, et (iii) 3 puits « *test* » qui contiennent du complément. Ainsi, 10% de complément de lapin (Low-Tox-M Complement rabbit, Tebu-Bio) sont ajoutés à tous les puits « *test* ». La plaque est ensuite incubée à 26°C pendant 2 heures. Un volume de 10 μL de solution de lyse cellulaire est ajouté dans tous les puits « *high control* », et la plaque est placée sous agitation pendant 15 minutes. La plaque est centrifugée à 400g pendant 10 minutes et les surnageants sont éliminés. Les parasites sont repris dans un mélange PBS-iodure de propidium et les parasites morts sont dénombrés par cytométrie en flux (FACS Canto, BD Biosciences). Le pourcentage de parasites morts obtenu pour chaque tube est exporté du logiciel BD FACS Diva.

Le pourcentage de cytotoxicité est calculé selon la formule :

$$\% \text{ cytotoxicité} = ((\% \text{morts puits « test »} - \% \text{morts « low control »}) / (\% \text{morts « high control »} - \% \text{morts « low control »})) \times 100$$

L'analyse statistique est réalisée avec le logiciel GraphPad Prism®. Une comparaison du pourcentage de cytotoxicité est entreprise par un test paramétrique (anova et test post-hoc (Tukey)), au risque alpha de 5%.

2. Utilisation de la protéine recombinante native purifiée LaPSA-38S et sa partie carboxy-terminale comme candidats vaccins : essai de vaccination chez le chien

2.1. Chiens utilisés dans l'étude

Pour cette étude, 19 chiens de race Beagle, 10 mâles et 9 femelles, sont sélectionnés dans un élevage du Nord de la France, hors zone d'endémie leishmanienne (chenil CEDS, Domaine des Souches, 89130 Mézilles) sur des critères cliniques, sérologiques et immunologiques. En effet, les chiens doivent être en bonne santé avant la première immunisation, ne doivent pas présenter d'anticorps anti-leishmanies et de réponse cellulaire spécifique anti-*Leishmania*. Les chiens sélectionnés sont transportés à l'Institut Bourgelat de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon (ENVL), dans l'Unité d'Études Précliniques (UEPC) dans des conditions visant à exclure toute possibilité d'infection leishmanienne naturelle. Les animaux sont nourris, placés sous la surveillance d'un vétérinaire et reçoivent leurs vaccinations de routine. Les chiens sont maintenus en quarantaine pour une période de 30 jours avant le début des expériences. L'entretien et la gestion des chiens sont effectués selon les directives éthiques imposées par l'ENVL.

2.2. Candidats vaccins

La protéine native recombinante purifiée LaPSA-38S est utilisée en tant que candidat vaccin. La protéine LaPSA-12S, correspondant à la partie carboxy-terminale de la protéine LaPSA-38S, identifiée grâce à des études antérieures réalisées au laboratoire [121], est la partie la plus immunogène de la protéine LaPSA-38S. La protéine LaPSA-12S a donc été produite dans un système bactérien (*E. coli* M15/PQE-31) (**Annexe 4**). La protéine recombinante purifiée LaPSA-12S est également utilisée en tant que candidat vaccin dans cette étude. Les deux protéines sont formulées avec l'adjuvant QA-21 (un dérivé de la saponine).

2.3. Protocoles d'immunisation, d'épreuve infectieuse expérimentale et prélèvements de matériels biologiques

Dans cette étude, trois groupes de chiens sont constitués :

- Un groupe placebo : 5 chiens reçoivent une injection d'eau physiologique pour préparations injectables ;

- Un groupe immunisé avec LaPSA-38S : 9 chiens reçoivent une injection de 25 µg de LaPSA-38S adjuvés avec 60 µg de QA-21 ;
- Un groupe immunisé avec LaPSA-12S : 5 chiens reçoivent une injection de 25 µg de LaPSA-12S adjuvés avec 60 µg de QA-21.

Trois injections intradermiques sont réalisées selon un planning défini (**Figure 7**). Une randomisation est réalisée avant la première injection en fonction du sexe, de l'âge et du poids.

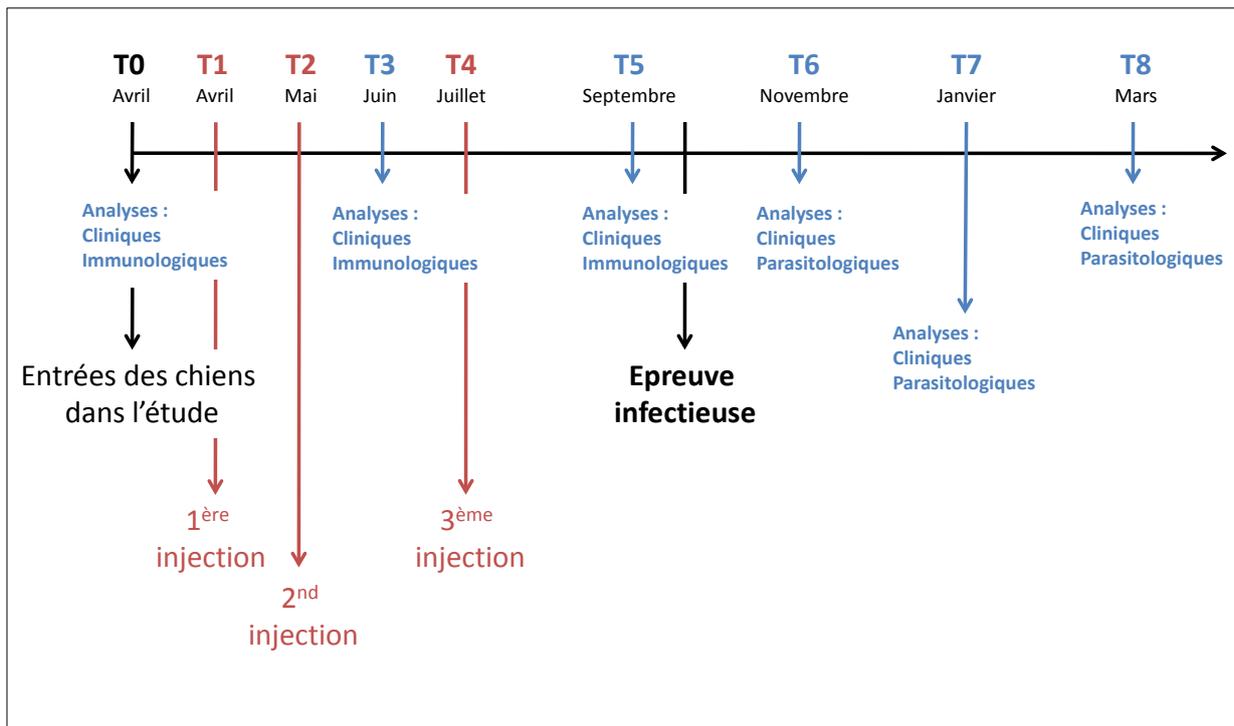


Figure 7. Planning de l'étude. Immunisation des chiens avec les protéines recombinantes, infection expérimentale et prélèvements à différents temps

Deux mois après la vaccination (jour 84), tous les chiens subissent une infection expérimentale. L'épreuve infectieuse expérimentale consiste en l'injection par voie intraveineuse de 10^8 formes promastigotes de phase stationnaire de croissance (métacycliques) de *Leishmania infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263, clone 2, zymodème MON-1).

Des prélèvements sanguins sur tube sec et tube héparine-lithium, ainsi que des prélèvements de moelle osseuse par ponction sternale (en tube citrate) sont réalisés sur tous les chiens après anesthésie. Tous les prélèvements, ainsi que le suivi clinique des chiens pendant toute la durée de l'étude, sont réalisés par un vétérinaire.

Les immunisations, les suivis cliniques et les analyses sont effectués en double aveugle. La levée de secret n'a lieu qu'à la fin de l'étude. Les protocoles ont été présentés et approuvés par le Comité d'Éthique de l'ENVL (N° ICLB 135/08).

2.4.Suivis cliniques

Les chiens sont suivis pendant 3 semaines après chaque injection. La tolérance locale est étudiée par un examen visuel et des lésions sont marquées quotidiennement sur une période de 14 jours après chaque injection. Un bilan de santé quotidien avec mesure de la température rectale et un examen clinique hebdomadaire permettent de suivre la tolérance générale des immunisations. Chaque chien est également pesé une fois par semaine tout au long de l'expérimentation. Après l'épreuve infectieuse expérimentale, les chiens subissent un dépistage systématique par la recherche de signes cliniques classiques et l'isolement du parasite.

2.5.Suivis immunologiques

2.5.1. Immunité à médiation cellulaire

Les prélèvements sanguins sur tubes héparine-lithium donnent accès aux cellules du système immunitaire, et permettent ainsi l'étude de la réponse immune à médiation cellulaire induite après immunisation des chiens.

2.5.1.1 Effets leishmanicides

Ce test est utilisé afin de déterminer la capacité des macrophages (dérivés des monocytes du sang circulant) à être activés par la voie classique, et donc à produire des dérivés du monoxyde d'azote (NO) aboutissant à la mort des parasites intracellulaires, lorsqu'ils sont co-cultivés avec des lymphocytes autologues.

Les PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) sont isolées du sang total par gradient de Ficoll (Ficoll Lymphoprep®, densité $1,077 \pm 0.001$ g/mL ; AbCys) et centrifugées à 700g pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois dans du PBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+} par centrifugation à 400g pendant 10 minutes et à 4°C. Elles sont resuspendues dans du RPMI 1640 supplémenté par 2 mM de glutamine, 10% de SVF, 100 µg/mL de streptomycine et 100 UI/mL de pénicilline. Un volume de 200 µL de suspension cellulaire à $5 \cdot 10^6$ PBMC/mL est distribué dans des chambres de culture Labtek® (Nalge Nunc International) et 4 mL de cette suspension cellulaire sont distribués dans des boîtes de culture ventilées de 25cm². Après 30 minutes d'incubation à 37°C/5%

CO₂, les Labtek® sont délicatement lavés avec du milieu complet afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Les macrophages sont obtenus à partir des monocytes en culture après 5 jours de maturation. Les cellules non adhérentes, correspondant aux lymphocytes, sont lavées dans du milieu complet et cultivées dans des boîtes de 25cm² à 37°C/5% CO₂ jusqu'à leur utilisation.

Les macrophages matures sont infectés *in vitro* avec des formes promastigotes de phase stationnaire de culture de *Leishmania infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263, clone 2, zymodème MON-1) pendant 2 heures à 37°C/5% CO₂ à un ratio parasites:macrophage de 5:1. Les macrophages sont alors délicatement lavés 2 fois pour éliminer les parasites non attachés, puis incubés en présence de leurs lymphocytes autologues à un ratio lymphocytes:macrophage de 2:1 pendant 72 heures. Des macrophages infectés non co-cultivés avec les lymphocytes servent de témoins positifs d'infection. Après 72 heures, les surnageants sont conservés à -80°C et les cellules sont fixées au méthanol puis colorées au Giemsa. Trois puits de macrophages co-cultivés et trois puits de macrophages non co-cultivés sont réalisés pour chaque chien.

Un total de 300 macrophages est observé au microscope optique à immersion (grossissement x1000) pour chaque puits, et le pourcentage de macrophages infectés, ainsi que le nombre d'amastigotes par macrophage sont déterminés. Les résultats de l'effet leishmanicide sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'indice parasitaire (IP), selon la formule :

$$\% \text{ inhibition} = 100 - (\text{IP} \times 100)$$

IP = (% macrophages infectés x nb d'amastigotes par macrophage lorsque les macrophages sont incubés avec les lymphocytes autologues) / (% macrophages infectés x nb d'amastigotes par macrophage dans les puits de macrophages non traités)

L'expérimentation est menée sur les prélèvements de sang des chiens avant immunisation (T0) et 2 mois après la troisième dose (T5).

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism®. Une comparaison du pourcentage moyen d'inhibition de l'IP entre les 3 groupes de chiens est entreprise par un test Mann-Whitney-Wilcoxon, au risque α de 5%.

2.5.1.2 Dosage du monoxyde d'azote dans les surnageants d'effets leishmanicides

La concentration en nitrites relargués par les macrophages est déterminée par la méthode de Griess modifiée [131]. Les surnageants de culture d'effets leishmanicides sont mélangés, volume à volume, au réactif de Griess (1% sulfanylamide, 0,1% naphtyléthylène-diamide-dihydrochloride et 2,5% acide

phosphorique). Parallèlement, une gamme étalon de nitrites allant de 0 à 5 nmol/L est intégrée au test. Le mélange est incubé 10 minutes à température ambiante. Le dosage des nitrites est réalisé en triplicat, pour chaque surnageant. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm.

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism®. Une comparaison de la concentration moyenne en nitrites entre les 3 groupes de chiens est analysée par un test Mann-Whitney-Wilcoxon, au risque α de 5%.

2.5.1.3 Dosage de l'IFN- γ dans les surnageants d'effets leishmanicides

La concentration en IFN- γ relarguée par les lymphocytes autologues est déterminée par une technique d'ELISA sandwich (DuoSet ELISA Canine IFN- γ , R&D System) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, un anticorps de capture anti-IFN- γ est utilisé pour recouvrir le fond d'une plaque 96 puits. Après lavages et saturation des puits, les surnageants ou une gamme étalon d'IFN- γ recombinant (de 0 à 2000 pg/mL) sont déposés dans les puits. Après lavages, un anticorps de détection biotinylé anti-IFN- γ est ajouté. Les puits sont à nouveau lavés et de la streptavidine-HRP γ est ajoutée. La réaction est révélée par ajout d'une solution substrat (TMB) et arrêtée avec une solution stop. Chaque essai est réalisé en triplicat. La densité optique est mesurée par un spectrophotomètre à 450 nm.

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism®. Une comparaison de la concentration moyenne d'IFN- γ entre les 3 groupes de chiens est entreprise par un test Mann-Whitney-Wilcoxon, au risque α de 5%.

2.5.2. Immunité à médiation humorale

Les prélèvements sanguins sur tubes secs permettent de récolter les sérums. Une fois le sang coagulé, les tubes sont centrifugés à 1000g, 4°C pendant 10 minutes. Le sérum est récolté, réparti en fractions aliquotes et conservé à -20°C. Le sérum est ensuite utilisé pour la recherche d'anticorps spécifiques.

2.5.2.1 Détection des IgG2 dirigées contre LaPSA-38S ou LaPSA-12S dans les sérums

Une analyse sérologique par ELISA est entreprise afin de détecter les IgG2 dirigées contre la protéine LaPSA-38S ou sa partie carboxy-terminale dans les sérums de tous les chiens entrés dans l'étude

avant immunisation (T0) et à différents temps post-immunisation : 1 mois après la seconde dose (T3) et 2 mois après la troisième dose (T5).

Des plaques de microtitration de 96 puits sont adsorbées pendant 1h30 à 37°C avec 100 µL par puits de protéine LaPSA-38S ou LaPSA-12S (1 µg/puits en tampon Carbonate-Bicarbonate 50 mM). Après lavages, les plaques sont saturées pendant 1 heure avec 300 µL par puits de PBS 1X-1% BSA. Les plaques sont à nouveau lavées et 100 µL de sérum de chien dilué au 1/50 dans du PBS/0,05% Tween 20 sont incubés en triplicat pendant 1h30 à 37°C. Après 3 lavages avec PBS, 100 µL/puits de conjugué anti-IgG₂ dilué au 1/5000 en PBS/0,05% Tween 20 sont ajoutés pour une période de 30 minutes à 37°C. Les plaques sont à nouveau lavées et 100 µL/puits de solution substrat (OPD à 0,1 mg/mL + H₂O₂ 1 µL/mL dans un tampon citrate 0,1 M) sont ajoutés et la réaction colorimétrique est développée pendant 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée par l'ajout de 50 µL/puits d'HCl 2N. Les densités optiques (DO) sont lues par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 490 nm. Le *cut-off* du test ELISA est déterminé par la formule : *Cut-Off* = moyenne des DO de tous les chiens à T0 + 3 écart-types.

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism®. Une comparaison de la DO moyenne entre les 3 groupes de chiens est entreprise par un test Mann-Whitney-Wilcoxon, au risque α de 5%.

2.5.2.2 Effet neutralisant des sérums sur l'infectiosité *in vitro* des parasites vis-à-vis des macrophages

Les promastigotes de *Leishmania infantum* sont collectés par centrifugation et lavés trois fois dans du PBS. Un total de $5 \cdot 10^6$ parasites est incubé pendant 30 minutes ou non avec 100 µL de sérum de chien décomplémenté dilué au ¼ dans du milieu de culture. Ces sérums ont été prélevés sur tous les chiens deux mois après la vaccination. Après un contrôle de viabilité cellulaire par coloration au Bleu Trypan, les parasites sont lavés trois fois dans du PBS, puis cultivés à 26°C dans 5 mL de milieu RPMI 1640 supplémenté de 20% de SVF. Après 3 jours de culture, les parasites sont dénombrés par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance parasitaire.

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism®. Une comparaison du pourcentage moyen d'inhibition de la croissance parasitaire entre les 3 groupes de chiens est entreprise par un test Mann-Whitney-Wilcoxon, au risque α de 5%.

2.6. Suivis parasitologiques

L'infection des chiens est évaluée avant injection et 2, 4 et 6 mois après le challenge. Les chiens sont anesthésiés et des prélèvements de moelle osseuse sur tubes citrates sont collectés par ponction sternale afin d'évaluer la charge parasitaire.

2.6.1. Analyse parasitologique qualitative par culture parasitaire

Le suivi parasitologique est réalisé par mise en culture des prélèvements de moelle osseuse de tous les chiens inscrits dans l'étude sur des milieux NNN (Novy, MacNeal, Nicolle) utilisés pour l'isolement de souches de leishmanies, et mise en évidence du parasite par examen microscopique. Lorsque le milieu NNN est épuisé en nutriments, la culture des parasites se poursuit dans du milieu RPMI 1640 supplémenté par 20% de SVF (2 passages maximum). Les prélèvements sont considérés comme positifs lorsque des parasites *Leishmania* sont détectés en culture ou sous-culture.

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism®. Une comparaison du nombre de chiens positifs entre les 3 groupes est analysée par un Chi², au risque α de 5%.

2.6.2. Analyse parasitologique quantitative par PCR

La présence d'ADN de leishmanies dans les prélèvements de moelle osseuse est également déterminée par PCR quantitative, selon une méthode d'amplification de l'ADN kinétoplastique [132]. L'ADN de chaque échantillon de moelle osseuse est extrait sur colonne de silice (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. La PCR quantitative est réalisée avec 1 μ L d'ADN, 1X Stratagene Brilliant Master mix, 15 pmol de chaque amorce spécifique pour la détection de l'ADN kinétoplastique de *Leishmania* (amorce sens 5'CTTTTCTGGTCCTCCGGGTAGG^{3'} et amorce anti-sens 5'CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA^{3'}), 50 pmol de sonde TaqMan (FAM-TTTTCGCAGAACGCCCTACCCGC-TAMRA) et de l'eau milliQ qsp 25 μ L. La courbe standard est réalisée à partir d'ADN extrait de 5.10⁶ parasites (dilutions en séries allant de 0,0001 à 50 000 parasites). Le programme de la réaction PCR, réalisé dans le thermocycleur Stratagene MX 4000, est composé de 45 cycles (94 et 55°C). Afin d'analyser la variabilité du nombre de mini-cercles détectés au moyen de cette qPCR, une quantification comparative est entreprise en utilisant un gène à copie unique, le gène de l'ADN polymérase. Les amorces et la sonde décrites par Bretagne *et al.* [133] (TGTCGCTTGACAGACCAGATG [200 pmol], GCATCGCAGGTGTGAGCAC [200 pmol], et VIC-CCAGGCTCGAAGTTGTTGCTGCCC-TAMRA [200 pmol]) sont utilisées en suivant les mêmes conditions de PCR que celles décrites pour l'amplification de l'ADN kinétoplastique.

Les résultats sont exprimés en nombre de parasites par mL d'aspirat de moelle osseuse. Un échantillon est considéré comme positif lorsque la concentration parasitaire est supérieure à 40 parasites/mL. Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism®. Une comparaison de la concentration parasitaire entre les 3 groupes de chiens est entreprise par un test Mann-Whitney-Wilcoxon, au risque α de 5%.

3. Utilisation de peptides issus de la protéine *La*PSA-12S comme candidats vaccins : essai de vaccination peptidique chez le chien

3.1. Chiens utilisés dans l'étude

Pour cette étude, 15 chiens de race Beagle, 8 mâles et 7 femelles, sont sélectionnés et suivis de la même façon que pour l'essai de vaccination avec les protéines recombinantes (voir section 2.1 du chapitre Matériel et Méthodes). L'entretien et la gestion des chiens sont également effectués selon les directives éthiques imposées par l'ENVL.

3.2. Candidat vaccin

Des peptides ont été identifiés au sein de la séquence protéique de *La*PSA-12S. A partir de la séquence en acides aminés de la protéine *La*PSA-12S, deux séquences peptidiques ont été reconnues comme étant potentiellement les plus immunogènes de part leur caractère hautement hydrophobe (brevet n° WO03025012, [134]) :

- Peptide A17E, séquence : K(Palmitoyl)-AARSARSREGYSLTDE
- Peptide A17G, séquence : K(Palmitoyl)-AASSTPSGSGCEVDG

L'ajout d'une palmitoyl-lysine aux séquences peptidiques (en N-terminal) permet un adressage rapide des peptides à l'intérieur des cellules vivantes. En effet, il a été décrit que la modification de peptides avec une palmitoyl-lysine conduit à l'obtention d'un vecteur efficace d'adressage cytoplasmique [135].

Aussi, un autre peptide a été identifié par la société PEPSCAN System (Amsterdam, Hollande) au sein de la protéine *La*PSA-12S par une approche « peptides chevauchants ». Ce peptide, appelé E34PC (séquence : VVRIEDEHKGYCRLGND CRTTEPTTTATPRGTPTPAP) serait impliqué dans la réponse vaccinale. En effet, la réponse anticorps des chiens vaccinés avec CaniLeish® serait principalement

dirigée contre la protéine LaPSA-12S et plus particulièrement contre un épitope porté par cette protéine, le peptide E34PC sous sa forme cyclisée.

3.3. Protocoles d'immunisation, d'épreuve infectieuse expérimentale et prélèvements de matériels biologiques

Dans cette étude, deux groupes de chiens sont constitués :

- Un groupe placebo : 5 chiens reçoivent une injection d'eau physiologique pour préparations injectables ;
- Un groupe immunisé avec les peptides : 10 chiens reçoivent une injection d'un mélange de 25 µg de A17E, 25 µg de A17G, 10 µg de E34PC, adjuvés avec 20 µg de QA-21 ;

Trois injections intradermiques sont réalisées selon un planning défini (**Figure 8**). Une randomisation est réalisée avant la première injection en fonction du sexe, de l'âge et du poids.

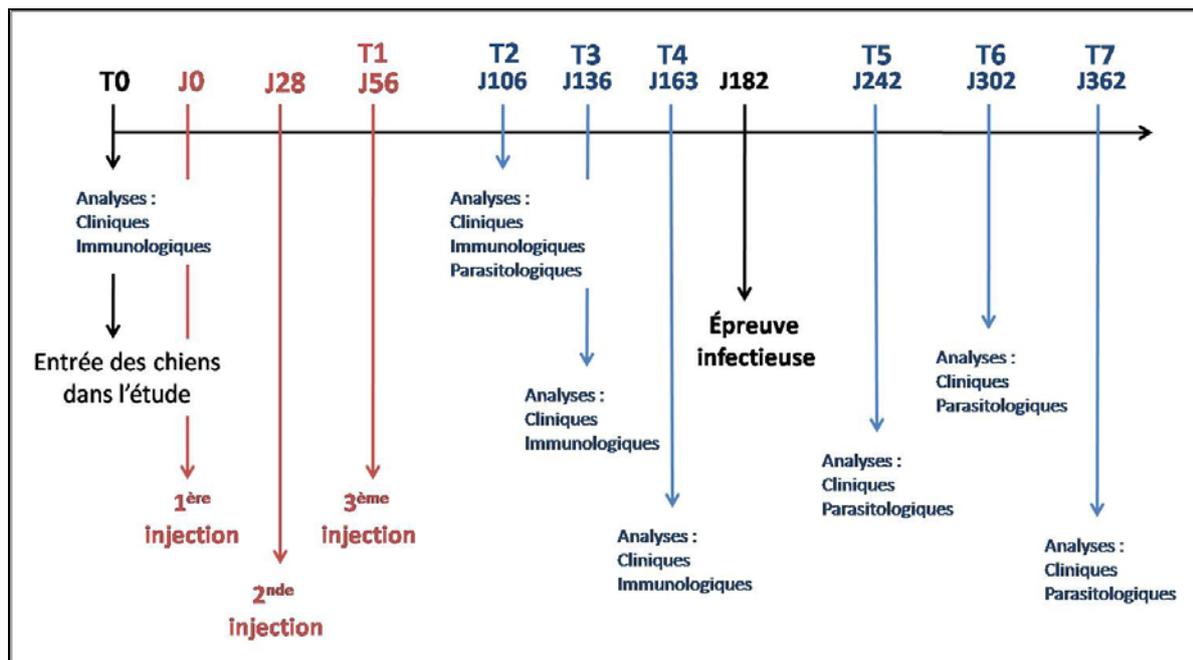


Figure 8. Planning de l'étude. Immunisation des chiens avec les peptides, infection expérimentale et prélèvements à différents temps.

Quatre mois après la vaccination, tous les chiens subissent une infection expérimentale. L'épreuve infectieuse expérimentale consiste en l'injection par voie intraveineuse de 10^8 formes promastigotes de phase stationnaire de culture (métacycliques) de *Leishmania infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263, clone 2, zymodème MON-1).

Des prélèvements sanguins sur tube sec et tube héparine-lithium, ainsi que des prélèvements de moelle osseuse par ponction sternale (tubes citrate) sont réalisés après anesthésie sur tous les chiens. Tous les prélèvements, ainsi que le suivi clinique des chiens pendant toute la durée de l'étude, sont réalisés par un vétérinaire.

Les immunisations, les suivis cliniques et les analyses sont effectués en double aveugle. La levée de secret n'a lieu qu'à la fin de l'étude. Les protocoles ont été présentés et approuvés par le Comité d'éthique de l'ENVL (n° ICLB 135/12).

3.4. Suivis des chiens

Les suivis cliniques, immunologiques et parasitologiques des chiens sont réalisés de la même façon que pour l'essai vaccinal avec les protéines *LaPSA-38S* et *LaPSA-12S* (se référer aux sections 2.4, 2.5 et 2.6 du chapitre Matériel et Méthodes).

Résultats

1. Étude du rôle biologique de la protéine *LiPSA-50S*

1.1. Vérification des souches de *Leishmania*

1.1.1. Quantification de l'expression du gène *LiPSA-50S*

Afin de vérifier la surexpression de la protéine PSA par les parasites transgéniques *Ldi SENS*, l'expression du gène *LiPSA-50S* a été quantifiée chez les différentes souches étudiées au cours de la phase stationnaire de croissance, soit après 7 jours de culture. L'ARN total a été extrait des formes promastigotes de *Ldi WT*, *Ldi pTEX* et *Ldi SENS* puis rétro-transcrit en ADNc. Par PCR quantitative utilisant des amorces spécifiques conçues pour amplifier *LiPSA-50S*, l'expression relative du gène *LiPSA-50S* des souches transgènes (*Ldi pTEX* et *Ldi SENS*) a été calculée par rapport à la souche sauvage (*Ldi WT*). Les résultats montrent que pour *Ldi pTEX*, souche contenant uniquement le plasmide vide, l'expression relative du gène *LiPSA-50S* est identique à la souche sauvage (1.03 contre 1.00 pour *Ldi WT*). En revanche, l'expression du gène *LiPSA-50S* est 67 fois plus importante chez les parasites *Ldi SENS* que chez les parasites *Ldi WT* ($p=0.029$) (**Figure 9**).

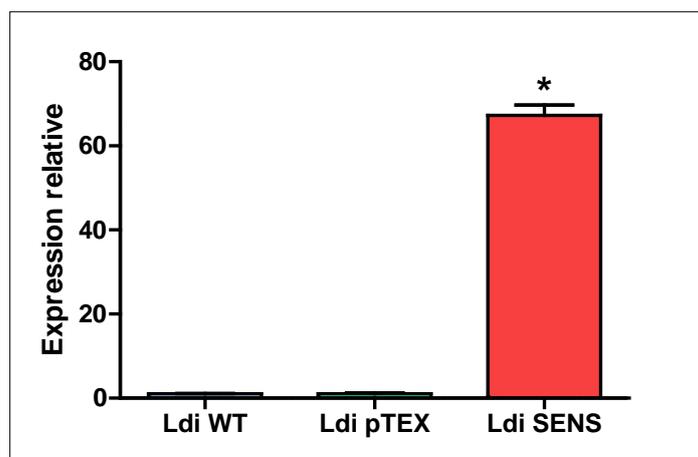


Figure 9. Quantification par RT-qPCR de l'expression du gène *LiPSA-50S* chez *Ldi WT*, *Ldi pTEX* et *Ldi SENS*. Les valeurs représentent la moyenne de l'expression relative du gène *LiPSA-50S* chez *Ldi pTEX* et *Ldi SENS* par rapport à la souche sauvage *Ldi WT* +/- l'écart-type (triplicat) (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

1.1.2. Vérification de la production de *LiPSA-50S* excrétée-sécrétée

La surexpression du gène *LiPSA-50S* étant confirmée chez les parasites *Ldi SENS*, la vérification de la traduction du gène en protéine excrétée-sécrétée a été réalisée. La détection de la protéine parmi les antigènes excrétés-sécrétés issus des surnageants de culture parasitaire a été effectuée en Western Blot. Contrairement à la protéine *LaPSA-38S*, la protéine *LiPSA-50S* n'a jamais pu être

produite et purifiée en grande quantité. La protéine *LaPSA-38S*, produite et purifiée de manière industrielle par la société vétérinaire VIRBAC, servira donc d'étalon dans cette expérimentation.

Les AES des différentes souches parasitaires (*Ldi* WT, *Ldi* pTEX et *Ldi* SENS) ont été déposés à quantité égale sur un gel d'acrylamide. Après migration et transfert sur membrane de nitrocellulose, les échantillons ont été révélés par incubation avec le sérum de lapin anti-*LaPSA-38S* puis un anti-Ig de lapin couplé HRP (BD Pharmingen). Les résultats du western blot (**Figure 10**) montrent que le sérum de lapin se fixe à la protéine *LaPSA-38S* (taille théorique 38,6 kDa), car la gamme étalon révèle une bande protéique d'une taille légèrement supérieure à 35 kDa. Les pistes chargées avec les AES de *Ldi* WT, de *Ldi* pTEX et de *Ldi* SENS révèlent chacune une bande protéique d'un poids moléculaire légèrement inférieur à 55 kDa, correspondant à la protéine *LiPSA-50S* (taille théorique 49,2 kDa). Toutes ces pistes ont été chargées avec 500 ng de protéines totales. Pourtant, la bande détectée au sein de la piste chargée avec les AES de *Ldi* SENS apparaît avec une intensité plus élevée que les bandes détectées dans les pistes chargées avec les AES de *Ldi* WT et *Ldi* pTEX. Le logiciel Image Quant™ révèle que 500 ng d'AES de *Ldi* WT contiennent 20ng de protéine *LiPSA-50S* (équivalent *LaPSA-38S*) par calcul de la quantité de pixels. En revanche, la même quantité d'AES de *Ldi* pTEX contient seulement 8 ng de *LiPSA-50S*, alors que 500 ng d'AES de *Ldi* SENS contiennent 69 ng de protéine *LiPSA-50S*, soit 3,45 fois plus que les AES de *Ldi* WT.

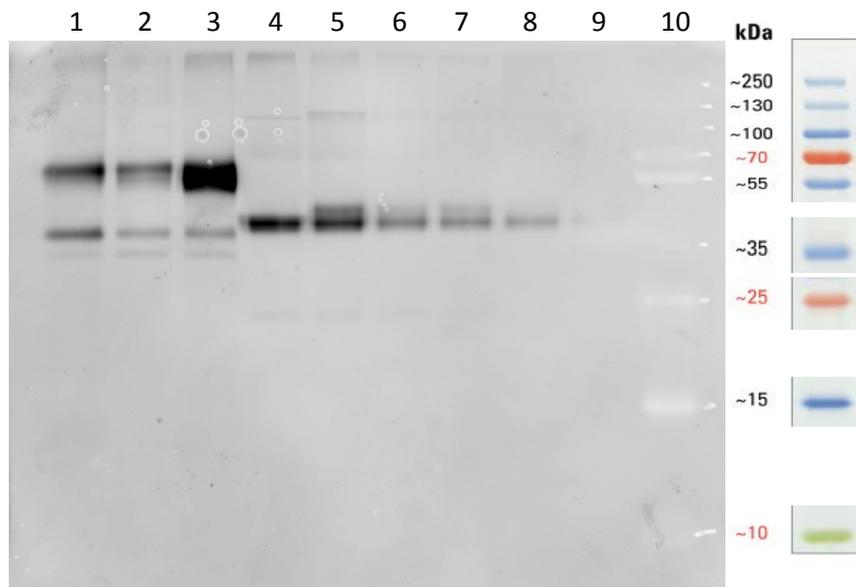


Figure 10. Révélation par Western blot de la protéine *LiPSA-50S* parmi les antigènes d'excrétion-sécrétion issus des surnageants de culture de *Ldi* WT (piste 1), *Ldi* pTEX (piste 2) et *Ldi* SENS (piste 3), et de la protéine *LaPSA-38S* purifiée utilisée ici comme gamme étalon (pistes 4 à 9 : concentrations décroissantes de *LaPSA-38S* de 20 à 0.63ng (dilutions 1/2)). La piste 10 contient 5µL de marqueur de poids moléculaire PageRuler(TM) Plus. Le gel SDS-PAGE a été réalisé en conditions non réduites.

1.1.3. Vérification de la production de PSA membranaire

La détection de la protéine *LiPSA-50S* à la surface des parasites *Ldi* WT, *Ldi* pTEX et *Ldi* SENS a été réalisée par cytométrie en flux (**Figure 11**). L'utilisation d'un anticorps murin monoclonal purifié, d'isotype IgM monomérique dirigé contre la protéine *LaPSA-38S*, a permis de comparer par marquage membranaire la quantité de *LiPSA-50S* présente à la surface des trois souches parasitaires. Une superposition des profils d'expression membranaire de la protéine *LiPSA-50S* a été réalisée pour comparer les trois souches entre elles au 4^{ème} jour de culture, correspondant à la phase exponentielle de croissance des leishmanies, et au 7^{ème} jour de culture, correspondant à la phase stationnaire. Que ce soit au 4^{ème} ou au 7^{ème} jour de culture, l'intensité de fluorescence détectée est quasiment la même pour les parasites *Ldi* WT et *Ldi* pTEX (superposition des histogrammes bleus et verts respectivement). Concernant la souche *Ldi* SENS, au 4^{ème} et 7^{ème} jour de culture, les histogrammes sont décalés à droite, montrant une intensité de fluorescence plus importante. De plus, au 7^{ème} jour de culture, l'intensité de fluorescence émise par la majorité des parasites *Ldi* WT et *Ldi* pTEX diminue, en comparaison avec l'intensité de fluorescence détectée au 4^{ème} jour de croissance parasitaire. Concernant *Ldi* SENS, la quantité relative des parasites qui émettent une fluorescence positive diminue au 7^{ème} jour de croissance, mais reste importante.

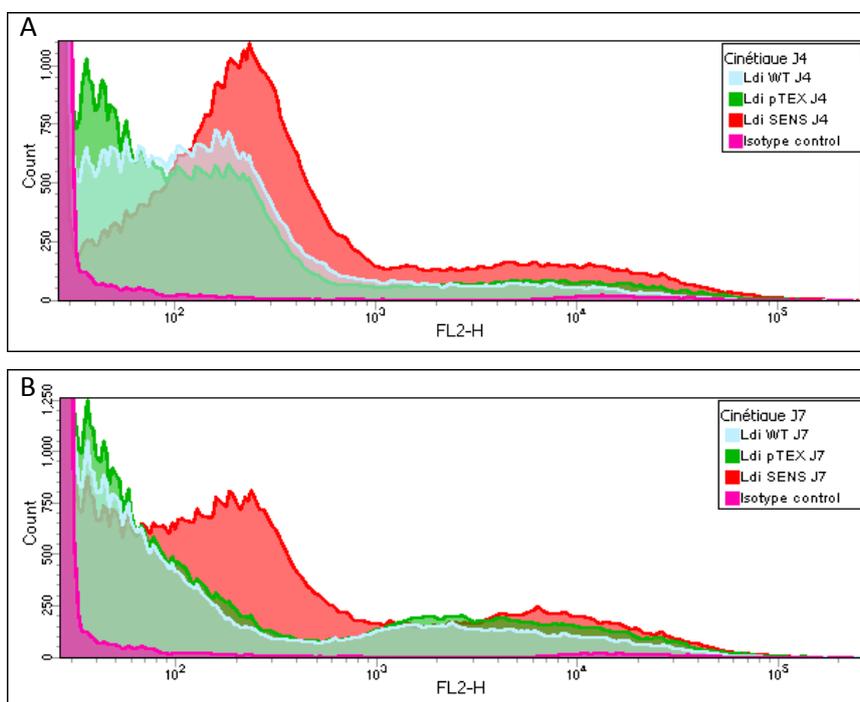


Figure 11. Détection de la protéine *LiPSA-50S* à la surface des parasites *Ldi* WT (bleu), *Ldi* pTEX (vert) et *Ldi* SENS (rouge) au 4^{ème} (A) et 7^{ème} (B) jour de culture *in vitro*, par cytométrie en flux. Les histogrammes représentent le profil d'expression membranaire de la protéine *LiPSA-50S* par la détection de l'intensité de fluorescence émise (FL2) en fonction de la quantité relative de parasites détectés (count).

1.2. La surexpression de la protéine *LiPSA-50S* augmente la virulence du parasite *in vitro*

Afin de déterminer la virulence des différentes souches parasitaires, des macrophages péritonéaux de souris BALB/c ont été infectés par *Ldi* WT, *Ldi* pTEX et *Ldi* SENS. Après 72 heures d'infection, seulement 33% des macrophages sont infectés par *Ldi* WT et 39% par *Ldi* pTEX, alors que l'infection par *Ldi* SENS montre 68% de macrophages infectés avec une différence statistiquement significative ($p < 0,0001$) (**Figure 12 A**). Suite à l'infection par *Ldi* SENS, le nombre d'amastigotes par macrophage s'élève à 5, contrairement à l'infection par *Ldi* WT et *Ldi* pTEX pour lesquels seulement 1 amastigote par macrophage a pu être dénombré ($p < 0,0001$) (**Figure 12 B**). L'indice parasitaire, reflétant ces deux paramètres, révèle également qu'aucune différence statistiquement significative n'existe entre l'infection par *Ldi* WT et *Ldi* pTEX (**Figure 12 C**). En revanche, l'indice parasitaire calculé suite à l'infection par *Ldi* SENS est largement supérieur à l'indice parasitaire obtenu avec l'infection par *Ldi* WT et *Ldi* pTEX puisqu'il s'élève à 3,3, contre 0,3 et 0,5 respectivement ($p < 0,0001$).

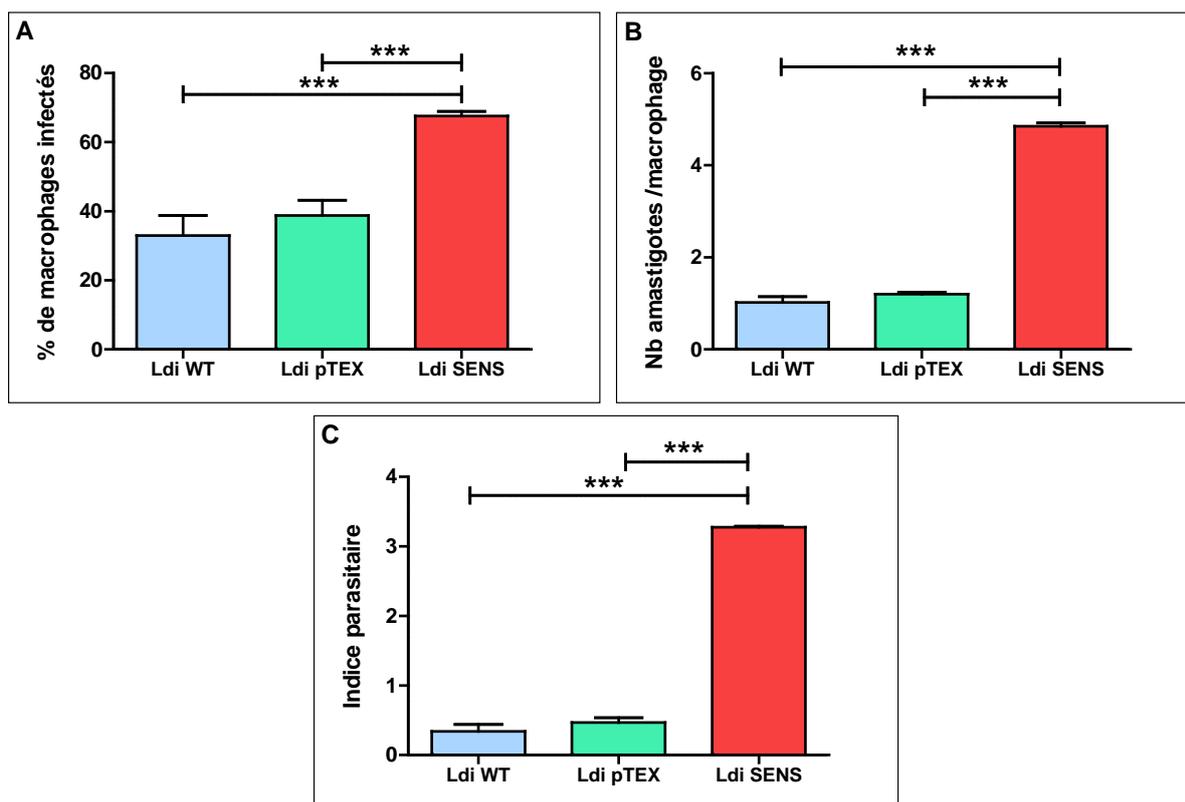


Figure 12. Virulence des leishmanies transgènes *in vitro*. Les graphiques représentent (A) le pourcentage moyen de macrophages infectés par *Ldi* WT, *Ldi* pTEX et *Ldi* SENS +/- l'écart-type, (B) le nombre moyen d'amastigotes par macrophage suite à l'infection par *Ldi* WT, *Ldi* pTEX et *Ldi* SENS +/- l'écart-type, (C) l'indice parasitaire moyen déterminé suite à l'infection des macrophages par *Ldi* WT, *Ldi* pTEX et *Ldi* SENS +/- l'écart-type (triplicats) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

1.3. Virulence et pathogénicité des leishmanies transgéniques *in vivo*

Afin d'étudier la virulence et la pathogénicité des leishmanies transgéniques, un protocole d'infection expérimentale *in vivo* a été mené chez la souris BALB/cByJ.

1.3.1. La surexpression de *LiPSA-50S* empêche le parasite de s'installer dans la rate

La charge parasitaire, correspondant au nombre de parasites par gramme de rate, a été déterminée pour chaque souris et à tous les temps de l'expérimentation. La cinétique des charges parasitaires montre que les charges des souris infectées par *Ldi* WT et *Ldi* pTEX suivent le même profil (différence non significative) (**Figure 13**). De plus, elles atteignent un pic au 49^{ème} jour post-infection, avec plus de 20.000 parasites par gramme de rate. En revanche, les souris infectées par *Ldi* SENS présentent des charges parasitaires quasiment nulles ($p=0,0097$).

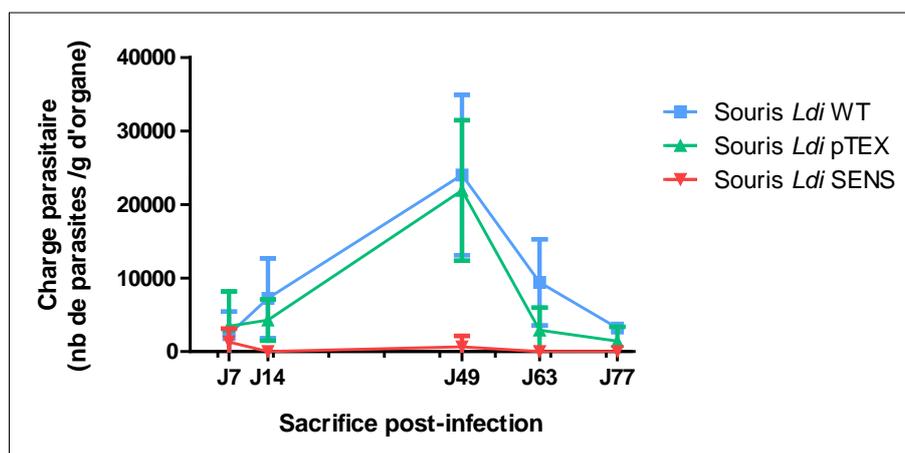


Figure 13. Cinétique des charges parasitaires des rates de souris infectées par *Ldi* WT (bleu), *Ldi* pTEX (vert) et *Ldi* SENS (rouge). Les valeurs représentent le nombre moyen de parasites par gramme de rate pour chaque groupe de souris, à différents temps post-infection, +/- l'écart-type.

1.3.2. Étude de la réponse immunitaire à médiation cellulaire

La détermination de la prolifération *in vitro* des cellules spléniques face à une stimulation par la protéine purifiée *LaPSA-38S* a été entreprise. Les résultats ne montrent aucune différence statistiquement significative entre les différents groupes de souris à J7, J14, J63 et J77 post-infection (données non montrées). Au 49^{ème} jour post-infection, les splénocytes issus des souris infectées par *Ldi* WT et *Ldi* pTEX ne révèlent aucune différence significative de prolifération comparée aux splénocytes issus des souris contrôles PBS (**Figure 14**). En revanche, les cellules extraites des rates des souris infectées par *Ldi* SENS sont capables de proliférer face à une stimulation par la protéine *LaPSA-38S*, révélant une différence statistiquement significative avec le pourcentage de prolifération

spécifique obtenu à partir des splénocytes des souris PBS ($p=0,0095$), mais aucune différence statistiquement significative n'est observée entre les splénocytes des souris SENS et les splénocytes des souris WT ou pTEX.

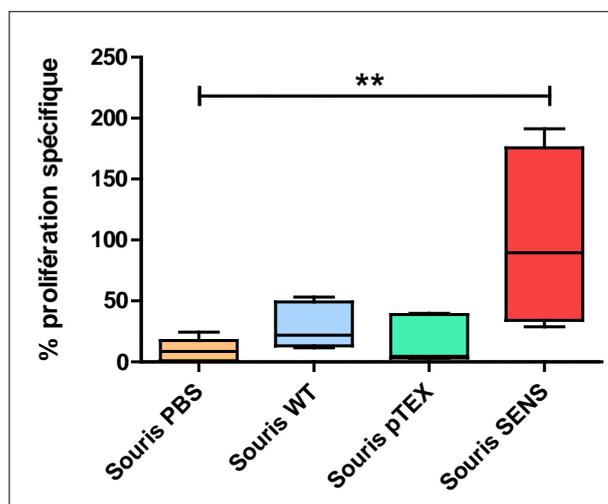


Figure 14. Analyse de la prolifération cellulaire face à une stimulation par la protéine *LaPSA-38S*. Les valeurs représentent le pourcentage moyen de prolifération spécifique par groupe de souris, après stimulation des splénocytes par la protéine purifiée *LaPSA-38S*, +/- l'écart-type. Les splénocytes sont issus des souris contrôles ayant reçu du PBS (orange), des souris infectées par *Ldi* WT (bleu), des souris infectées par *Ldi* pTEX (vert) et des souris infectées par *Ldi* SENS (rouge) puis sacrifiées au 49ème jour post-infection (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

Un dosage de cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10 et IL-17A) a été réalisé dans les surnageants de prolifération cellulaire par cytométrie en flux (BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, BD Biosciences). Aucune cytokine n'a été détectée dans les surnageants (résultats non montrés).

1.3.3. Étude de la réponse humorale

1.3.3.1 L'infection des souris par *Ldi* SENS induit une production d'immunoglobulines G

Les immunoglobulines G totales et les IgG dirigées contre la protéine *LiPSA-50S* ont été quantifiées dans les sérums de toutes les souris et à chaque point de l'étude.

À J7 post-infection, le pourcentage d'IgG dirigées contre la protéine *LiPSA-50S* est faible dans les sérums de toutes les souris (moins de 8%) (Figure 15 A). Dans les sérums des souris contrôles PBS, mais aussi dans les sérums des souris infectées par *Ldi* WT et *Ldi* pTEX, ce pourcentage tend même à

diminuer dans le temps, pour atteindre un taux quasiment nul à J77. En revanche, le pourcentage d'IgG spécifiques augmente dans les sérums des souris infectées par *Ldi* SENS après le 14^{ème} jour post-infection, jusqu'à atteindre un pic à J49.

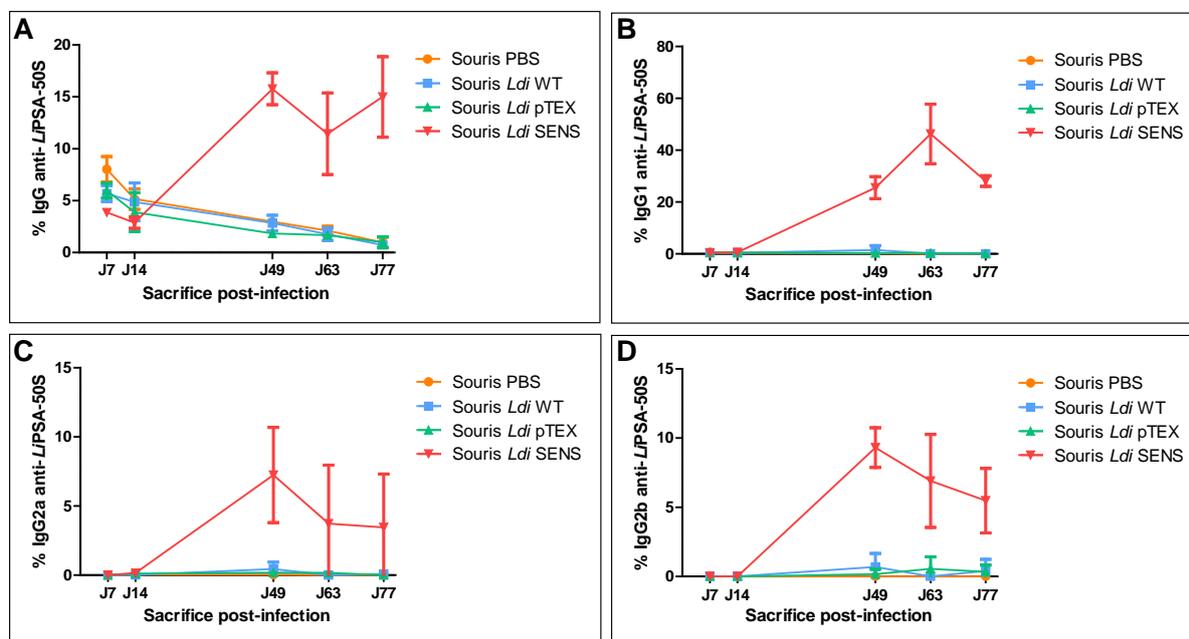


Figure 15. Cinétique du pourcentage d'immunoglobulines G et leurs isotypes dirigées contre la protéine *LiPSA-50S* dans les sérums des souris. Les valeurs représentent le pourcentage moyen (A) d'IgG, (B) IgG1, (C) IgG2a et (D) IgG2b dirigées contre la protéine *LiPSA-50S* dans les différents sérums, pour chaque groupe de souris (souris contrôles ayant reçu du PBS (orange), souris infectées par *Ldi* WT (bleu), *Ldi* pTEX (vert) et *Ldi* SENS (rouge)), à différents temps post-infection, +/- l'écart-type.

Afin de connaître quel(s) isotype(s) est (sont) produit(s) en majorité, les IgG1, IgG2a et IgG2b ont également été quantifiées dans tous les sérums. Les sérums des souris PBS, ainsi que les sérums des souris infectées par *Ldi* WT et *Ldi* pTEX, ne contiennent pas ou très peu d'IgG1 spécifiques (1,49% maximum) (**Figure 15 B**). Les résultats montrent aussi que le pourcentage d'IgG1 anti-*LiPSA-50S* augmente dans les sérums des souris infectées par *Ldi* SENS à partir du 14^{ème} jour post-infection, pour atteindre un taux d'environ 50% à J63. Concernant les IgG2a et IgG2b dirigées contre la protéine *LiPSA-50S*, les taux restent faibles dans les sérums des souris PBS et les sérums des souris infectées par *Ldi* WT et *Ldi* pTEX (moins de 1%). Cependant, les taux d'IgG2a et IgG2b spécifiques augmentent dans les sérums des souris infectées par *Ldi* SENS à partir du 14^{ème} jour post-infection et atteignent un pic à J49 (7 et 9% respectivement) (**Figure 15, C et D**).

Au 49^{ème} jour post-infection, point de l'expérimentation où les sérums contiennent un maximum d'anticorps spécifiques (excepté pour les IgG1 : pic à J63), les concentrations en IgG, IgG1, IgG2a et

IgG2b spécifiques, quantifiés dans les sérums des souris infectées par *Ldi* SENS, révèlent des différences statistiquement significatives avec tous les autres groupes de souris (**Figure 16**).

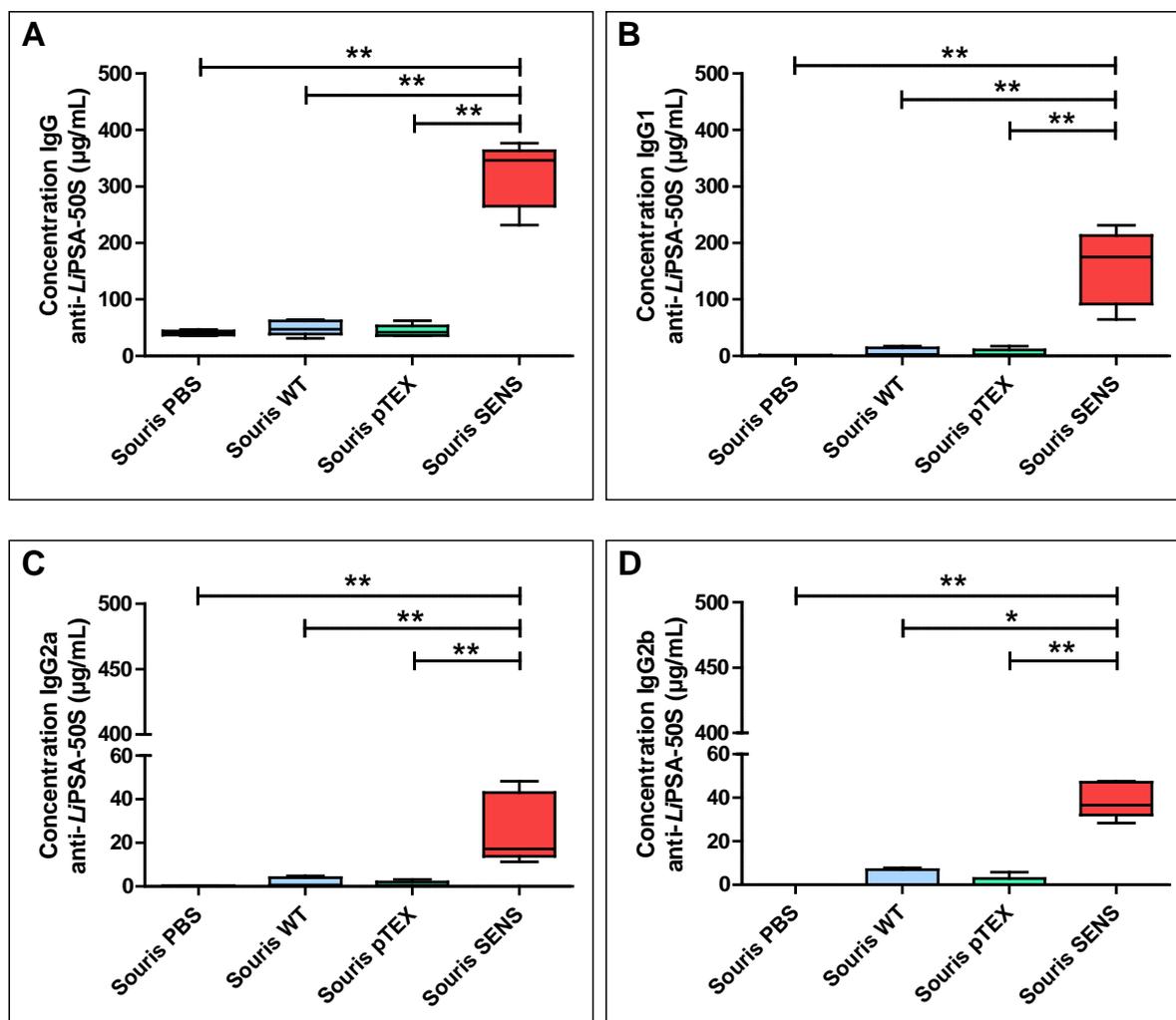


Figure 16. Dosage des immunoglobulines G et leurs isotypes dirigées contre la protéine *LiPSA-50S* dans les sérums des souris. Les valeurs représentent la concentration moyenne (µg/ml) en (A) IgG, (B) IgG1, (C) IgG2a et (D) IgG2b dirigées contre la protéine *LiPSA-50S* dans les différents sérums au 49ème jour post-infection, pour chaque groupe de souris (souris contrôles ayant reçu du PBS (orange), souris infectées par *Ldi* WT (bleu), *Ldi* pTEX (vert) et *Ldi* SENS (rouge)), +/- l'écart-type (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

1.3.3.2 Rôle des anticorps dirigés contre la protéine *LiPSA-50S*

Les sérums des souris infectées par *Ldi* SENS et sacrifiées 49 jours après l'infection contiennent une quantité d'anticorps anti-*LiPSA-50S* significativement plus importante que les sérums des autres groupes de souris. Une étude complémentaire a donc été menée afin de déterminer le rôle de ces anticorps spécifiques.

- **Les anticorps issus des souris infectées par *Ldi* SENS sont capables d'opsoniser les parasites *in vitro* et de faciliter l'internalisation des leishmanies dans les macrophages**

L'infection des macrophages péritonéaux murins par les parasites *Ldi* WT, *Ldi* pTEX et *Ldi* SENS, révèle une augmentation significative de l'indice parasitaire lorsque les parasites sont initialement mis en contact avec les sérums des souris qui leur correspondent ($p < 0,05$) (**Figure 17**). Inversement, lorsque le FcR macrophagique est bloqué, l'indice parasitaire diminue significativement pour toutes les souches, mêmes si ces dernières sont pré-incubées avec les sérums ($p < 0,05$).

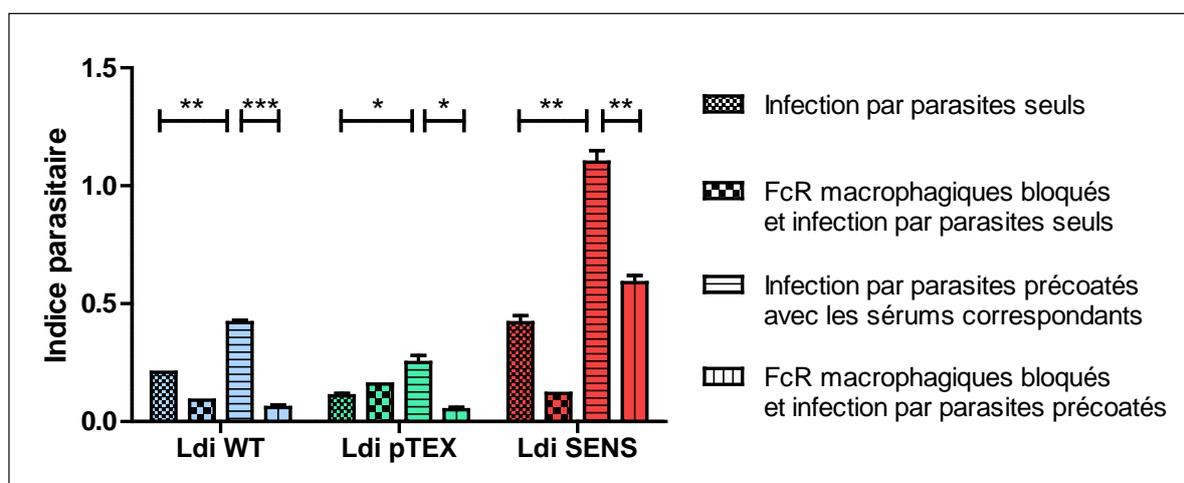


Figure 17. Détermination de la capacité neutralisante ou opsonisante des anticorps sur les parasites, au cours d'une infection expérimentale *in vitro* de macrophages péritonéaux murins. Le graphique représente l'indice parasitaire moyen (rendant compte du pourcentage de macrophages infectés et du nombre d'amastigotes par macrophage) déterminé suite à l'infection de macrophages péritonéaux murins par la souche *Ldi* WT (bleu), *Ldi* pTEX (vert) et *Ldi* SENS (rouge), sous différentes conditions (FcR macrophagiques bloqués et/ou parasites pré-incubés avec les différents sérums de souris), +/- l'écart-type (triplicats) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

- **Les anticorps issus des souris infectées par *Ldi* SENS activent les molécules du complément, induisant la lyse des parasites *in vitro***

Lorsque les promastigotes de *Ldi* WT ou *Ldi* pTEX sont mis en contact, *in vitro*, avec les différents sérums de souris en présence de complément de lapin, aucune différence significative de cytotoxicité n'est observée entre les différents sérums pour un même parasite (**Figure 18**). La seule différence significative est obtenue avec les parasites *Ldi* SENS, lorsqu'ils sont en contact avec les sérums des souris infectées par *Ldi* SENS en présence de complément, apportant une cytotoxicité parasitaire d'environ 13%. Les sérums des souris infectées par la souche surexprimante ne présentent pas d'effets cytotoxiques significatifs sur les promastigotes de *Ldi* WT ou *Ldi* pTEX.

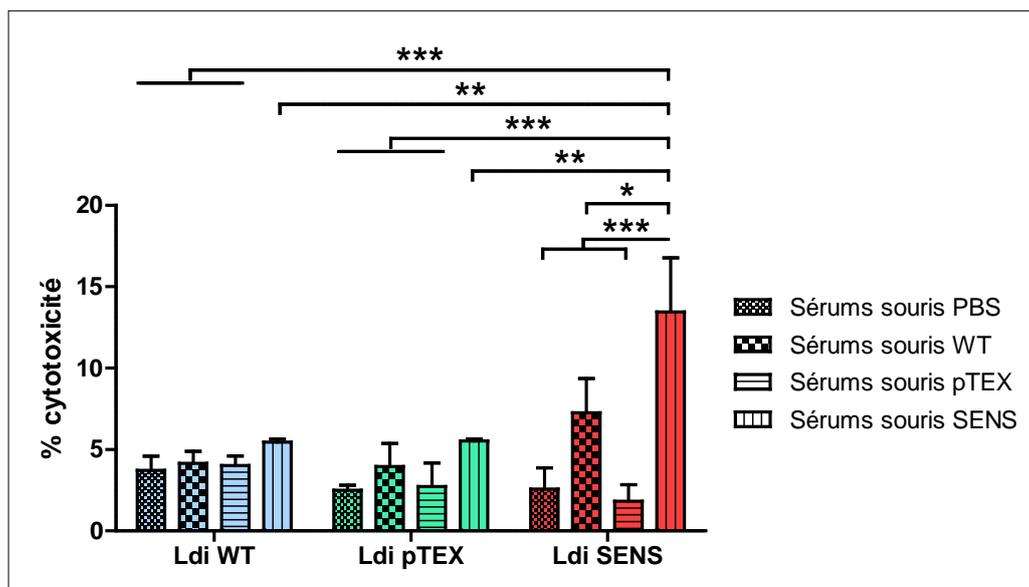


Figure 18. Détermination de la capacité des anticorps à activer les molécules du complément. Analyse de la cytotoxicité dépendante du complément sur les promastigotes de *Ldi* WT, *Ldi* pTEX et *Ldi* SENS en présence de 5% de sérums de souris infectées par les différentes souches parasitaires et de complément de lapin. Les valeurs représentent le pourcentage moyen de cytotoxicité +/- l'écart-type (triplicats) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

1.4. La primo-infection par la souche surexprimant *LiPSA-50S* protège la souris d'une infection expérimentale à *Ldi* WT

Tous les groupes de souris ont subi une épreuve infectieuse à *Ldi* WT 91 jours après la première injection (PBS ou souches parasitaires). Les souris ont été sacrifiées après 70 jours de courses post-challenge (soit 5 mois au total) pour déterminer la charge parasitaire splénique.

Les résultats décrits dans les sections précédentes montrent qu'aucune différence significative n'existe entre une infection par *Ldi* WT et une infection par *Ldi* pTEX, et ce, pour tous les paramètres étudiés. Pour des raisons éthiques (limiter le nombre de souris à explorer), mais aussi pour réduire le coût des expérimentations, le groupe de souris primo-infectées par *Ldi* pTEX et challengées par *Ldi* WT n'a pas été mené. Ainsi, le challenge des souris par la souche sauvage n'a été conduit, dans cette partie, que sur 4 groupes de souris : (1) un groupe contrôle PBS (soit 2 injections de PBS (J0 et J91)), (2) un groupe PBS (injection J0) infecté par *Ldi* WT (challenge J91), (3) un groupe primo-infecté par *Ldi* WT (J0) et challengé par *Ldi* WT (J91), et enfin (4) un groupe primo-infecté par *Ldi* SENS (J0) et challengé par *Ldi* WT (J91).

La charge parasitaire, correspondant au nombre de parasites par gramme de rate, a été déterminée 70 jours après le challenge, soit 5 mois après la primo-infection. Les rates des souris ayant reçu une injection de PBS à J0 puis challengées avec la souche sauvage à J91, présentent une charge

parasitaire moyenne de 13.236 parasites/g de rate, correspondant à une course classique d'infection par *Leishmania infantum* (Figure 19). Les résultats montrent également que l'infection des souris primo-infectées par *Ldi* WT et challengée par cette même souche est exacerbée (charge parasitaire moyenne de 103.540 parasites/g de rate, $p=0,0119$). En revanche, la charge parasitaire des souris primo-infectées par *Ldi* SENS puis challengées par *Ldi* WT reste faible (charge moyenne de 2.610 parasites/g de rate), montrant une différence statistiquement significative avec le groupe de souris primo-infectées par *Ldi* WT ($p=0,0079$) ou ayant reçu du PBS à J0 ($p=0,0119$).

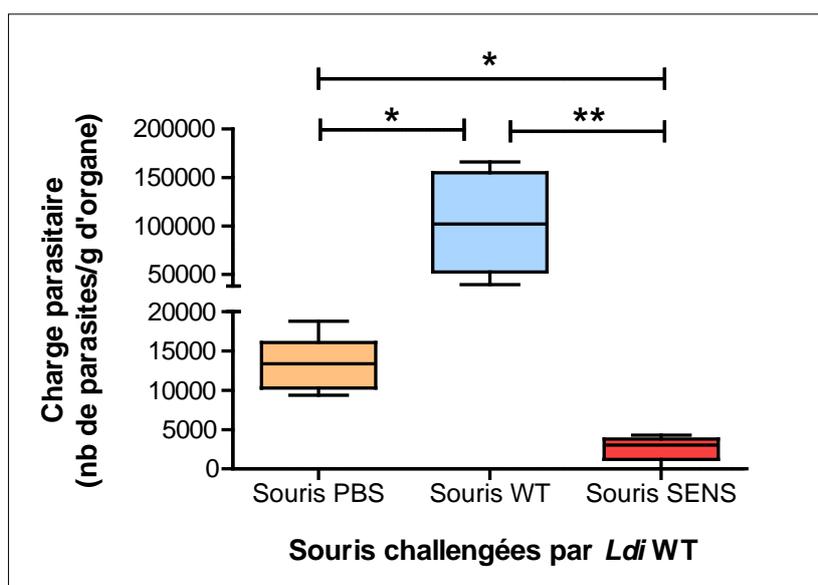


Figure 19. Charge parasitaire des rates des souris primo-infectées par *Ldi* WT et *Ldi* SENS et challengées par *Ldi* WT. Les valeurs représentent le nombre moyen de parasites par gramme de rate pour chaque groupe de souris (souris contrôles ayant reçu du PBS (orange), souris primo-infectées par *Ldi* WT (bleu), souris primo-infectées par *Ldi* SENS (rouge), et sacrifiées 70 jours après une seconde épreuve infectieuse par *Ldi* WT), +/- l'écart-type (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

2. Développement d'un vaccin recombinant de seconde génération

L'utilisation de la protéine native purifiée LaPSA-38S, et sa partie carboxy-terminale, comme candidats vaccins a été envisagée. Un essai de vaccination a donc été mené chez le chien. À l'exception de légères réactions cutanées locales, aucune réaction secondaire indésirable, locale ou générale, n'a été observée chez les chiens vaccinés. Le poids et la température corporelle des chiens sont restés constants durant toute la durée de l'expérimentation. La tolérance générale des chiens aux candidats vaccins a donc été considérée comme satisfaisante.

2.1. L'immunisation des chiens avec les protéines *LaPSA-38S* ou *LaPSA-12S* induit une réponse immunitaire à médiation cellulaire et humorale

2.1.1. L'immunisation des chiens avec les protéines recombinantes induit une réponse immunitaire à médiation cellulaire de type Th1

Les macrophages canins isolés à partir des PBMC (cellules mononucléées du sang périphérique) ont été infectés par une souche de *Leishmania infantum*, puis incubés avec ou sans lymphocytes autologues pendant 72 heures. L'activité leishmanicide des macrophages en co-culture a été évaluée avant immunisation des chiens (T0) et 2 mois après la troisième injection (T5).

À T0, le pourcentage d'inhibition de l'indice parasitaire ne révèle aucune différence entre les trois groupes de chiens (**Figure 20**). Deux mois après la troisième injection, les macrophages issus des chiens immunisés avec *LaPSA-38S* ou *LaPSA-12S*, et co-cultivés avec leurs lymphocytes autologues, confèrent respectivement 86% ($p=0,0033$) et 64% ($p=0,0119$) d'inhibition de l'indice parasitaire, contre seulement 14% pour les macrophages du groupe placebo.

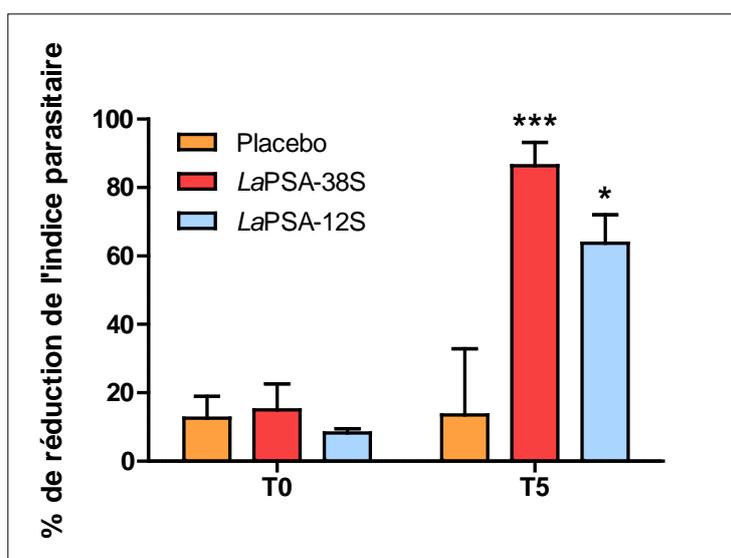


Figure 20. Activité leishmanicide des macrophages issus de chiens immunisés avec *LaPSA-38S*, *LaPSA-12S* ou ayant reçu le placebo, lorsqu'ils sont exposés aux lymphocytes autologues. La capacité des macrophages à tuer les parasites est exprimée en pourcentage d'inhibition de l'indice parasitaire (IP) après infection *in vitro* des macrophages par *Leishmania infantum* et 72h d'incubation avec ou sans lymphocytes autologues. L'activité leishmanicide a été évaluée avant immunisation (T0) et 2 mois après la troisième injection (T5). Les valeurs représentent les moyennes des pourcentages d'inhibition de l'IP par groupe de chiens +/- l'écart-type (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

Les surnageants des macrophages infectés et co-cultivés avec les lymphocytes autologues ont été conservés afin de doser l'accumulation de nitrites, indicatrice de la production de monoxyde d'azote (NO) par les macrophages activés, et de quantifier l'IFN- γ produit par les lymphocytes autologues.

Avant immunisation (T0), la quantité de nitrites dans les surnageants est très faible pour les 3 groupes de chiens (concentrations inférieures à 0,6 nmol/10⁵ cellules) (**Figure 21**). À T5, la concentration en nitrites dans les surnageants du groupe placebo reste faible (0,6 nmol/10⁵ cellules) alors qu'elle s'élève à 20,8 nmol/10⁵ cellules pour le groupe de chiens immunisés avec *LaPSA-38S* ($p=0,001$) et 12,2 nmol/10⁵ cellules pour le groupe de chiens immunisés avec *LaPSA-12S* ($p=0,0079$). De plus, la concentration en nitrites dans les surnageants des chiens du groupe *LaPSA-38S* est statistiquement supérieure à celle des chiens du groupe *LaPSA-12S* ($p=0,012$).

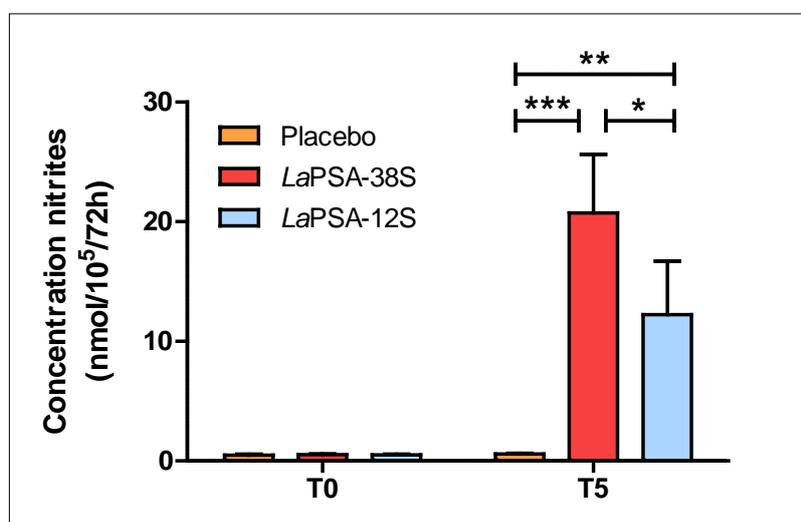


Figure 21. Dosage des nitrites par la réaction de Griess dans les surnageants de co-culture des macrophages canins infectés par *Leishmania infantum* et incubés avec les lymphocytes autologues. Les macrophages sont issus de chiens immunisés avec *LaPSA-38S*, *LaPSA-12S* ou ayant reçu le placebo. L'accumulation de nitrites dans les surnageants est utilisée comme indicateur de production de NO par les macrophages activés. La quantité de nitrites est évaluée dans les surnageants d'activité leishmanicide avant immunisation (T0) et 2 mois après la troisième injection (T5). Les valeurs représentent les concentrations moyennes de nitrites par groupe de chiens +/- l'écart-type (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

Concernant le taux d'IFN- γ , les concentrations sont très faibles dans les surnageants des co-cultures macrophagiques issues des trois groupes de chiens avant immunisation (concentrations moyennes inférieures à 0,06 ng/ml à T0) (**Figure 22**). En revanche, à T5, une augmentation significative de la concentration d'IFN- γ a été décelée dans les surnageants des co-cultures macrophagiques issues des chiens immunisés avec *LaPSA-38S* (concentration moyenne de 1,98 ng/mL, $p=0,0010$) et *LaPSA-12S* (concentration moyenne de 2 ng/mL, $p=0,0079$) alors qu'elle reste très faible pour le groupe placebo (0,06 ng/mL).

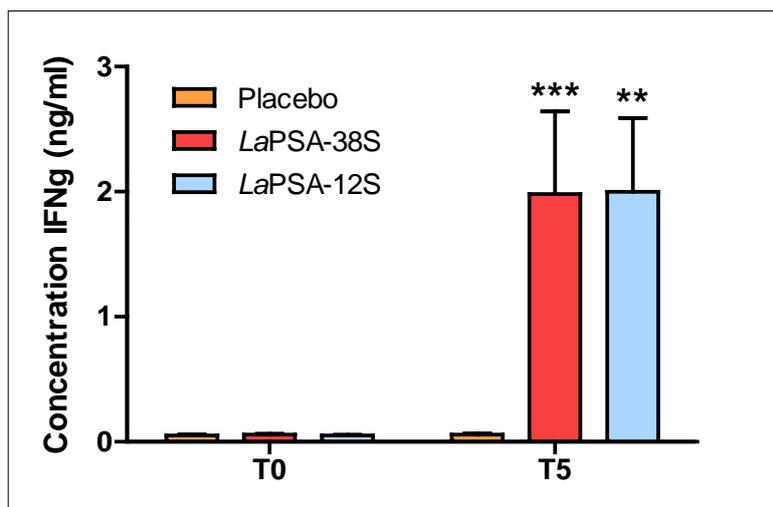


Figure 22. Dosage de l'IFN-g par ELISA dans les surnageants de co-culture des macrophages canins infectés par *Leishmania infantum* et incubés avec les lymphocytes autologues. Les cellules sont issues de chiens immunisés avec *LaPSA-38S*, *LaPSA-12S* ou ayant reçu le placebo. La quantité d'IFN-g est évaluée dans les surnageants d'activité leishmanicide avant immunisation (T0) et 2 mois après la troisième injection (T5). Les valeurs représentent les concentrations moyennes d'IFN-g par groupe de chiens +/- l'écart-type (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

2.1.2. L'immunisation des chiens avec les protéines recombinantes induit la production d'anticorps spécifiques

2.1.2.1 Détection des IgG2 dirigées contre *LiESAp* et les protéines *LaPSA-38S* et *LaPSA-12S*

Une analyse sérologique par ELISA a été entreprise afin de détecter la présence d'anticorps d'isotype IgG2, dirigés contre les protéines totales excrétées-sécrétées par *Leishmania infantum* (*LiESAp*, principal constituant du vaccin Canileish®), la protéine *LaPSA-38S* ou la protéine *LaPSA-12S*, dans les sérums des chiens vaccinés et placebo à différents temps : avant vaccination (T0), 1 mois après la seconde injection (T3) et 2 mois après la troisième injection (T5).

Avant immunisation, les résultats des différents tests ELISA ne présentent aucune différence significative entre les sérums des 3 groupes de chiens (**Figure 23**). Un mois après la seconde injection (T3), des IgG2 dirigées contre *LiESAp* sont détectés dans les sérums des chiens vaccinés avec la protéine *LaPSA-38S*, contrairement aux sérums des chiens vaccinés avec *LaPSA-12S* ou ayant reçu le placebo ($p=0,0420$). Des IgG2 dirigées contre *LaPSA-38S* et *LaPSA-12S* sont également détectés dans les sérums des chiens vaccinés avec *LaPSA-38S* ($p=0,0033$ et $p=0,0010$, respectivement) ou avec *LaPSA-12S* ($p=0,0119$ et $p=0,0079$, respectivement). Enfin, 2 mois après la troisième injection (T5), une augmentation significative des IgG2 anti-*LiESAp*, anti-*LaPSA-38S* et anti-*LaPSA-12S*, est

également détectée dans les sérums de tous les chiens vaccinés, alors que le taux d'IgG2 reste faible dans le groupe placebo.

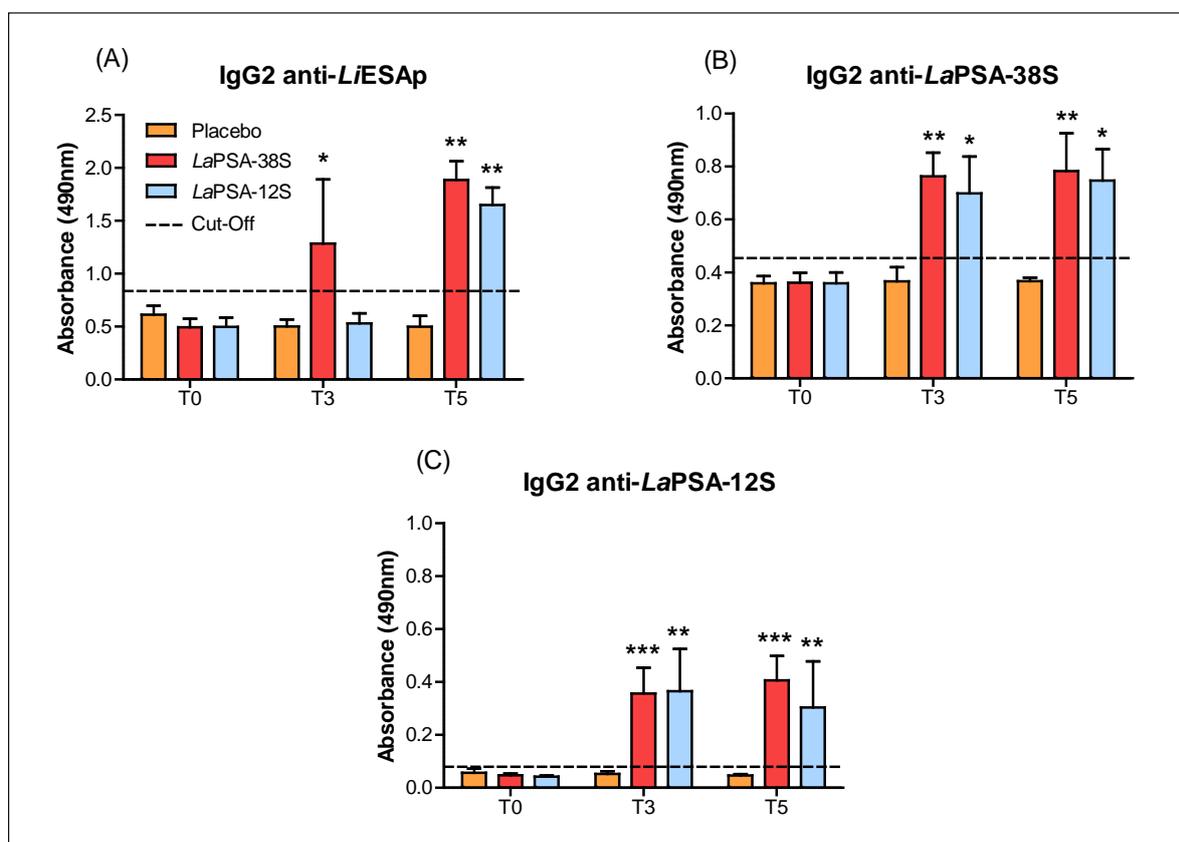


Figure 23. Réponses sérologiques détectées par technique ELISA. Evolution du taux d'anticorps IgG2 dirigés contre (A) les antigènes excrétés-sécrétés par *Leishmania infantum* (LiESAp), (B) la protéine LaPSA-38S et (C) la protéine LaPSA-12S, dans les sérums des chiens immunisés avec LaPSA-38S (rouge), LaPSA-12S (bleu) ou ayant reçu le placebo (orange), avant immunisation (T0) et à différents temps post-immunisation : 1 mois après la seconde injection (T3) et 2 mois après la troisième injection (T5). Chaque sérum a été testé en triplicat. Le *cut off* du test ELISA correspond à la moyenne des DO de tous les échantillons à T0 + 3 écart-types. Les valeurs représentent la moyenne des DO +/- l'écart-type (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

2.1.2.2 Les anticorps produits inhibent la prolifération *in vitro* des promastigotes de *L. infantum*

Les parasites ont été incubés 30 minutes avec les sérums des chiens prélevés à différents temps (avant immunisation, T0, et 2 mois après la troisième injection, T5), puis mis en culture pendant 3 jours. Le comptage des parasites vivants par cytométrie en flux montre qu'avec les sérums à T0, le pourcentage d'inhibition de la croissance parasitaire est faible (moins de 7%) (Figure 24). En revanche, après incubation avec les sérums des chiens immunisés avec LaPSA-38S et LaPSA-12S à T5,

78% ($p=0,0010$) et 77% ($p=0,0079$) d'inhibition de la croissance parasitaire sont observés respectivement, contre seulement 9% avec les sérums des chiens placebo.

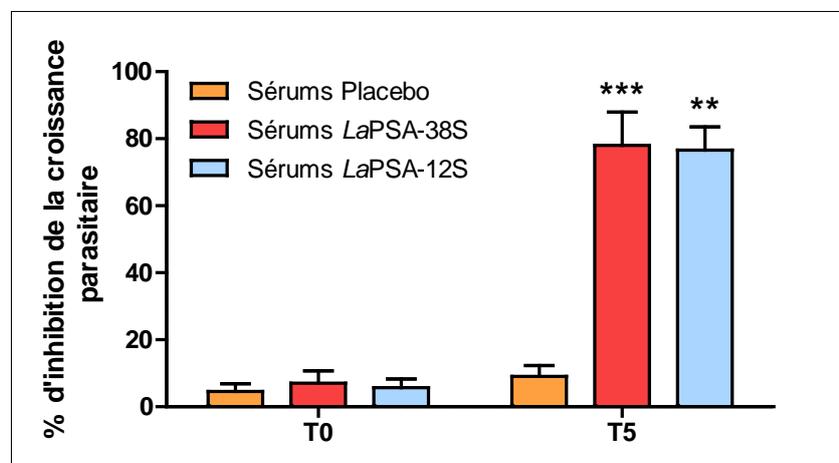


Figure 24. Effet des sérums des chiens immunisés sur la croissance parasitaire. Détermination du pourcentage d'inhibition de la croissance parasitaire par cytométrie en flux, suite à l'incubation, pendant 30 minutes, des parasites *Leishmania infantum* avec les différents sérums des chiens immunisés avec LaPSA-38S, LaPSA-12S ou ayant reçu le placebo puis cultivés pendant 3 jours en milieu complet. Les sérums testés ont été prélevés à différents temps : avant immunisation des chiens (T0) et 2 mois après la troisième injection (T5). Les valeurs représentent la moyenne du pourcentage d'inhibition de la croissance parasitaire +/- l'écart-type, par groupe de sérums de chiens (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

2.2. L'immunisation avec les protéines recombinantes protège les chiens d'une infection expérimentale à *L. infantum*

Les chiens ont été infectés par injection de 5.10^8 promastigotes de *Leishmania infantum*. Le suivi parasitologique après challenge a été effectué de deux façons : une analyse qualitative par culture des prélèvements de moelle osseuse sur milieux NNN et une analyse quantitative par qPCR.

La présence de parasites vivants a été mise en évidence par l'observation microscopique des sous-cultures des prélèvements de moelle osseuse, isolés à partir des chiens ayant reçu le placebo ou vaccinés avec la protéine LaPSA-38S ou la protéine LaPSA-12S, avant épreuve infectieuse (T0) et à différents temps post-challenge (2, 4 et 6 mois). Avant challenge et deux mois après l'épreuve infectieuse, aucun chien n'a présenté de culture parasitaire positive (**Figure 25 A**). 4 mois après challenge, des parasites ont été visualisés dans les prélèvements de certains chiens, mais aucune différence statistique n'a été décelée entre les 3 groupes. En revanche, 6 mois après challenge, le pourcentage de chiens présentant une culture parasitaire positive est nettement inférieur dans le groupe vacciné avec LaPSA-38S (22%, $p=0,0053$) et dans le groupe vacciné avec LaPSA-12S (20%, $p=0,0098$), par rapport au groupe placebo (100%).

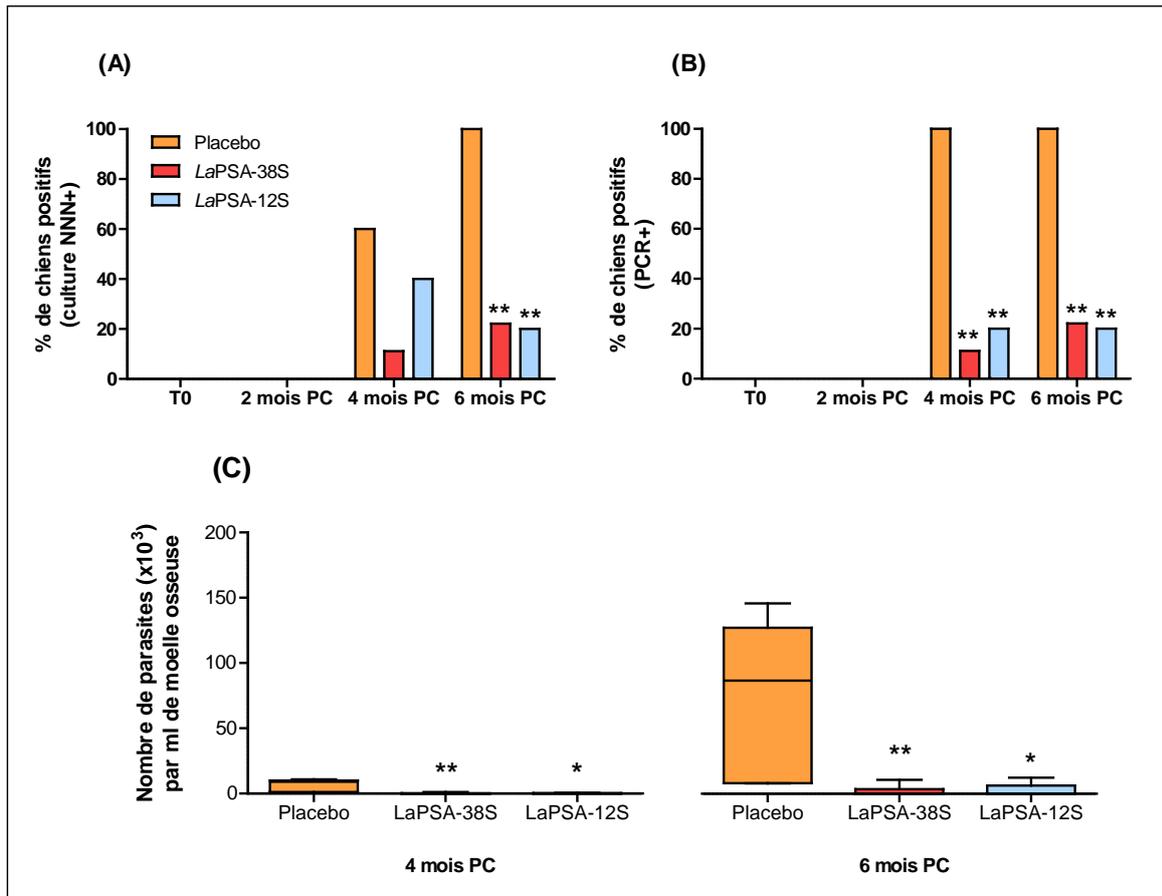


Figure 25. Suivi parasitologique des chiens immunisés avec les protéines *LaPSA-38S* (rouge) ou *LaPSA-12S* (bleu) ou ayant reçu le placebo (orange) à partir de prélèvements de moelle osseuse avant infection expérimentale (T0) ou à différents temps post-challenge (PC) (2, 4 et 6 mois). (A) Analyse microscopique des cultures de prélèvements de moelle osseuse. Un chien est considéré comme positif lorsque les parasites sont détectés au moment de l'ensemencement ou de la sous-culture. (B) Détection de la présence d'ADN de leishmanies. Les chiens sont considérés comme positifs lorsque le titre est supérieur à 40 parasites/ml. (C) Quantification de l'ADN de leishmanies. Les valeurs sont exprimées en nombre moyen de parasites par ml de moelle osseuse (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Comme pour la mise en culture en milieu NNN, aucun chien n'a été détecté positif par qPCR à T0 et 2 mois après l'épreuve infectieuse (**Figure 25 B**). A partir du 4^{ème} mois après challenge, de l'ADN parasite a été détecté dans certains prélèvements de moelle osseuse. En effet, 11% ($p=0,0013$) et 20% ($p=0,0098$) des chiens vaccinés avec la protéine *LaPSA-38S* et *LaPSA-12S* respectivement ont été détectés positifs en qPCR, contre 100% dans le groupe placebo. Six mois après l'épreuve infectieuse, le pourcentage de chiens positifs reste faible dans le groupe vaccinés avec *LaPSA-38S* (22%, $p=0,0053$) et dans le groupe *LaPSA-12S* (20%, $p=0,0098$), en comparaison avec le groupe placebo (100%).

La quantification de l'ADN parasite montre des valeurs moyennes de charge parasite significativement plus faibles dans les groupes de chiens vaccinés avec *LaPSA-38S* ($p=0,019$ et $0,004$)

et *LaPSA-12S* ($p=0,018$ et $0,031$) que dans le groupe placebo à 4 et 6 mois post-challenge, respectivement (**Figure 25 C**).

Ces résultats ont fait l'objet d'un dépôt de brevet (n° WO2015079420, [136], **Annexe 5**) et ont été soumis au journal PLOS Neglected Tropical Diseases (**Annexe 6**).

3. Développement d'un vaccin peptidique

L'utilisation de peptides dessinés à partir de la protéine *LaPSA-12S* comme candidats vaccins a été envisagée. Un essai de vaccination a donc été entrepris chez le chien. À l'exception de légères réactions cutanées locales, aucune réaction secondaire indésirable, locale ou générale, n'a été observée chez les chiens vaccinés. Le poids et la température corporels des chiens sont restés constants durant toute la durée de l'expérimentation. La tolérance générale du candidat vaccin chez les chiens a donc été considérée comme satisfaisante.

3.1. L'immunisation des chiens avec les peptides induit une réponse immunitaire à médiation cellulaire et humorale

3.1.1. L'immunisation des chiens avec les peptides induit une réponse immunitaire à médiation cellulaire de type Th1

Les macrophages canins isolés à partir des PBMC ont été infectés par une souche de *Leishmania infantum*, puis incubés avec ou sans lymphocytes autologues pendant 72 heures. L'activité leishmanicide des macrophages en co-culture a été évaluée avant immunisation des chiens (T0), et 2 mois (T2), 3 mois (T3) et 4 mois (T4) après la troisième injection vaccinale.

À T0, le pourcentage d'inhibition de l'indice parasitaire ne révèle aucune différence entre les chiens vaccinés et le groupe placebo (**Figure 26**). En revanche, les macrophages issus des chiens immunisés avec les peptides et co-cultivés avec leurs lymphocytes autologues, confèrent plus de 60% d'inhibition de l'indice parasitaire à tous les temps après vaccination (à T2 ($p=0,0040$), à T3 ($p=0,0016$) et à T4 ($p=0,0010$)), contre seulement 27% pour les macrophages du groupe placebo.

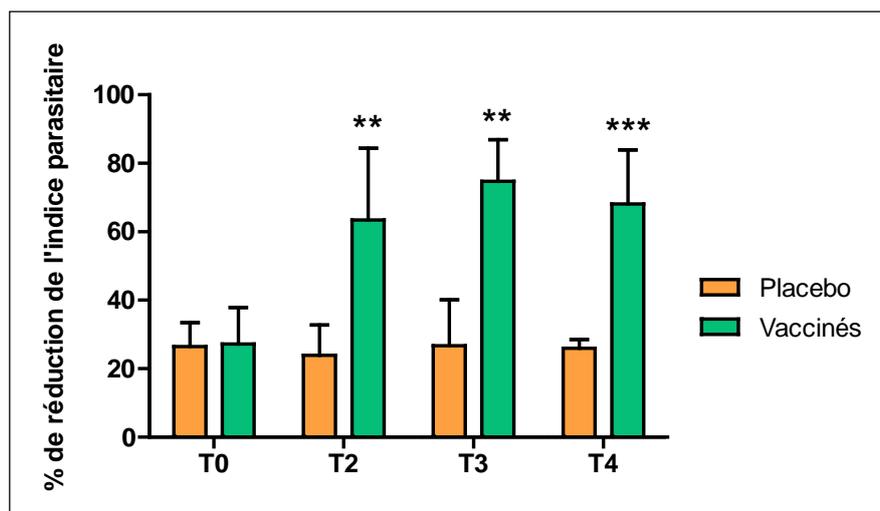


Figure 26. Activité leishmanicide des macrophages, issus de chiens immunisés avec les peptides issus de *LaPSA-12S* ou ayant reçu le placebo, lorsqu'ils sont exposés aux lymphocytes autologues. La capacité des macrophages à tuer les parasites est exprimée en pourcentage d'inhibition de l'indice parasitaire (IP) après infection *in vitro* des macrophages par *Leishmania infantum* et 72h d'incubation avec ou sans lymphocytes autologues. L'activité leishmanicide a été évaluée avant immunisation (T0) et à 2 mois (T2), 3 mois (T3) et 4 mois (T4) après la troisième injection. Les valeurs représentent les moyennes des pourcentages d'inhibition de l'IP par groupe de chiens +/- l'écart-type (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Les surnageants des macrophages infectés et co-cultivés avec les lymphocytes autologues ont été conservés afin de quantifier l'IFN- γ produit par les lymphocytes autologues et les nitrites produits par les macrophages activés.

Avant immunisation, les concentrations en IFN- γ sont très faibles dans les surnageants des co-cultures macrophagiques issues des chiens inclus dans le groupe vacciné (0,029 ng/mL) ou inclus dans le groupe placebo (0,042 ng/mL) (**Figure 27**). Deux mois après la 3^{ème} injection, une augmentation significative de la concentration d'IFN- γ a été décelée dans les surnageants des co-cultures macrophagiques issues des chiens vaccinés (concentration moyenne de 2 ng/mL, $p = 0,0033$) alors qu'elle reste très faible pour le groupe placebo (0,050 ng/mL).

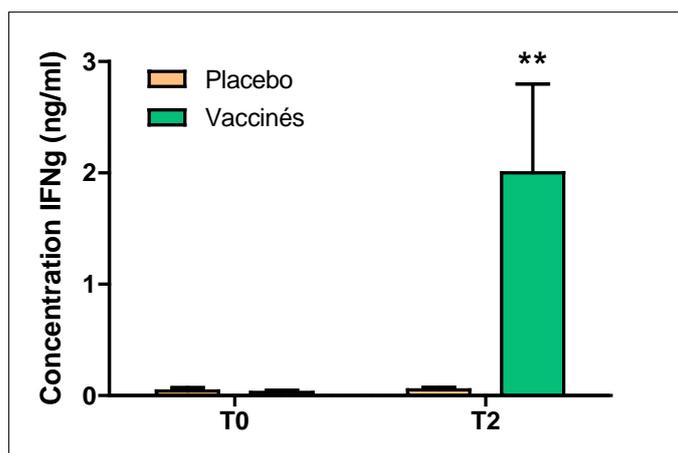


Figure 27. Dosage de l'IFN-g par ELISA dans les surnageants de co-culture des macrophages canins infectés par *Leishmania infantum* et incubés avec les lymphocytes autologues. Les cellules sont issues des chiens immunisés avec les peptides issus de la protéine LaPSA-12S ou ayant reçu le placebo. La quantité d'IFN-g est évaluée dans les surnageants d'activité leishmanicide avant immunisation (T0) et 2 mois après la troisième injection (T2). Les valeurs représentent les concentrations moyennes d'IFN-g par groupe de chiens +/- l'écart-type (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Comme pour la concentration en IFN- γ , la concentration en nitrites est faible dans les surnageants de des macrophages en co-culture issus de tous les chiens inclus dans l'étude (concentration moyenne de 4,82 nmol pour 10^5 macrophages) (**Figure 28**). En revanche, 2 mois après la troisième injection, la concentration en nitrites est significativement plus élevée ($p = 0,001$) dans les surnageants des macrophages issus des chiens vaccinés (13,398 nmol +/- 1,542), alors qu'elle reste faible dans les surnageants des macrophages issus du groupe placebo (5,8 nmol +/- 0,732).

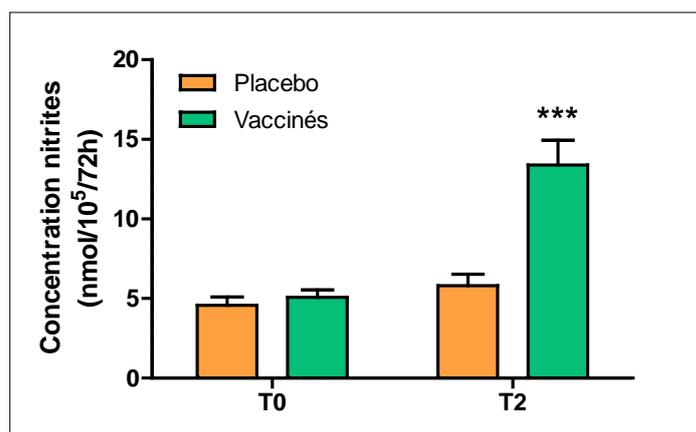


Figure 28. Dosage des nitrites par la réaction de Griess dans les surnageants de co-culture des macrophages canins infectés par *Leishmania infantum* et incubés avec les lymphocytes autologues. Les macrophages sont issus de chiens immunisés avec les peptides issus de la protéine LaPSA-12S (vert) ou ayant reçu le placebo (orange). L'accumulation de nitrites dans les surnageants est utilisée comme indicateur de production de NO par les macrophages activés. La quantité de nitrites est évaluée dans les surnageants d'activité leishmanicide avant immunisation (T0) et 2 mois après la troisième injection (T2). Les valeurs représentent les concentrations moyennes de nitrites par groupe de chiens +/- l'écart-type (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3.1.2. L'immunisation des chiens avec les peptides induit la production d'anticorps spécifiques

Une analyse sérologique par ELISA a été réalisée afin de détecter la présence d'anticorps d'isotype IgG2, dirigés contre les protéines totales excrétées-sécrétées par *Leishmania infantum* (LiESAp) et le peptide E34PC (épitope B impliqué dans la réponse vaccinale chez le chien), dans les sérums des chiens vaccinés et ayant reçu le placebo, à différents temps : avant vaccination (T0), 2 mois (T2) et 3 mois (T3) après la dernière injection.

Avant immunisation (T0), aucun chien de l'étude ne présente de réponse anticorps positive, que ce soit contre LiESAp (Figure 29 A) ou le peptide E34PC (Figure 29 B). Tous les chiens appartenant au groupe placebo présentent des résultats d'absorbance inférieurs à la valeur du cut off, quel que soit le temps de prélèvement (T2 et T3). En revanche, des IgG2 dirigées contre LiESAp et contre le peptide E34PC ont été détectées 2 mois après la dernière immunisation (T2) ($p=0,0025$ et $p=0,0027$, respectivement). À ce temps de prélèvement, 70% des chiens sont positifs à une réponse anticorps spécifique dirigée contre LiESAp, et 100% des chiens sont positifs contre le peptide E34PC. À T3, le taux d'anticorps d'isotype IgG2 dirigés contre LiESAp augmente encore légèrement ($p=0,0057$) et la réponse IgG2 anti-E34PC persiste chez tous les chiens vaccinés ($p=0,0007$).

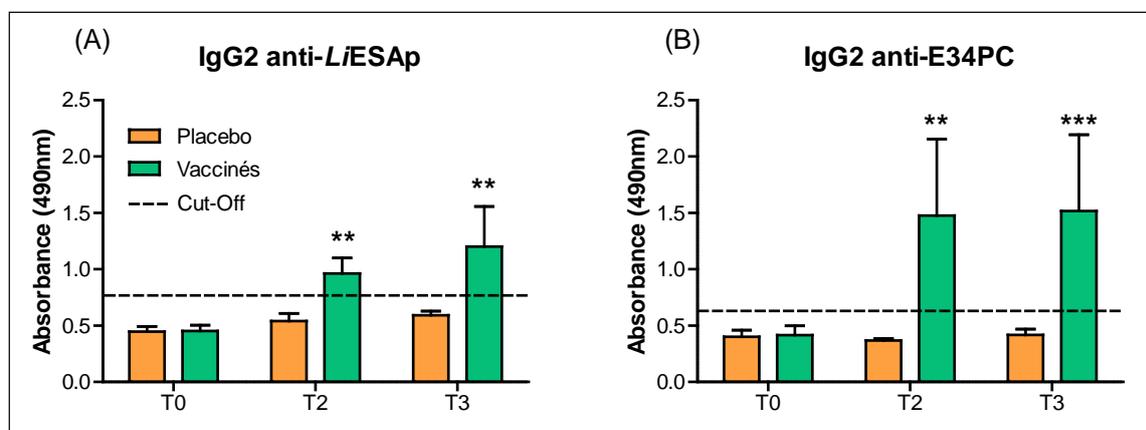


Figure 29. Réponses sérologiques détectées par technique ELISA. Evolution du taux d'anticorps IgG2 dirigés contre (A) les antigènes excrétés-sécrétés par *Leishmania infantum* (LiESAp) et (B) le peptide E34PC, dans les sérums des chiens immunisés avec les peptides issus de la protéine LaPSA-12S (vert) ou ayant reçu le placebo (orange), avant immunisation (T0) et à différents temps post-immunisation : 2 mois (T2) et 3 mois (T3) après la dernière injection. Chaque sérum a été testé en triplicat. Le cut off du test ELISA correspond à la moyenne des DO de tous les échantillons à T0 + 3 écart-types. Les valeurs représentent la moyenne des DO +/- l'écart-type (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

3.2. L'immunisation avec les peptides protège les chiens d'une infection expérimentale à *L. infantum*

Les chiens ont été infectés par injection de 5.10^8 promastigotes de *Leishmania infantum*. Comme pour l'essai de vaccination avec les protéines recombinantes, le suivi parasitologique après challenge a été effectué de deux façons : une analyse qualitative par culture des prélèvements de moelle osseuse sur milieux NNN, et une analyse quantitative par qPCR.

La présence de parasites vivants a été mise en évidence par l'observation microscopique des sous-cultures des prélèvements de moelle osseuse, isolés à partir des chiens ayant reçu le placebo ou vaccinés avec les peptides issus de la protéine LaPSA-12S, avant épreuve infectieuse (T0) et à différents temps post-challenge (2, 4 et 6 mois). Le suivi parasitologique à T0 permet de montrer que l'ensemble des chiens entrés dans l'étude étaient indemnes de leishmanies avant l'épreuve infectieuse expérimentale (**Figure 30 A**). À 2 mois et 4 mois post-challenge, aucune différence significative n'est observée entre le groupe de chiens vaccinés et le groupe placebo. C'est à 6 mois après l'épreuve infectieuse que les cultures de prélèvements de moelle osseuse sont retrouvées positives chez tous les chiens du groupe placebo (100%), alors que seulement 30% des chiens vaccinés sont positifs ($p=0,0256$).

Comme pour la mise en culture en milieux NNN, aucun chien n'a été détecté positif par qPCR à T0 (**Figure 30 B**). A partir du 2^{ème} mois après l'épreuve infectieuse expérimentale, de l'ADN parasitaire a été détecté dans certains prélèvements de moelle osseuse. Cependant, aucune différence statistiquement significative n'a été trouvée entre le groupe de chiens vaccinés et le groupe placebo à 2 mois et 4 mois post-challenge. Six mois après l'épreuve infectieuse, de l'ADN parasitaire a été décelé chez tous les chiens du groupe placebo, et seulement chez 40% des chiens vaccinés ($p=0,0253$). La quantification de l'ADN parasitaire montre des valeurs moyennes de charge parasitaire significativement plus faibles chez les chiens vaccinés détectés positifs par PCR (seulement 4 chiens sur 10, concentration moyenne de $57,10^3$ parasites/mL, $p=0,0095$) que dans le groupe placebo (où 100% des chiens sont PCR positive avec une concentration moyenne de 1.182.000 parasites/mL), 6 mois après le challenge (**Figure 30 C**).

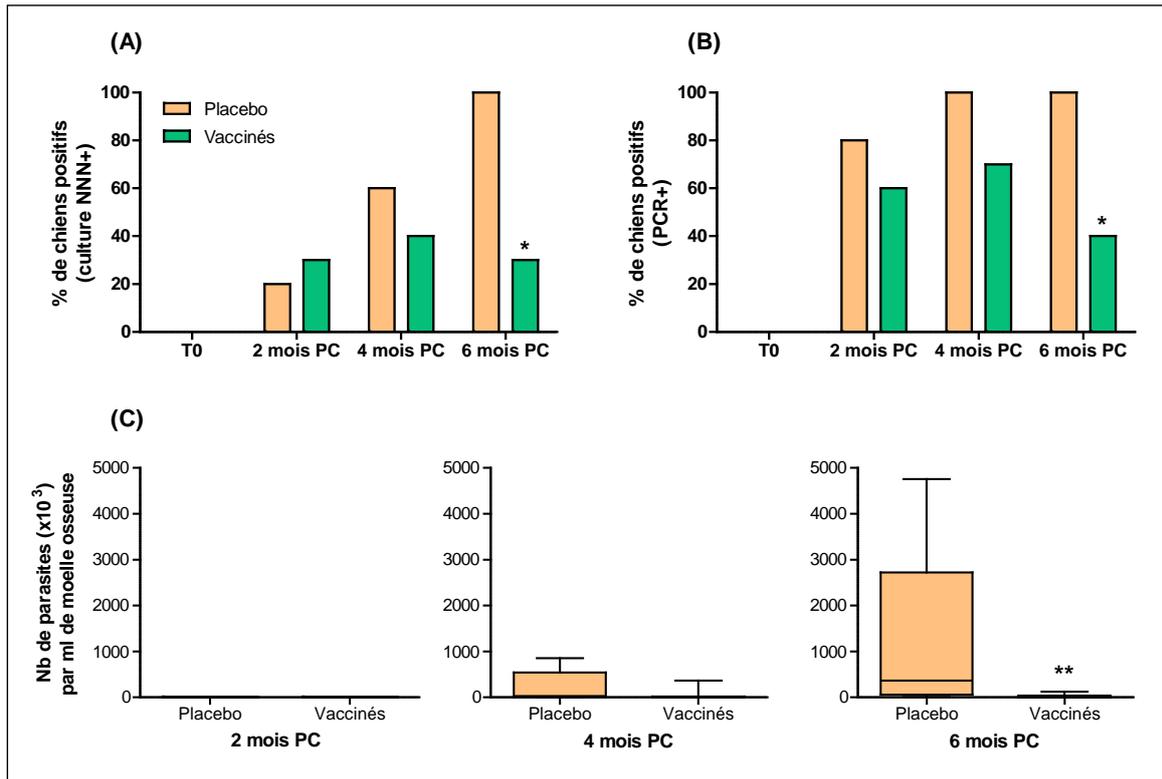


Figure 30. Suivi parasitologique des chiens immunisés avec les peptides issus de la protéine LaPSA-12S (vert) ou ayant reçu le placebo (orange) à partir de prélèvements de moelle osseuse avant infection expérimentale (T0) ou à différents temps post-challenge (PC) (2, 4 et 6 mois). (A) Analyse microscopique des cultures de prélèvements de moelle osseuse. Un chien est considéré comme positif lorsque les parasites sont détectés au moment de l'ensemencement ou de la sous-culture. (B) Détection de la présence d'ADN de leishmanies. Les chiens sont considérés comme positifs lorsque le titre est supérieur à 40 parasites/ml. (C) Quantification de l'ADN de leishmanies. Les valeurs sont exprimées en nombre moyen de parasites par ml de moelle osseuse (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Discussion

La leishmaniose viscérale (LV) est la forme la plus grave de la maladie car létale en l'absence de traitement ou en cas d'échec du traitement. Elle affecte l'Homme mais également la population canine dans de nombreuses régions du monde. Le chien représente le principal hôte réservoir naturel à *Leishmania infantum*/*L. chagasi* et entretient ainsi la continuité du cycle de transmission. On estime qu'au moins 2,5 millions de chiens sont infectés dans le sud-ouest de l'Europe [137]. Les chiens symptomatiques et asymptomatiques sont infectieux pour l'insecte vecteur et sont impliqués dans la transmission de la LV à l'Homme [9]. La vaccination tant humaine qu'animale pourrait être l'outil le plus prometteur pour la prévention et le contrôle de la leishmaniose, et pourrait réduire la transmission de cette maladie au sein des populations endémiques. À ce jour et malgré de nombreuses recherches, **aucun vaccin contre les leishmanioses humaines n'a pu être mis au point**. Les premières tentatives de vaccination ont été réalisées en utilisant des parasites atténués ou tués, mais les résultats de ces essais se sont avérés décevants sur le terrain [138]. Depuis, des efforts considérables ont été accomplis sur la sélection d'antigènes leishmaniens comme candidats vaccins et sur la recherche d'adjuvants [128, 139].

Les deux formes du parasite, promastigote (forme extracellulaire) et amastigote (forme intracellulaire), produisent des complexes glycoconjugués qui sont dirigés vers la surface du parasite [140, 141] ou excrétés/sécrétés [142, 143]. Les **antigènes excrétés/sécrétés** (AES) représentent des cibles privilégiées pour le système immunitaire. Il a ainsi été montré que des protéines issues des surnageants de culture de promastigotes de *Leishmania* peuvent induire une forte réponse immunitaire et un excellent taux de protection à l'encontre d'une infection expérimentale par *Leishmania major* chez la souris BALB/c [144]. De plus, dans d'autres modèles infectieux, certains exoantigènes de pathogènes intracellulaires, tels que *Mycobacterium tuberculosis* ou encore *Toxoplasma gondii*, se sont révélés être très immunogènes et pouvaient conférer un certain degré de protection dans des modèles de vaccination [145, 146]. Cependant, peu d'études ont été réalisées sur les AES des leishmanies et sur leur rôle lors de l'infection parasitaire, et ceci principalement en raison de la complexité de leur isolement à partir de milieux de culture non définis. Cependant, la réalisation *in vitro* du cycle de développement parasitaire des leishmanies a été rendue possible par la mise au point de milieux axéniques [147] et asériques [116] complètement définis dans notre laboratoire [128]. En effet, ces milieux permettent l'accès à une quantité relativement importante de facteurs naturellement excrétés/sécrétés par les leishmanies en concentrant les surnageants de culture et ce, sans contamination avec des protéines étrangères. Cette technologie est particulièrement intéressante pour la recherche à visée thérapeutique. Elle permet l'obtention de molécules parasitaires solubles de conformation native qui peuvent être utilisées comme candidats vaccins contre la leishmaniose. En effet, la conformation des antigènes est importante pour la

génération d'anticorps, mais il a également été montré qu'elle joue un rôle majeur dans l'induction d'une immunité à médiation cellulaire T et doit être prise en compte dans la conception de vaccins anti-leishmaniose [148]. Les modifications post-traductionnelles et la structure tridimensionnelle (repliement des protéines) peuvent-être importantes non seulement dans l'induction d'anticorps neutralisants, mais aussi dans le développement d'une réponse protectrice T CD4+.

Ces dernières années, des vaccins canins composés de produits d'excrétion-sécrétion des leishmanies ont été testés sur le terrain. Seuls deux vaccins canins ont obtenus de bons résultats dans des essais de phase III (essais d'efficacité) : (1) **Leishmune**[®] (Fort Dog Animal Health), préparé à partir d'une glycoprotéine de *Leishmania donovani* (mannose fucose ligand) adjuvée avec du QS-21 (saponines de *Quillajasaponaria*) a été mis sur le marché au Brésil [112], et (2) **CaniLeish**[®] (Virbac Animal Health), composé des AES de *Leishmania infantum* formulés avec du QA-21, a été commercialisé en Europe [118, 120]. Cependant, d'un point de vue industriel, la culture des parasites et l'extraction des antigènes solubles sont particulièrement difficiles à mettre en œuvre à bas prix dans les zones d'endémie. Beaucoup d'antigènes de *Leishmania* ont été décrits comme des candidats vaccins prometteurs et sont disponibles sous forme recombinante [149, 150]. Mais très peu de candidats vaccins ont avancé au-delà du stade expérimental chez la souris ou le hamster. Seul le vaccin **LeishTec**[®], composé de l'antigène A2, confère chez le chien une protection d'environ 40% à l'encontre d'une infection expérimentale par des promastigotes de *Leishmania infantum chagasi* [151], et a été enregistré au Brésil comme vaccin canin (Hertape Calier). Plusieurs autres candidats vaccins de seconde génération ont été testés chez le chien, donnant des résultats moins prometteurs. La protéine de fusion Leish-111f, contenant les antigènes TSA, LmSTI1 et LeIF de *L. major*, formulée avec AdjuPrime, était immunogène chez les chiens expérimentalement infectés avec *L. chagasi* [152] et *L. infantum* [153], mais n'a pas été efficace contre une infection naturelle dans un essai en chenil ouvert [154]. Une préparation vaccinale à base de cystéine-peptidases et d'IL-12 recombinantes a également été infructueuse dans la protection des chiens contre une infection à *L. infantum* [155].

Un anticorps monoclonal de souris (F5) a été produit dans notre laboratoire par immunisation avec les AES de *L. amazonensis*. Cet anticorps F5 est capable de reconnaître les cibles antigéniques provenant à la fois des AES des promastigotes de *L. amazonensis* et de *L. infantum*. Grâce à cet anticorps, nous avons pu identifier **l'immunogène majeur des AES de *Leishmania amazonensis*, la protéine LaPSA-38S**, et l'immunogène majeur des AES de *Leishmania infantum*, **la protéine LiPSA-50S**, toutes deux appartenant à la famille des PSA (Promastigote Surface Antigen).

Nous avons donc souhaité, dans un premier temps, étudier le rôle biologique fonctionnel de la protéine *LiPSA-50S*, l'immunogène majeur du vaccin CaniLeish®. Pour cela, le parasite *Leishmania infantum* surexprimant la protéine *LiPSA-50S* a été conçu au laboratoire. Les résultats montrent que l'ARN codant la protéine *LiPSA-50S* est 67 fois plus exprimé chez la souche surexprimant *LiPSA-50S* (*Ldi SENS*) que chez la souche transfectée avec le plasmide vide (*Ldi pTEX*) ou la souche sauvage (*Ldi WT*). La protéine traduite est par ailleurs retrouvée surexprimée à la fois au niveau de la membrane, mais aussi dans les surnageants de culture de la souche *Ldi SENS* (3.5 fois plus que *Ldi WT*). Une fois cet outil validé, l'étude de la répercussion de ces changements génétiques sur le pouvoir infectieux des parasites a été rendue possible, dans un premier temps *in vitro* vis-à-vis de macrophages péritonéaux murins, puis *in vivo* dans un modèle d'infection expérimentale chez la souris.

Nous avons ainsi montré que l'infection *in vitro* de macrophages péritonéaux murins par la souche *Ldi SENS* provoque une augmentation du pourcentage de macrophages infectés mais aussi du nombre d'amastigotes intracellulaires. Ces résultats suggèrent que la surexpression de la protéine *LiPSA-50S* facilite l'internalisation des parasites dans les macrophages et la multiplication des parasites à l'intérieur de la cellule hôte. Kedzierski *et al.* ont montré que les motifs répétés riche en leucines (LRR) de la PSA-2 étaient capables de lier le récepteur 3 au complément du macrophage (CR3) [39]. Or, le CR3 est connu pour être impliqué dans le mécanisme de phagocytose des micro-organismes par le macrophage [156]. Les promastigotes sont sensibles à l'activité microbicide des dérivés d'oxygène (O_2 et H_2O_2) [157]. Ils doivent donc entrer dans leur cellule hôte par une voie leur offrant une protection contre l'activité microbicide du macrophage. Le récepteur macrophagique CR3 leur fournirait cette protection [158]. La protéine *LiPSA-50S* étant composée d'une séquence répétée riche en leucines, il semblerait donc que sa surexpression, chez la forme promastigote de *Leishmania infantum*, permettrait aux parasites d'être phagocytés par le macrophage grâce à la liaison CR3-(LRR)*LiPSA-50S* et d'être protégés des activités microbicides, permettant ainsi leur survie et leur multiplication. La surexpression de la protéine *LiPSA-50S* accroît donc la virulence du parasite *in vitro*. Beetham *et al.* avaient également montré que les protéines de la famille des PSA étaient fortement exprimées chez les formes promastigotes métacycliques de *Leishmania*, suggérant ainsi une association de leur expression avec la virulence des parasites [123].

Toutefois, les études *in vitro* ne tiennent pas compte de l'environnement de l'hôte, notamment du système immunitaire. C'est pourquoi des infections expérimentales avec les différentes souches étudiées (*Ldi WT*, *Ldi pTEX* et *Ldi SENS*) ont été menées chez la souris BALB/c. Plusieurs modèles animaux ont été utilisés pour étudier les infections à *Leishmania* (souris, hamsters, chiens, primates).

Mais les souris BALB/c sont les plus fréquemment utilisées, en raison de leur forte sensibilité aux leishmanies. De plus, la possibilité de travailler avec des souris consanguines réduit la variabilité génétique entre les individus d'un même groupe. L'infection par *Leishmania* de souris BALB/c fournit un bon modèle expérimental d'étude de la pathogénèse, de la réponse immunitaire de l'hôte au cours de la maladie, et du pouvoir infectieux de souches de leishmanies, notamment de leishmanies mutantes pour différents gènes [159, 160]. Le résultat de l'infection expérimentale est également dépendant du nombre de parasites inoculés et de la voie d'inoculation. Les infections expérimentales sont censées imiter les infections naturelles, où le parasite est inoculé par le phlébotome dans la peau de l'hôte. Or, pour une infection à *Leishmania infantum*, ou encore *Leishmania donovani*, l'inoculation des parasites par voie sous-cutanée ou intra-dermique est inefficace. Il a été montré que la meilleure voie d'inoculation pour les leishmanies viscérotropes était la voie intra-péritonéale avec l'injection de 10^7 ou 10^8 parasites chez la souris BALB/c [161].

Dans notre étude, les parasites *Ldi* WT et *Ldi* pTEX sont détectés dans les rates des souris à partir du 7^{ème} jour post-infection, la charge parasitaire atteint un pic à J49 puis diminue fortement. Dans la littérature, l'élimination des parasites dans la rate au cours de l'infection est assez controversée [159, 162], et est dépendante de la souche parasitaire utilisée [163]. Cependant, la charge parasitaire a été déterminée ici par une technique de dilution limite, méthode la plus sensible pour la détection des parasites vivants [130]. Les charges parasitaires spléniques restent négatives jusqu'à la fin de l'expérimentation chez les souris infectées par *Ldi* SENS. Il semblerait donc que la surexpression de la protéine *LiPSA-50S* permettrait à la souris BALB/c, pourtant sensible à *Leishmania*, de contrôler l'infection. *In vivo*, l'infection serait contrôlée par l'induction d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire (prolifération *ex vivo* des cellules spléniques issues des souris infectées par la souche surexprimante face à une stimulation par la protéine *LiPSA-50S*, contrairement aux souris infectées avec *Ldi* WT et *Ldi* pTEX) mais aussi dû à la production d'anticorps spécifiques. Dans la littérature, le rôle des anticorps dans la génération d'une immunité protectrice est souvent discuté. En effet, de nombreux auteurs indiquent que la guérison des souris, suite à l'infection par *L. major*, dépend surtout du développement d'une immunité à médiation cellulaire, alors que la réponse humorale jouerait un rôle mineur [164, 165]. Pourtant, il a été montré que, *in vitro*, les anticorps anti-*Leishmania* pouvaient participer à la lyse médiée par le complément des promastigotes de *L. donovani* en culture [166], et augmenter l'internalisation des parasites dans le macrophage [167]. Aussi, des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de surface des leishmanies empêchent la mise en place de l'infection par *L. major* ou encore *L. mexicana* chez la souris BALB/c, lorsqu'ils sont administrés avec une faible dose de parasites [82, 83, 168]. Dans notre modèle expérimental, l'infection des souris par *Ldi* SENS, et uniquement par cette souche, induit une

production significative d'immunoglobulines G d'isotypes IgG1, IgG2a et IgG2b dirigées contre LiPSA-50S. Etant donné que les IgG1 et IgG2a sont associés au développement d'une réponse immune de type Th2 et Th1 respectivement [169], les résultats indiquent que les souris infectées par la souche surexprimante développent une réponse mixte de type Th1/Th2. Les immunoglobulines G peuvent avoir plusieurs fonctions : (i) la neutralisation, où les anticorps, en se liant aux micro-organismes ou aux toxines, bloquent le pouvoir infectieux du pathogène et les interactions des toxines avec les cellules hôtes ; (ii) l'opsonisation, où les anticorps recouvrent les micro-organismes pathogènes et favorisent leur ingestion par les phagocytes grâce à la liaison [partie Fc des IgG1-récepteurs macrophagiques FcγRI] ; (iii) l'activation du complément, permettant la lyse des pathogènes par l'action du complexe d'attaque membranaire (les IgG1 activent la voie classique du complément) et (iv) la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps où les cellules NK (ou autres leucocytes) qui expriment un récepteur Fc (FcγRIII ou CD16), peuvent se lier aux pathogènes recouverts d'anticorps et les détruire. Nous montrons ici que, *in vitro*, les anticorps, contenus dans les sérums des souris infectées par *Ldi* SENS, sont capables d'opsoniser les promastigotes de *L. infantum*, favorisant ainsi de manière significative l'internalisation des parasites dans le macrophage. Ces anticorps sont capables d'activer les molécules du complément pour lyser les promastigotes de *L. infantum* en culture *in vitro*. La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps n'a pu être démontrée par manque d'outils cellulaires. En effet, il n'existe pas de lignées cellulaires NK murines sur le marché. Il aurait donc fallu extraire les cellules NK de souris saines, mais cette expérimentation nécessiterait le sacrifice d'autres souris. Pour des raisons éthiques, nous avons donc choisi de ne pas mener ce protocole.

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de l'étude du rôle biologique de la protéine LiPSA-50S montre que sa surexpression semble accroître la virulence du parasite *L. infantum in vitro*. Cependant, *in vivo*, cette surexpression permet à la souris BALB/c de contrôler l'infection en induisant la production d'anticorps spécifiques, développant ainsi une réponse immunitaire mixte de type Th1/Th2. Ces anticorps seraient capables d'opsoniser les parasites, et donc favoriser leur phagocytose par les macrophages. Mais ces anticorps sont également capables d'activer les molécules du complément, et participent donc à la lyse des parasites. Laurenti *et al.* ont d'ailleurs montré l'importance du rôle du complément dans les stades précoces d'une leishmaniose cutanée expérimentale à *L. amazonensis* chez la souris BALB/c, en contrôlant le nombre de parasites dans les lésions [170]. Le contrôle de l'infection s'établirait de manière précoce, juste après l'inoculation des parasites. En effet, les souris infectées par la souche surexprimante présentent des charges parasitaires négatives, et ce, dès le 7^{ème} jour post-inoculation. Ainsi, les anticorps produits induiraient

une lyse des parasites par le complément dès les premières étapes de l'infection. La surexpression de la protéine induit également une immunité à médiation cellulaire. Malheureusement, des raisons techniques nous ont empêché de mesurer les cytokines dans les surnageants de prolifération cellulaire (défaillance du congélateur -80°C). Il serait pourtant intéressant d'étudier la réponse cellulaire de manière plus approfondie. La purification des lymphocytes issus des rates des souris infectées aurait permis de déterminer plus précisément l'orientation de la réponse, par marquage des lymphocytes après stimulation *in vitro* par la protéine LiPSA-50S (identification des lymphocytes T CD4+ et CD8+ et des cellules activées par cytométrie en flux) ainsi que par dosage des cytokines produites après stimulation.

En plus d'induire une réponse immunitaire à médiation cellulaire et la production d'anticorps spécifiques, la surexpression de la protéine LiPSA-50S permet également à la souris d'être protégée d'une infection ultérieure par *Leishmania infantum*. Ce résultat suggère fortement que la protéine LiPSA-50S peut être considérée comme un bon candidat vaccinal.

Pour le vérifier, un **essai d'immunisation** a été réalisé **chez le chien**. Les chiens étant des hôtes naturels de l'infection à *L. infantum*/*L. chagasi* et présentant les mêmes symptômes que chez l'Homme, ils peuvent être considérés comme le meilleur modèle d'étude de la leishmaniose viscérale (études immunologiques, essais de vaccination, études précliniques (tolérance et toxicité) en vue de futurs essais chez l'Homme). Les mesures de contrôle de la leishmaniose viscérale canine reposent principalement sur des dépistages sérologiques et sur la chimiothérapie (stratégie de « dépister et traiter »). Cependant, les traitements médicamenteux sont hautement toxiques et de nombreux cas de rechutes apparaissent. De plus, une émergence des cas de résistance du parasite aux traitements de première intention (dérivés pentavalents de l'antimoine) limite sérieusement leur utilité [171]. Des hôtes infectés qui répondent aux traitements peuvent également rester réservoirs de parasites [172]. Par ailleurs, seule une faible proportion d'individus et de chiens exposés sont atteints de formes sévères de leishmaniose, la majorité reste asymptomatique et constitue des réservoirs potentiels, permettant de perpétuer le cycle de transmission [173]. En raison de l'abondance des porteurs asymptomatiques non traités, la chimiothérapie à elle seule ne pourra donc pas éliminer ces maladies. Le développement d'un vaccin anti-*leishmania* sécuritaire, efficace et abordable est une nécessité pour la santé publique humaine et animale. La vaccination préventive est donc une stratégie très prometteuse pour interrompre la transmission de la leishmaniose et contribuer à son élimination.

La protéine *LiPSA-50S* n'étant pas disponible sous forme recombinante, des chiens Beagle ont été immunisés avec la protéine recombinante native purifiée *LaPSA-38S* (son homologue chez *Leishmania amazonensis*) et sa partie carboxy-terminale (partie la plus immunogène de la protéine). Les résultats de cet essai montrent que trois injections, soit avec la protéine recombinante entière (*LaPSA-38S*) ou sa partie carboxy-terminale (*LaPSA-12S*) combinées au QA-21 comme adjuvant, confèrent un bon niveau de protection chez des chiens Beagle naïfs infectés expérimentalement par des promastigotes de *Leishmania infantum*. L'absence de parasites dans les prélèvements de moelle osseuse provenant des chiens vaccinés 6 mois après l'épreuve infectieuse en apportent la preuve. Les parasitémies ont été déterminées par des techniques très sensibles, telles que la culture et la PCR. L'utilisation de tests parasitologiques spécifiques et sensibles a permis de détecter précocement les chiens infectés, alors que les signes cliniques d'une leishmaniose viscérale classique apparaissent habituellement beaucoup plus tard dans le développement de l'infection chez le chien [139]. Les résultats démontrent clairement des différences dans les réponses immunitaires humorales et cellulaires entre les groupes de chiens vaccinés et le groupe placebo. Une augmentation significative et précoce des anticorps IgG2 spécifiques n'a été observée que chez les chiens immunisés avec *LaPSA-38S/QA-21* ou avec *LaPSA-12S/QA-21*. Les anticorps IgG1 ont été associés à la susceptibilité et la sévérité de la maladie [174] alors que les IgG2 prédominent chez les chiens naturellement résistants ou vaccinés [175]. Les IgG2 sont, la plupart du temps, associées à une réponse immune cellulaire de type Th1 alors que les IgG1 sont corrélées à une réponse de type Th2. Dans une étude précédente, nous avons apporté la preuve qu'une coopération entre la réponse humorale et la réponse immune à médiation cellulaire était essentielle dans le développement d'une immunité protectrice suite à l'immunisation des chiens avec les AES de *L. infantum* couplés au muramyl-dipeptide comme adjuvant [118]. Ici, les sérums décomplémentés issus des chiens vaccinés se sont montrés, d'un point de vue fonctionnel, actifs *in vitro* en favorisant une destruction précoce des promastigotes et une inhibition significative de la croissance des parasites prétraités. Ces résultats suggèrent que les anticorps dirigés contre *LaPSA-38S* ou sa partie carboxy-terminale pourraient jouer un rôle important dans la protection contre la leishmaniose viscérale. Ils fournissent une nouvelle fois la preuve qu'une réponse humorale, par la production d'anticorps spécifiques, pourrait constituer un élément important dans l'induction d'une réponse protectrice efficace, au moins en ce qui concerne la leishmaniose viscérale canine.

Pour caractériser la réponse immune cellulaire protectrice générée chez les chiens vaccinés, nous avons développé, au cours d'études antérieures, un système *ex vivo* de co-culture de macrophages infectés exposés aux lymphocytes autologues. Les leishmanies sont des parasites intracellulaires qui infectent des cellules effectrices de l'immunité telles que les macrophages. La destruction des

parasites par les macrophages infectés est donc cruciale pour la résolution de l'infection. Ce système, que nous avons appelé « activité leishmanicide », permet de déterminer la capacité des macrophages de chiens immunisés (dérivés des monocytes issus du sang circulant) à tuer les parasites intracellulaires. Un accroissement des taux d'IFN- γ et de monoxyde d'azote (NO), ainsi qu'une augmentation significative de l'activité leishmanicide des macrophages, ont été mis en évidence chez les chiens vaccinés dès le premier mois après la seconde immunisation, et cette activité a perduré 2 mois après la fin du protocole complet de vaccination. La destruction des leishmanies est donc médiée par la production de NO par le macrophage (voie de la NO Synthase macrophagique : voie classique d'activation du macrophage), induite par des cytokines produites par les lymphocytes de type Th1, telles que l'IFN- γ .

Ces observations confirment donc l'hypothèse que la protéine *LaPSA-38S*, naturellement excrétée-sécrétée par le parasite, et sa partie carboxy-terminale (*LaPSA-12S*), confèrent sous leurs formes recombinantes un excellent taux de protection dans un modèle canin de leishmaniose viscérale, en induisant une réponse immune cellulaire de type Th1 et une réponse anticorps spécifique appropriée.

Au cours des dernières décennies, de nombreux travaux se sont focalisés sur la recherche de nouvelles solutions pour la conception de vaccin, et dans ce contexte, les peptides ont suscité un intérêt considérable [176, 177]. En effet, la **vaccination peptidique** présente de nombreux avantages. Outre l'aspect économique et logistique, les peptides ont aussi l'avantage de représenter la région immunogène minimale d'une protéine antigénique et de permettre une orientation précise de la réponse immune.

Deux peptides de 17 acides aminés (A17G et A17E) et un peptide de 38 acides aminés (E34PC) ont été identifiés au sein de la protéine *LaPSA-12S*, protéine immunogène et très conservée entre les espèces de leishmanies. Ces peptides, constitués d'épitopes T (peptides A17G et A17E) et d'épitopes B (peptide E34PC), ont été utilisés en combinaison comme candidat vaccin dans un essai vaccinal chez le chien. Les résultats de cet essai montrent que trois injections de la préparation vaccinale confèrent une protection efficace chez des chiens Beagle naïfs infectés expérimentalement par des promastigotes de *L. infantum*. En effet, 6 mois après l'infection expérimentale, 60 à 70% des chiens du groupe vacciné sont protégés d'une infection expérimentale. Comme pour l'essai de vaccination avec les protéines recombinantes *LaPSA-38S* ou *LaPSA-12S*, des différences dans les réponses immunitaires humorales et cellulaires ont été observées entre le groupe de chiens vaccinés et le

groupe placebo. L'immunisation des chiens avec les différents peptides a induit une augmentation significative des anticorps d'isotype IgG2 spécifiques, moins de deux mois après la troisième injection. Par ailleurs, la technique *ex vivo* d'effets leishmanicides a permis de démontrer la capacité des macrophages issus des chiens vaccinés à tuer les parasites par la production de monoxyde d'azote, et l'augmentation de la production d'IFN- γ par les lymphocytes autologues.

Ces résultats apportent la preuve qu'une préparation vaccinale composée d'un mélange peptidique est capable d'offrir non seulement une bonne tolérance du vaccin, mais aussi un bon niveau de protection dans un modèle expérimental de leishmaniose viscérale canine.

Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail, l'immunogène majeur des antigènes excrétés-sécrétés (AES) de *Leishmania* a été démontré comme étant un bon candidat vaccin. En effet, les protéines natives recombinantes purifiées *LaPSA-38S* et *LaPSA-12S*, identifiées chez *Leishmania amazonensis* et hautement conservées parmi les espèces de leishmanies, formulées avec le QA-21, ont donné des résultats extrêmement prometteurs dans un essai de vaccination chez le chien, principal hôte réservoir naturel à *Leishmania infantum*. Ces résultats nous encouragent aujourd'hui à **évaluer ces candidats vaccinaux en situation d'exposition naturelle à l'infection**. Par ailleurs, au sein de notre laboratoire et en collaboration avec l'Institut Pasteur de Tunis, l'immunogénicité de la protéine *LaPSA-38S* a été récemment évaluée *ex-vivo* chez l'homme, sur des cellules d'individus guéris de leishmaniose viscérale (à *L. infantum*) et de leishmaniose cutanée (à *L. major*). Nous avons montré que la protéine recombinante *LaPSA-38S* induisait *ex-vivo* des taux significatifs d'IFN- γ , de granzyme B et d'IL-10 à partir de cellules mononucléées de sang issues de ces individus [178]. La protéine *LaPSA-38S* serait donc capable d'induire une réponse mixte Th1/Th2, et pourrait donc être exploitée comme candidat vaccin pour l'homme.

La vaccination peptidique présentant de nombreux avantages, des peptides ont été identifiés au sein de la séquence protéique de *LaPSA-12S* et testés chez le chien (peptides A17G, A17E et E34PC). L'immunisation avec ces peptides en combinaison confère un taux de protection très intéressant. Dans les deux essais de vaccination (protéines recombinantes et peptides), la protection à l'encontre d'une infection expérimentale à *L. infantum* a toujours été associée à l'induction d'une immunité à médiation cellulaire et humorale de type Th1.

Le vaccin CaniLeish® confère 100% de protection à l'encontre d'une infection expérimentale à *Leishmania infantum* chez le chien [110]. Nous montrons ici que l'immunisation des chiens avec la protéine recombinante *LaPSA-38S* (l'immunogène majeur des AES de *L. amazonensis*) confère 78% de protection, et sa partie carboxy-terminale (protéine *LaPSA-12S*) 80% de protection. Les peptides issus de la protéine *LaPSA-12S* confèrent quant à eux 60 à 70% de protection chez le chien. En partant des AES totaux et en identifiant la plus petite partie antigénique capable d'induire une réponse immunitaire spécifique, le taux de protection conféré par la préparation vaccinale peptidique est extrêmement intéressant.

Ces résultats très encourageants nous permettent aujourd'hui d'**envisager la conception d'un vaccin à visée humaine**, composé de peptides synthétiques dont la production sera plus aisée et plus économique d'un point de vue industriel. À l'heure actuelle, aucun vaccin peptidique n'est commercialisé. Cependant, plusieurs essais précliniques et cliniques ont été menés comme par

exemple contre l'hépatite C [179] ou encore certains cancers [180], et ont présenté des résultats très prometteurs.

Les résultats de l'essai préclinique de vaccination chez le chien après immunisation avec les peptides sont très encourageants. Cependant, la population canine n'est infectée que par *Leishmania infantum*. Chez l'homme, de nombreuses espèces de leishmanies sont impliquées, aboutissant à des formes cliniques diverses et de sévérité variable. Aussi, la leishmaniose humaine touche plus de 98 pays dans le monde, apportant une diversité HLA importante (origines ethniques variées). Ces paramètres font de la conception d'un vaccin peptidique humain un réel défi.

Dans le but de **concevoir un vaccin peptidique anti-leishmanioses**, il sera nécessaire d'identifier, au sein des séquences protéiques de *LaPSA-38S* ou *LaPSA-12S*, des peptides conservés entre toutes les espèces de leishmanies affectant l'Homme. L'intégration de peptides issus d'autres protéines leishmaniennes dont le pouvoir immunogène a été démontré chez l'animal pourrait également être envisagée. Les peptides devront être affins pour les molécules HLA-I et HLA-II les plus fréquemment représentées parmi les populations endémiques, afin d'offrir une couverture vaccinale chez tous les individus exposés. Cette stratégie nécessitera une recherche bio-informatique comprenant : (i) la recherche des séquences peptidiques conservées entre différentes espèces de *Leishmania*, (ii) la sélection des allèles HLA les plus représentés dans la population mondiale, (iii) la prédiction de liaison des peptides sélectionnés aux molécules HLA de classe I et de classe II choisies, (iv) la prédiction des sites de clivage des peptides par le protéasome et enfin (v) l'étude des propriétés physico-chimiques des peptides sélectionnés. Une fois les peptides multi-épitopiques choisis et synthétisés, leur immunogénicité devra être évaluée. La capacité des peptides à activer *ex-vivo* des lymphocytes T producteurs de cytokines leishmanicides pourra être évaluée sur des PBMC issues de personnes asymptomatiques ou guéries de leishmanioses cutanée ou viscérale, mais aussi de personnes naïves vivants en zone non endémique.

L'un des objectifs majeurs de notre équipe de recherche étant de concevoir un vaccin anti-leishmanioses à visée humaine, les résultats prometteurs obtenus au cours de ce travail contribuent à soutenir et répondre à cet objectif.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. World Health Organization. *Leishmaniasis: epidemiology and access to medicines*. 2012 [26/01/2015]; Geneva, Switzerland: WHO:[Available from: http://who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_worldwide_epidemiological_and_drug_access_update.pdf].
2. WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, *Control of the leishmaniases : report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22 - 26 March 2010*. WHO Technical Report Series, ed. W.H.O. (Geneva). Vol. 1. 2011.
3. Duthie, M.S., et al., *The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines*. *Vaccine*, 2012. **30**(2): p. 134-41.
4. Alvar, J., et al., *Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e35671.
5. Aara, N., et al., *Clinico-epidemiologic study of cutaneous leishmaniasis in Bikaner, Rajasthan, India*. *Am J Trop Med Hyg*, 2013. **89**(1): p. 111-5.
6. Blanco, V.M., et al., *Clinical and epidemiologic profile of cutaneous leishmaniasis in Colombian children: considerations for local treatment*. *Am J Trop Med Hyg*, 2013. **89**(2): p. 359-64.
7. Turetz, M.L., et al., *Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil*. *J Infect Dis*, 2002. **186**(12): p. 1829-34.
8. Grimaldi, G., Jr., R.B. Tesh, and D. McMahon-Pratt, *A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World*. *Am J Trop Med Hyg*, 1989. **41**(6): p. 687-725.
9. Laurenti, M.D., et al., *Asymptomatic dogs are highly competent to transmit Leishmania (Leishmania) infantum chagasi to the natural vector*. *Vet Parasitol*, 2013. **196**(3-4): p. 296-300.
10. de Queiroz, N.M., et al., *Detection of Leishmania (L.) chagasi in canine skin*. *Vet Parasitol*, 2011. **178**(1-2): p. 1-8.
11. Gavgani, A.S., et al., *Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with Leishmania infantum*. *Am J Trop Med Hyg*, 2002. **67**(5): p. 511-5.
12. V., T.-S., et al., *Monophyletic origin of the genus Leishmania Ross, 1903*. *Ann Parasitol Hum Comp*, 1993. **68**(2): p. 107-8.
13. Bray, R.S., *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol*, 1974. **28**(0): p. 189-217.
14. Lumsden, W.H., *Letter: Biochemical taxonomy of Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1974. **68**(1): p. 74-5.
15. Pratt, D.M. and J.R. David, *Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of Leishmania*. *Nature*, 1981. **291**(5816): p. 581-3.
16. Banuls, A.L., M. Hide, and F. Prugnolle, *Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans*. *Adv Parasitol*, 2007. **64**: p. 1-109.
17. Dedet, J.-P., *Les leishmanioses*. Ellipses Paris ed1999. 253.
18. Murray, H.W., et al., *Advances in leishmaniasis*. *Lancet*, 2005. **366**(9496): p. 1561-77.
19. Yaghoobi-Ershadi, M.R., A.A. Akhavan, and M. Mohebbali, *Meriones libycus and Rhombomys opimus (Rodentia: Gerbillidae) are the main reservoir hosts in a new focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1996. **90**(5): p. 503-4.
20. Gentile, B., et al., *Dermal leishmaniasis in French Guiana: the sloth (Choloepus didactylus) as a reservoir host*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1981. **75**(4): p. 612-3.
21. Handman, E., *Leishmaniasis: current status of vaccine development*. *Clin Microbiol Rev*, 2001. **14**(2): p. 229-43.

22. Joshi, P.B., et al., *Targeted gene deletion in Leishmania major identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor*. Mol Biochem Parasitol, 2002. **120**(1): p. 33-40.
23. Sacks, D.L., *Metacyclogenesis in Leishmania promastigotes*. Exp Parasitol, 1989. **69**(1): p. 100-3.
24. Sacks, D. and S. Kamhawi, *Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis*. Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: p. 453-83.
25. Soares, R.P., et al., *Leishmania braziliensis: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis*. Int J Parasitol, 2005. **35**(3): p. 245-53.
26. Spath, G.F., et al., *Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite Leishmania major*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 9258-63.
27. Etges, R., J. Bouvier, and C. Bordier, *The major surface protein of Leishmania promastigotes is a protease*. J Biol Chem, 1986. **261**(20): p. 9098-101.
28. Handman, E., et al., *The Leishmania promastigote surface antigen 2 complex is differentially expressed during the parasite life cycle*. Mol Biochem Parasitol, 1995. **74**(2): p. 189-200.
29. Devault, A. and A.L. Banuls, *The promastigote surface antigen gene family of the Leishmania parasite: differential evolution by positive selection and recombination*. BMC Evol Biol, 2008. **8**: p. 292.
30. Hocking, A.M., T. Shinomura, and D.J. McQuillan, *Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix*. Matrix Biol, 1998. **17**(1): p. 1-19.
31. Pizarro-Cerda, J. and P. Cossart, *Bacterial adhesion and entry into host cells*. Cell, 2006. **124**(4): p. 715-27.
32. Silverman, J.M., et al., *Proteomic analysis of the secretome of Leishmania donovani*. Genome Biol, 2008. **9**(2): p. R35.
33. Cuervo, P., et al., *Proteomic characterization of the released/secreted proteins of Leishmania (Viannia) braziliensis promastigotes*. J Proteomics, 2009. **73**(1): p. 79-92.
34. Blackwell, J.M., *Receptors and recognition mechanisms of Leishmania species*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1985. **79**(5): p. 606-12.
35. Wilson, M.E. and R.D. Pearson, *Evidence that Leishmania donovani utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism*. J Immunol, 1986. **136**(12): p. 4681-8.
36. Wilson, M.E. and R.D. Pearson, *Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of Leishmania donovani by human mononuclear phagocytes*. Infect Immun, 1988. **56**(2): p. 363-9.
37. Mosser, D.M. and P.J. Edelson, *The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of Leishmania promastigotes*. J Immunol, 1985. **135**(4): p. 2785-9.
38. Rizvi, F.S., et al., *The major surface protein of Leishmania promastigotes is a fibronectin-like molecule*. Eur J Immunol, 1988. **18**(3): p. 473-6.
39. Kedzierski, L., et al., *A leucine-rich repeat motif of Leishmania parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4902-6.
40. Mosser, D.M. and P.J. Edelson, *Activation of the alternative complement pathway by Leishmania promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages*. J Immunol, 1984. **132**(3): p. 1501-5.
41. Wozencraft, A.O. and J.M. Blackwell, *Increased infectivity of stationary-phase promastigotes of Leishmania donovani: correlation with enhanced C3 binding capacity and CR3-mediated attachment to host macrophages*. Immunology, 1987. **60**(4): p. 559-63.
42. Puentes, S.M., et al., *Complement binding by two developmental stages of Leishmania major promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan*. J Exp Med, 1988. **167**(3): p. 887-902.

43. Brittingham, A., et al., *Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis*. J Immunol, 1995. **155**(6): p. 3102-11.
44. Guy, R.A. and M. Belosevic, *Comparison of receptors required for entry of Leishmania major amastigotes into macrophages*. Infect Immun, 1993. **61**(4): p. 1553-8.
45. Kima, P.E., et al., *Internalization of Leishmania mexicana complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis*. J Exp Med, 2000. **191**(6): p. 1063-8.
46. Miles, S.A., et al., *A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen Leishmania*. J Exp Med, 2005. **201**(5): p. 747-54.
47. Srivastava, P., et al., *Molecular and serological markers of Leishmania donovani infection in healthy individuals from endemic areas of Bihar, India*. Trop Med Int Health, 2013. **18**(5): p. 548-54.
48. Zijlstra, E.E., et al., *Endemic kala-azar in eastern Sudan: a longitudinal study on the incidence of clinical and subclinical infection and post-kala-azar dermal leishmaniasis*. Am J Trop Med Hyg, 1994. **51**(6): p. 826-36.
49. Ali, A. and R.W. Ashford, *Visceral leishmaniasis in Ethiopia. IV. Prevalence, incidence and relation of infection to disease in an endemic area*. Ann Trop Med Parasitol, 1994. **88**(3): p. 289-93.
50. Evans, T.G., et al., *Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil*. J Infect Dis, 1992. **166**(5): p. 1124-32.
51. Moral, L., E.M. Rubio, and M. Moya, *A leishmanin skin test survey in the human population of l'Alacanti region (Spain): implications for the epidemiology of Leishmania infantum infection in southern Europe*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2002. **96**(2): p. 129-32.
52. Ostyn, B., et al., *Incidence of symptomatic and asymptomatic Leishmania donovani infections in high-endemic foci in India and Nepal: a prospective study*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(10): p. e1284.
53. Topno, R.K., et al., *Asymptomatic infection with visceral leishmaniasis in a disease-endemic area in bihar, India*. Am J Trop Med Hyg, 2010. **83**(3): p. 502-6.
54. Anstead, G.M., et al., *Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following Leishmania donovani infection*. Infect Immun, 2001. **69**(8): p. 4709-18.
55. Kumar, V., et al., *Leishmania donovani: dynamics of L. donovani evasion of innate immune cell attack due to malnutrition in visceral leishmaniasis*. Nutrition, 2014. **30**(4): p. 449-58.
56. Cerf, B.J., et al., *Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis*. J Infect Dis, 1987. **156**(6): p. 1030-3.
57. Alvar, J., *Leishmaniasis and AIDS co-infection: the Spanish example*. Parasitol Today, 1994. **10**(4): p. 160-3.
58. Beebe, A.M., D.J. Cua, and R.L. Coffman, *Genetic control of T helper subset differentiation in Leishmania major infection of mice*. Microbes Infect, 1999. **1**(1): p. 89-94.
59. Bradley, D.J., *Letter: Genetic control of natural resistance to Leishmania donovani*. Nature, 1974. **250**(464): p. 353-4.
60. Bradley, D.J., *Regulation of Leishmania populations within the host. II. genetic control of acute susceptibility of mice to Leishmania donovani infection*. Clin Exp Immunol, 1977. **30**(1): p. 130-40.
61. Blackwell, J., J. Freeman, and D. Bradley, *Influence of H-2 complex on acquired resistance to Leishmania donovani infection in mice*. Nature, 1980. **283**(5742): p. 72-4.
62. Laskay, T., G. van Zandbergen, and W. Solbach, *Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor*. Immunobiology, 2008. **213**(3-4): p. 183-91.
63. Muller, K., et al., *Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of Leishmania major infection in mice*. Med Microbiol Immunol, 2001. **190**(1-2): p. 73-6.

64. Thalhoffer, C.J., et al., *Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan Leishmania infantum chagasi*. Infect Immun, 2011. **79**(1): p. 108-17.
65. van Zandbergen, G., et al., *Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages*. J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6521-5.
66. Lieke, T., et al., *The interplay between Leishmania promastigotes and human Natural Killer cells in vitro leads to direct lysis of Leishmania by NK cells and modulation of NK cell activity by Leishmania promastigotes*. Parasitology, 2011. **138**(14): p. 1898-909.
67. Trinchieri, G., et al., *Cytokine cross-talk between phagocytic cells and lymphocytes: relevance for differentiation/activation of phagocytic cells and regulation of adaptive immunity*. J Cell Biochem, 1993. **53**(4): p. 301-8.
68. Trinchieri, G., *Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 251-76.
69. Muller, I., et al., *Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to Leishmania major*. Infect Immun, 1994. **62**(6): p. 2575-81.
70. Belkaid, Y., et al., *CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with Leishmania major*. J Immunol, 2002. **168**(8): p. 3992-4000.
71. Bogdan, C., M. Rollinghoff, and A. Diefenbach, *The role of nitric oxide in innate immunity*. Immunol Rev, 2000. **173**: p. 17-26.
72. Holzmüller, P., R. Bras-Goncalves, and J.L. Lemesre, *Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in Leishmania*. Parasitology, 2006. **132 Suppl**: p. S19-32.
73. Ajdary, S., et al., *Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection*. Infect Immun, 2000. **68**(4): p. 1760-4.
74. Caldas, A., et al., *Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis*. BMC Infect Dis, 2005. **5**: p. 113.
75. Bacellar, O., et al., *Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis*. J Infect Dis, 2009. **200**(1): p. 75-8.
76. Boaventura, V.S., et al., *Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines*. Eur J Immunol, 2010. **40**(10): p. 2830-6.
77. Novoa, R., et al., *IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in L. braziliensis Infection*. Parasite Immunol, 2011. **33**(2): p. 132-6.
78. Souza, M.A., et al., *American tegumentary leishmaniasis: cytokines and nitric oxide in active disease and after clinical cure, with or without chemotherapy*. Scand J Immunol, 2012. **76**(2): p. 175-80.
79. Romero, G.A., et al., *Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by Leishmania (Viannia) braziliensis or Leishmania (Viannia) guyanensis in Brazil*. Acta Trop, 2005. **93**(1): p. 49-56.
80. Neogy, A.B., et al., *Antibody kinetics in kala-azar in response to treatment*. Ann Trop Med Parasitol, 1987. **81**(6): p. 727-9.
81. Buxbaum, L.U., *A detrimental role for IgG and FcγR in Leishmania mexicana infection*. Immunol Res, 2008. **42**(1-3): p. 197-209.
82. Anderson, S., J.R. David, and D. McMahonpratt, *In vivo Protection against Leishmania-Mexicana Mediated by Monoclonal-Antibodies*. Journal of Immunology, 1983. **131**(4): p. 1616-1618.
83. Debons-Guillemin, M.C., et al., *Inhibition in vivo of both infective Leishmania major and L. mexicana amazonensis mediated by a single monoclonal antibody*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1986. **80**(2): p. 258-60.

84. Deplazes, P., et al., *Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to Leishmania infantum and other parasites*. Parasite Immunol, 1995. **17**(9): p. 451-8.
85. Mlika, R.B., et al., *Should we continue to indicate meglumine antimoniate as first-line treatment for cutaneous leishmaniasis in Tunisia*. Dermatol Ther, 2012. **25**(6): p. 615-8.
86. Kim, D.H., et al., *Is paromomycin an effective and safe treatment against cutaneous leishmaniasis? A meta-analysis of 14 randomized controlled trials*. PLoS Negl Trop Dis, 2009. **3**(2): p. e381.
87. Ravis, W.R., et al., *Pharmacokinetics and absorption of paromomycin and gentamicin from topical creams used to treat cutaneous leishmaniasis*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(10): p. 4809-15.
88. Safi, N., et al., *Evaluation of thermotherapy for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan: a randomized controlled trial*. Mil Med, 2012. **177**(3): p. 345-51.
89. Lopez, L., et al., *Thermotherapy. An alternative for the treatment of American cutaneous leishmaniasis*. Trials, 2012. **13**: p. 58.
90. Lopez, L., et al., *Thermotherapy effective and safer than miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2013. **55**(3).
91. Layegh, P., et al., *Efficacy of cryotherapy versus intralesional meglumine antimoniate (glucantime) for treatment of cutaneous leishmaniasis in children*. Am J Trop Med Hyg, 2009. **80**(2): p. 172-5.
92. Ranawaka, R.R., H.S. Weerakoon, and N. Opathella, *Liquid nitrogen cryotherapy on Leishmania donovani cutaneous leishmaniasis*. J Dermatolog Treat, 2011. **22**(4): p. 241-5.
93. Palumbo, E., *Treatment strategies for mucocutaneous leishmaniasis*. J Glob Infect Dis, 2010. **2**(2): p. 147-50.
94. Sundar, S., et al., *Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic*. Clin Infect Dis, 2000. **31**(4): p. 1104-7.
95. Pandey, B.D., et al., *Relapse of visceral leishmaniasis after miltefosine treatment in a Nepalese patient*. Am J Trop Med Hyg, 2009. **80**(4): p. 580-2.
96. Sundar, S., et al., *Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use*. Clin Infect Dis, 2012. **55**(4): p. 543-50.
97. Jha, T.K., *Drug unresponsiveness & combination therapy for kala-azar*. Indian J Med Res, 2006. **123**(3): p. 389-98.
98. Sundar, S., et al., *Ambisome plus miltefosine for Indian patients with kala-azar*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2011. **105**(2): p. 115-7.
99. Reithinger, R., et al., *Cutaneous leishmaniasis*. Lancet Infect Dis, 2007. **7**(9): p. 581-96.
100. Nadim, A., et al., *Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis*. Bull Soc Pathol Exot Filiales, 1983. **76**(4): p. 377-83.
101. Senekji, H.A. and C.P. Beattie, *Artificial infection and immunization of man with cultures of Leishmania tropica*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1941. **34**(6): p. 415-419.
102. Marzinowsky, E.I. and A. Schurenkova, *Oriental sore and immunity against it*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1924. **18**(1-2): p. 67-69.
103. Nadim, A., E. Javadian, and M. Mohebali, *The experience of leishmanization in the Islamic Republic of Iran*. Eastern Mediterranean Health Journal, 1997. **3**(2): p. 284-289.
104. Greenblatt, C.L., *Cutaneous leishmaniasis: The prospects for a killed vaccine*. Parasitol Today, 1988. **4**(2): p. 53-4.
105. Singh, B. and S. Sundar, *Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives*. Vaccine, 2012. **30**(26): p. 3834-42.
106. Mayrink, W., et al., *A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1979. **73**(4): p. 385-7.
107. De Luca, P.M., et al., *A randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the immunogenicity of a candidate vaccine against American tegumentary leishmaniasis*. Acta Trop, 2001. **80**(3): p. 251-60.

108. Armijos, R.X., et al., *Field trial of a vaccine against new world cutaneous leishmaniasis in an at-risk child population: how long does protection last?* J Infect Dis, 2003. **187**(12): p. 1959-61.
109. Sharifi, I., et al., *Randomised vaccine trial of single dose of killed Leishmania major plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran.* Lancet, 1998. **351**(9115): p. 1540-3.
110. Lemesre, J.L., et al., *Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of Leishmania infantum promastigotes.* Vaccine, 2005. **23**(22): p. 2825-40.
111. Lemesre, J.L., et al., *Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial.* Vaccine, 2007. **25**(21): p. 4223-34.
112. Borja-Cabrera, G.P., et al., *Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil.* Vaccine, 2008. **26**(39): p. 4991-7.
113. Fernandes, A.P., et al., *Protective immunity against challenge with Leishmania (Leishmania) chagasi in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein.* Vaccine, 2008. **26**(46): p. 5888-95.
114. Purcell, A.W., J. McCluskey, and J. Rossjohn, *More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design.* Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(5): p. 404-14.
115. Greenbaum, J., et al., *Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes.* Immunogenetics, 2011. **63**(6): p. 325-35.
116. Merlen, T., et al., *Leishmania spp: completely defined medium without serum and macromolecules (CDM/LP) for the continuous in vitro cultivation of infective promastigote forms.* Am J Trop Med Hyg, 1999. **60**(1): p. 41-50.
117. Moreno, J., et al., *Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs.* PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(6): p. e1683.
118. Bourdoiseau, G., et al., *Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAP-MDP vaccinated protected dogs.* Vet Immunol Immunopathol, 2009. **128**(1-3): p. 71-8.
119. Martin, V., et al., *The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish(R)) remains effective against an experimental challenge one year later.* Vet Res, 2014. **45**: p. 69.
120. Moreno, J., et al., *Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later.* Vet Immunol Immunopathol, 2014. **158**(3-4): p. 199-207.
121. Bras-Goncalves, R., et al., *Identification and characterization of new Leishmania promastigote surface antigens, LaPSA-38S and LiPSA-50S, as major immunodominant excreted/secreted components of L. amazonensis and L. infantum.* Infect Genet Evol, 2014. **24**: p. 1-14.
122. Ceulemans, H., et al., *A capping domain for LRR protein interaction modules.* FEBS Lett, 1999. **456**(3): p. 349-51.
123. Beetham, J.K., J.E. Donelson, and R.R. Dahlin, *Surface glycoprotein PSA (GP46) expression during short- and long-term culture of Leishmania chagasi.* Mol Biochem Parasitol, 2003. **131**(2): p. 109-17.
124. Lincoln, L.M., et al., *Genetic complementation of Leishmania deficient in PSA (GP46) restores their resistance to lysis by complement.* Mol Biochem Parasitol, 2004. **137**(1): p. 185-9.
125. Handman, E., et al., *Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from Leishmania major is mediated by a TH1 type of immune response.* Infect Immun, 1995. **63**(11): p. 4261-7.
126. Kelly, J.M., et al., *A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in Trypanosoma cruzi and Leishmania.* Nucleic Acids Res, 1992. **20**(15): p. 3963-9.
127. Schmittgen, T.D., et al., *Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA.* Methods, 2008. **44**(1): p. 31-8.

128. Lemesre, J.L., *Process for the in vitro culture of different stages of tissue parasites*, W.I.P. Organization, Editor 1994.
129. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
130. Buffet, P.A., et al., *Culture microtitration: a sensitive method for quantifying Leishmania infantum in tissues of infected mice*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(9): p. 2167-8.
131. Pinelli, E., et al., *Infection of a canine macrophage cell line with leishmania infantum: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity*. Vet Parasitol, 2000. **92**(3): p. 181-9.
132. Mary, C., et al., *Quantification of Leishmania infantum DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(11): p. 5249-55.
133. Bretagne, S., et al., *Real-time PCR as a new tool for quantifying Leishmania infantum in liver in infected mice*. Clin Diagn Lab Immunol, 2001. **8**(4): p. 828-31.
134. Papierok, G. and S. Vincens, *Therapeutic vaccine peptide complex for preventing and treating disorders in mammals*, W.I.P. Organization, Editor 2003.
135. Loing, E., et al., *Assessing delivery of lipopeptides into the cytoplasm of intact cells by a functional assay based on PKC inhibition. I. The Jurkat model*. Pept Res, 1996. **9**(5): p. 229-32.
136. Lemesre, J.L., et al., *Vaccine composition for preventing and/or treating leishmaniases immunogenic peptides and method for obtaining same*, W.I.P. Organization, Editor 2015.
137. Athanasiou, L.V., et al., *A cross-sectional sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in Greek mainland*. Acta Trop, 2012. **122**(3): p. 291-5.
138. Evans, K.J. and L. Kedzierski, *Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis*. J Trop Med, 2012. **2012**: p. 892817.
139. Palatnik-de-Sousa, C.B., *Vaccines for canine leishmaniasis*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 69.
140. Depledge, D.P., et al., *Leishmania-specific surface antigens show sub-genus sequence variation and immune recognition*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(9): p. e829.
141. Ilgoutz, S.C. and M.J. McConville, *Function and assembly of the Leishmania surface coat*. Int J Parasitol, 2001. **31**(9): p. 899-908.
142. Chenik, M., et al., *Approaches for the identification of potential excreted/secreted proteins of Leishmania major parasites*. Parasitology, 2006. **132**(Pt 4): p. 493-509.
143. Corrales, R.M., et al., *An experimental approach for the identification of conserved secreted proteins in trypanosomatids*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 752698.
144. Tonui, W.K., et al., *Immunization with Leishmania major exogenous antigens protects susceptible BALB/c mice against challenge infection with L. major*. Infect Immun, 2004. **72**(10): p. 5654-61.
145. Prigione, I., et al., *T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with Toxoplasma gondii excretory-secretory antigens cross-react with live tachyzoites: characterization of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vaccine development*. J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3741-8.
146. Mustafa, A.S., *Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis*. Mol Immunol, 2002. **39**(1-2): p. 113-9.
147. Sereno, D. and J.L. Lemesre, *Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(5): p. 972-6.
148. Sjolander, A., et al., *Vaccination with recombinant Parasite Surface Antigen 2 from Leishmania major induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection*. Vaccine, 1998. **16**(20): p. 2077-84.
149. Costa, C.H., et al., *Vaccines for the leishmaniases: proposals for a research agenda*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(3): p. e943.
150. Palatnik-de-Sousa, C.B., et al., *FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine*. Expert Rev Vaccines, 2008. **7**(6): p. 833-51.

151. Testasicca, M.C., et al., *Antibody responses induced by Leish-Tec(R), an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population.* Vet Parasitol, 2014. **204**(3-4): p. 169-76.
152. Fujiwara, R.T., et al., *Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmST11) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis.* Vet Res, 2005. **36**(5-6): p. 827-38.
153. Moreno, J., et al., *Immunization with H1, HASPB1 and MML Leishmania proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis.* Vaccine, 2007. **25**(29): p. 5290-300.
154. Gradoni, L., et al., *Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from Leishmania infantum infection and to prevent disease progression in infected animals.* Vaccine, 2005. **23**(45): p. 5245-51.
155. Poot, J., et al., *Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with Leishmania infantum.* Vaccine, 2006. **24**(14): p. 2460-8.
156. Ehlers, M.R., *CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity.* Microbes Infect, 2000. **2**(3): p. 289-94.
157. Gantt, K.R., et al., *Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of Leishmania chagasi.* J Immunol, 2001. **167**(2): p. 893-901.
158. Marth, T. and B.L. Kelsall, *Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling.* J Exp Med, 1997. **185**(11): p. 1987-95.
159. Rolao, N., et al., *Leishmania infantum: mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice.* Exp Parasitol, 2007. **115**(3): p. 270-6.
160. Thiakaki, M., et al., *Down-regulation of gp63 level in Leishmania amazonensis promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice.* Microbes Infect, 2006. **8**(6): p. 1455-63.
161. Rolao, N., C. Melo, and L. Campino, *Influence of the inoculation route in BALB/c mice infected by Leishmania infantum.* Acta Trop, 2004. **90**(1): p. 123-6.
162. Rousseau, D., et al., *Sustained parasite burden in the spleen of Leishmania infantum-infected BALB/c mice is accompanied by expression of MCP-1 transcripts and lack of protection against challenge.* Eur Cytokine Netw, 2001. **12**(2): p. 340-7.
163. Honore, S., et al., *Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral Leishmania infantum infection.* FEMS Immunol Med Microbiol, 1998. **21**(3): p. 231-9.
164. Reiner, S.L. and R.M. Locksley, *The Regulation of Immunity to Leishmania-Major.* Annual Review of Immunology, 1995. **13**: p. 151-177.
165. Scott, P., *The Role of Th1 and Th2 Cells in Experimental Cutaneous Leishmaniasis.* Experimental Parasitology, 1989. **68**(3): p. 369-372.
166. Pearson, R.D. and R.T. Steigbigel, *Mechanism of lethal effect of human serum upon Leishmania donovani.* J Immunol, 1980. **125**(5): p. 2195-201.
167. Herman, R., *Cytophilic and opsonic antibodies in visceral leishmaniasis in mice.* Infect Immun, 1980. **28**(2): p. 585-93.
168. Handman, E. and G.F. Mitchell, *Immunization with Leishmania Receptor for Macrophages Protects Mice against Cutaneous Leishmaniasis.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1985. **82**(17): p. 5910-5914.
169. Snapper, C.M. and W.E. Paul, *Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production.* Science, 1987. **236**(4804): p. 944-7.
170. Laurenti, M.D., et al., *The role of complement in the early phase of Leishmania (Leishmania) amazonensis infection in BALB/c mice.* Braz J Med Biol Res, 2004. **37**(3): p. 427-34.
171. Makala, L.H.C. and B. Baban, *Novel Therapeutic Approaches to Leishmania Infection.* Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment 2014.
172. Ashford, R.W., *The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses.* Int J Parasitol, 2000. **30**(12-13): p. 1269-81.
173. Berrahal, F., et al., *Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting.* Am J Trop Med Hyg, 1996. **55**(3): p. 273-7.

174. Courtenay, O., et al., *Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission*. J Infect Dis, 2002. **186**(9): p. 1314-20.
175. de Oliveira Mendes, C., et al., *IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniosis*. Vaccine, 2003. **21**(19-20): p. 2589-97.
176. Castelli, M., et al., *Peptide-based vaccinology: experimental and computational approaches to target hypervariable viruses through the fine characterization of protective epitopes recognized by monoclonal antibodies and the identification of T-cell-activating peptides*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 521231.
177. Gori, A., et al., *Peptides for immunological purposes: design, strategies and applications*. Amino Acids, 2013. **45**(2): p. 257-68.
178. Chamakh-Ayari, R., et al., *In vitro evaluation of a soluble Leishmania promastigote surface antigen as a potential vaccine candidate against human leishmaniasis*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e92708.
179. Firbas, C., et al., *Immunogenicity and safety of a novel therapeutic hepatitis C virus (HCV) peptide vaccine: a randomized, placebo controlled trial for dose optimization in 128 healthy subjects*. Vaccine, 2006. **24**(20): p. 4343-53.
180. Pietersz, G.A., D.S. Pouniotis, and V. Apostolopoulos, *Design of peptide-based vaccines for cancer*. Curr Med Chem, 2006. **13**(14): p. 1591-607.

Annexes

ANNEXE 1

Quantification de l'expression du gène *LIPSA-50S* par qPCR

Les formes promastigotes des différentes souches sont récoltées en phase stationnaire de croissance (7 jours), centrifugées à 3000g pendant 10 min et les culots parasites sont conservés à -20°C avec dans du RNA Protect Cell Reagent (Qiagen).

Les ARN totaux de ces culots parasites sont extraits à l'aide du Kit « Nucleospin RNA XS » (Machery Nagel) suivant les instructions du fournisseur. L'ARN est quantifié au nanodrop à 260nm et 1500ng d'ARN sont rétrotranscrits en ADNc à l'aide du kit « Superscript Vilo cDNA synthesis » (Invitrogen), suivant les instructions du fournisseur. La concentration en ADNc pour chaque échantillon est diluée à une concentration finale de 50ng/μL.

- **Rétrotranscription des ARN en ADNc (RT-PCR) :**

- Préparation du mix :

Concentration initiale	Volume	Concentration finale
VILO™ Reaction Mix 5X	4 μL	1X
SuperScriptR Enzyme Mix 10X	2 μL	1 X
ARN totaux	x	1500ng
DEPC-treated water	$Y = 20 - 4 - 2 - x$	Qsp 20μl

- Programme de la PCR :

Condition de la RT-PCR	
10 min	25°C
60 min	42°C
5 min	85°C

- **Quantification de l'expression du gène d'intérêt (qPCR) :**

Des amorces spécifiques ont été conçues pour amplifier spécifiquement l'expression du gène *LiPSA-50S*.

- Préparation du mix :

Concentration initiale	Volume	Concentration finale
Master mix SYBR Green 2X (Roche)	5 µL	1X
Amorces spécifiques de <i>LiPSA-50S</i> 10µM		
VGII11F : 5'AGTGACTTGTGGGAAATCG ^{3'}	0,6 µL de chaque amorce	0,6 µM de chaque amorce
VGII11R : 5'ACAACTCTCAATCCACAACG ^{3'}		
Amorces spécifiques de la <i>GAPDH</i> 10µM		
GAPDH : 5'GTGAACCAGCAGAGTACTC ^{3'}	0,6 µL de chaque amorce	0,6 µM de chaque amorce
GAPDH : 5'GAGTGAATGGTGGTCATCAG ^{3'}		
ADNc 50ng/µL	1 µL	5 ng/µL
H ₂ O	2,8 µL	Qsp 10 µL

- Programme de la PCR :

Condition qPCR sur le LightCycler 480 (Roche)		
5min	95°C	
30sec	94°C	40 cycles
30sec	60°C	
30sec	72°C	
7min	72°C	

ANNEXE 2

Quantification des immunoglobulines G et leurs isotypes par ELISA

- **Matériel :**

- Anticorps de capture :

Isotypes recherchés	Anticorps de capture utilisés
Anticorps purifié dirigé contre les IgG	Rat anti-Mouse IgG, AbD Serotec
Anticorps purifié dirigé contre les IgG1	Rat anti-Mouse IgG1, Becton Dickinson
Anticorps purifié dirigé contre les IgG2a	Rat anti-Mouse IgG2a, Becton Dickinson
Anticorps purifié dirigé contre les IgG2b	Rat anti-Mouse IgG2b, Becton Dickinson

- Gammes étalons :

Isotypes à doser	Anticorps purifiés utilisés pour la gamme
IgG	Purified mouse IgG, AbD Serotec
IgG1	Purified mouse IgG1, Becton Dickinson
IgG2a	Purified mouse IgG2a, Becton Dickinson
IgG2b	Purified mouse IgG2b, Becton Dickinson

- Échantillons à doser : sérums de souris

Isotypes à doser dans les sérums	Dilution des sérums
IgG	1/4000
IgG1	1/3000
IgG2a	1/3000
IgG2b	1/5000

- Anticorps secondaires couplés HRP :

Isotypes à doser dans les sérums	Anticorps secondaires utilisés	Dilution des anticorps secondaires
IgG	Goat anti-mouse IgG, SantaCruz Biotechnologies	1/1000
IgG1	Goat anti-mouse IgG1, SantaCruz Biotechnologies	1/2000
IgG2a	Goat anti-mouse IgG2a, SantaCruz Biotechnologies	1/1000
IgG2b	Goat anti-mouse IgG2b, SantaCruz Biotechnologies	1/1000

- **Préparation des solutions tampons :**

- Tampon carbonate-bicarbonate (pour 1L) :

Peser 1.59g Na_2CO_3 (Sodium Carbonate)

Peser 2.93g NaHCO_3 (Sodium Bicarbonate)

Dissoudre dans qsp 1L H_2O osmosée

Vérifier le pH : doit être à 9.6 sans ajustement

- Tampon citrate (pour 500ml) :

Préparer de l'acide citrique 0.1M (pour 500mL de solution, peser 9.6g d'acide citrique, et dissoudre dans qsp 500ml d'eau osmosée)

Préparation du tampon citrate : (500mL)

Peser 14.2g de Na_2HPO_4

Ajouter 20mL d'eau osmosée

Placer l'électrode du pHmètre dans la solution

Ajouter le volume d'acide citrique 0.1M nécessaire pour obtenir un pH 5

Ajouter eau osmosée qsp 500mL

ANNEXE 3

Quantification des immunoglobulines G et de leurs isotypes dirigés contre la protéine LaPSA-38S par ELISA

- **Matériel :**

- Gammes étalons :

Isotypes à doser	Anticorps purifiés utilisés pour la gamme
IgG	Purified mouse IgG, AbD Serotec
IgG1	Purified mouse IgG1, Becton Dickinson
IgG2a	Purified mouse IgG2a, Becton Dickinson
IgG2b	Purified mouse IgG2b, Becton Dickinson

- Échantillons à doser : sérums de souris

Isotypes à doser dans les sérums	Dilution des sérums
IgG	1/800
IgG1	1/400
IgG2a	1/100
IgG2b	1/100

- Anticorps secondaires couplés HRP :

Isotypes à doser dans les sérums	Anticorps secondaires utilisés	Dilution des anticorps secondaires
IgG	Goat anti-mouse IgG, SantaCruz Biotechnologies	1/1000
IgG1	Goat anti-mouse IgG1, SantaCruz Biotechnologies	1/2000
IgG2a	Goat anti-mouse IgG2a, SantaCruz Biotechnologies	1/1000
IgG2b	Goat anti-mouse IgG2b, SantaCruz Biotechnologies	1/1000

- **Préparation des solutions tampons :**

Voir Annexe 2.

ANNEXE 4

Production et purification de la protéine *LaPSA-12S*

Le gène *LaPSA-12S* a été cloné dans le vecteur pBluescript-SK. Le vecteur pBluescript-SK contenant la séquence du gène *LaPSA-12S* a ensuite été digéré par des endonucléases spécifiques BamHI et KpnI (Eurogentec), compatibles avec le site de clonage du vecteur pQE-31 (Qiagen) permettant l'expression de protéines en système procaryote. Le fragment ADN BamHI-KpnI généré a été extrait d'un gel d'agarose et purifié grâce au kit « Wizard™ DNA clean-up system » (Promega) en suivant les instructions du fournisseur. La ligation du fragment d'ADN purifié avec le plasmide pQE-31, préalablement digéré avec BamHI et KpnI et déphosphorylé, a été effectuée en utilisant la T4 DNA ligase (Promega). Le plasmide contenant l'insert a ensuite été introduit dans la souche M15 d'*E. Coli* (Stratagène) par choc thermique. Plusieurs clones ont été séquencés afin de sélectionner ceux ayant intégré l'insert dans le bon cadre de lecture. Ces clones ont enfin été utilisés pour produire et purifier la protéine recombinante *LaPSA-12S* par chromatographie d'affinité sur colonne de Nickel (Ni-NTA Agarose Qiagen).

ANNEXE 5

Brevet : Composition vaccinale pour la prévention et/ou le traitement de leishmanioses, peptides immunogènes et procédé d'obtention

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)	
(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle Bureau international (43) Date de la publication internationale 4 juin 2015 (04.06.2015)	
(10) Numéro de publication internationale WO 2015/079420 A2	
<hr/>	
(51) Classification internationale des brevets : Non classée (21) Numéro de la demande internationale : PCT/IB2014/066425 (22) Date de dépôt international : 28 novembre 2014 (28.11.2014) (25) Langue de dépôt : français (26) Langue de publication : français (30) Données relatives à la priorité : 13/61823 29 novembre 2013 (29.11.2013) FR	(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
(71) Déposants : INSTITUT DE LA RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (IRD) [FR/FR]; Immeuble le Sextant, 44 Bd de Dunkerque, CS 90009, F-13572 Marseille Cedex 02 (FR). VIRBAC [FR/FR]; 1ère avenue - 2065 M - L.L.D., F-06516 Carros (FR). (72) Inventeurs : LEMESRE, Jean-Loup; 138 Avenue de Lodève Bât. 6 1D, F-34090 Montpellier (FR). PAPIEROK, Gérard-Marie; D2 Résidence le Palais d'Orchidée, 2 bis avenue du Soleil Levant, F-83400 Hyères (FR). BRAS GONCALVES, Rachel Elise; 48 place du Ventoux, F-34090 Montpellier (FR). PETITDIDIER-LESEN, Elodie; 81 avenue du Pic Saint Loup, F-34090 Montpellier (FR). (74) Mandataires : DONG, Ying et al.; Cabinet ARMEN-GAUD AINE, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).	(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée : — sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2.g) — avec la partie de la description réservée au listing des séquences (règle 5.2.a)
<hr/>	
(54) Titre : VACCINE COMPOSITION FOR PREVENTING AND/OR TREATING LEISHMANIASSES; IMMUNOGENIC PEPTIDES; AND METHOD FOR OBTAINING SAME (54) Titre : COMPOSITION VACCINALE POUR LA PREVENTION ET/OU LE TRAITEMENT DE LEISHMANIOSES, PEPTIDES IMMUNOGENES ET PROCEDE D'OBTENTION (57) Abstract : The invention relates to the use, as a vaccine molecule in a mammal, of a PSA, such as a Leishmania PSA, or a part of said PSA having immunogenic properties. Said PSA, hereinafter referred to as "ES PSAr", is in a soluble, native, recombinant form. The invention also relates to a vaccine composition for preventing and/or treating Leishmaniasis containing an ES PSAr protein. (57) Abrégé : L'invention vise l'utilisation, comme molécule vaccinale chez un mammifère, d'une PSA, telle qu'issue de leishmanie, ou une partie de cette PSA possédant des propriétés immunogènes, ladite PSA désignée ci-après par ES PSAr, se présentant sous forme soluble, native, recombinante. Elle vise également une composition vaccinale pour la prévention et/ou le traitement des leishmanioses comprenant une protéine ES PSAr.	



WO 2015/079420 A2

ANNEXE 6

Publication en revue dans le journal PLOS Neglected Tropical Diseases

Recombinant forms of *Leishmania* excreted secreted PSA induce protective immune responses in dogs

Elodie Petitdidier¹, Julie Pagniez¹, Gérard Papierok², Philippe Vincendeau³, Jean-Loup Lemesre^{1*} and Rachel Bras-Gonçalves¹

¹ IRD, UMR INTERTRYP, 34394 Montpellier, France

² Virbac animal health, 06510 Carros, France

³ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Bordeaux-GH Pellegrin, 33076 Bordeaux, France

Running title: Excreted/secreted PSA protection in dogs

* Corresponding author :

Jean-Loup Lemesre, Institut de Recherche pour le Développement, UMR 177 IRD-CIRAD INTERTRYP "Interactions Hôtes-Vecteurs-Parasites-environnement dans les maladies infectieuses à Trypanosomatidae", 911, avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5, France

E-mail : jean-loup.lemesre@ird.fr Fax : 33 (0)4 67 41 63 30, Tel : 33 (0)4 67 41 62 20

Summary. Preventive vaccination is a highly promising strategy for interrupting leishmaniasis transmission that can, additionally, contribute to elimination. A formulation related to the *LiESAP* vaccine using naturally excreted secreted antigens purified from *L. infantum* promastigotes culture supernatant achieved successful results in Phase III trials and was licensed by Virbac (Carros, France) for commercialization as CaniLeish®. We recently showed that newly identified PSA, naturally excreted secreted by both viable promastigotes and axenically-grown amastigotes, represented the major constituent and the highly immunogenic antigen of *L. infantum* and *L. amazonensis* excretory secretory products. We report here that three immunizations with either the recombinant excreted secreted *LaPSA-38S* (rPSA) or its carboxy terminal part *LaPSA-12S* (Cter-rPSA) combined with QA-21 as adjuvant confer high levels of protection in naïve Beagle dogs experimentally infected by *L. infantum*

promastigotes, as determined by negative parasite contents in bone marrow aspirates of respectively 78.8 % and 80 % of vaccinated dogs at 6 months post-challenge. The parasite burden in infected vaccinated dogs was significantly reduced compared to placebo group, as demonstrated by the lower infection intensity using q-PCR. Moreover, our results demonstrate clear differences in humoral and cellular immune responses between vaccinated and placebo groups. Noteworthy, a significant and early increase in specific IgG2 antibodies was only observed in rPSA/QA-21 and Cter-rPSA/QA-21-immunized dogs. They were found functionally active *in vitro* and were highly correlated with vaccine protection. Enhanced production of IFN- γ and NO, and significant increase in leishmanicidal macrophage activity were evidenced only in vaccinated protected dogs. These data strongly suggest that the excreted/secreted PSA or its carboxy-terminal sequence in recombinant forms induce protection in a canine model of zoonotic visceral leishmaniasis by inducing a Th1-dominant immune response and an appropriate specific antibody response. The above considerations support the hypothesis that they could be considered as an important active constituent of CaniLeish[®] and as promising vaccine candidates.

Author summary Visceral leishmaniasis (VL) is a potentially fatal disease caused by *L. infantum*/*L. chagasi* that perfectly represents the need for a “One Health” approach for disease control, since it affects both humans and dogs, with similar clinical outcome and commitment of T-cell mediated immunity. As most available methods for VL treatment and control are of limited effectiveness, the dog vaccine development is highly desirable and would represent the most practical and efficient control tool, reducing the dog-sandfly-dog transmission cycle, essential for the reduction of human incidence. The results indicate that recombinant forms of soluble PSA are very promising as effective vaccine candidates against canine VL. The elicited immune responses effectively reduced the *L. infantum* load in pre-infected macrophages *in vitro* and in experimentally infected dogs. Through this approach we aim to decrease the number of dogs developing progressive infections thereby influencing human Public Health.

Keywords: *Leishmania*, recombinant excreted/secreted PSA, vaccine, dogs, immune responses, protection.

1. Introduction

Leishmaniasis is among the most severe parasitic infections affecting humans and dogs in the world. Currently the third most important vector-borne diseases responsible for the second-highest number of deaths due to parasitic infections worldwide, leishmaniasis is overwhelmingly associated with poverty as important neglected and uncontrolled tropical diseases [1]. Infection is caused by obligate intracellular protozoan parasites of the genus *Leishmania*, transmitted by the bite of different species of phlebotomine sandflies as extracellular flagellated promastigotes. They replicate as intracellular amastigotes within mononuclear phagocytes in mammalian hosts [2-4]. According to WHO, the number of leishmaniasis cases accounts for more than 12 million in Asia, India, Africa, the Mediterranean region, Southern Europe (Old World) and South and Central America (New World), where a further 350 million people is at risk of contracting leishmaniasis and 1.5 - 2 million new cases occur annually [5, 6]. Most of them likely go unreported [1]. *Leishmania* parasites cause a wide spectrum of human diseases ranging from asymptomatic disease, self-healing cutaneous (CL), to disfiguring diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) or mutilating mucosal infections (MCL), and from subclinical to acute visceral disease (VL) that results in death in susceptible people, causing more than 59,000 deaths annually [1, 7].

Visceral leishmaniasis (VL) is a severe and frequently lethal disease of increasing incidence and severity due to infected human and dog migrations, new geographical distribution of the insect vector due to environmental changes, co-infection with immunosuppressive diseases, the urbanization of the disease after deforestation and poverty [8-12]. This leads to an increased incidence and/or a geographical extension in many regions of the world [13]. Wild canids and domestic dogs represent the main reservoirs of *Leishmania infantum* in the Mediterranean region, several Middle East, African and Asian countries, and of *L. chagasi* in South and Central America and probably southern US [14-16]. Canine VL is a severe disease characterised by chronic evolution of viscerocutaneous signs which occur in less than 50% of infected dogs [17, 18]. Canine *L. infantum* infection has a major importance in Europe from both a public health and veterinary standpoint. From the public health perspective, the dog is unequivocally recognized as the main reservoir for *L. infantum*/*L. chagasi*, continuously supplying the transmission cycle [1]. Moreover, it has been estimated that at least 2.5 million dogs are infected in southwestern Europe [19]. Both symptomatic and asymptomatic dogs are infective to phlebotomine vectors [20, 21] and are involved in the transmission of VL in humans [22].

In the absence of effective and low-cost drugs for mass administration, priority control measures for elimination aim at reducing the transmission of VL, including: serological and parasitological diagnosis of infectious dogs and humans, treatment by chemotherapy, and reduction of the vector population and its effectiveness in transmission using indoor residual spraying, insecticide impregnated dog collars, and long-lasting insecticide bednets [23]. But such measures remain difficult to develop, expensive and finally poorly effective. Therefore, preventive vaccination is a highly promising strategy for interrupting VL transmission. The use of a preventive canine vaccine represents the most practical and efficient control tool [23-25] and could contribute to elimination [10, 26].

Our interest in *Leishmania* excreted/secreted molecules was supported by previous studies showing interesting immunological properties in terms of protection that are likely due to the disruption of macrophages activation and their *in vivo* functions [27-34]. In recent years, a vaccine based on *L. infantum* promastigote naturally excreted secreted antigens (LiESAp) achieved successful results in Phase III trials [28, 33]. This vaccine was commercialized in Europe as CaniLeish® by Virbac company since 2011 [28, 33, 35]. These studies emphasized that *Leishmania* excreted/secreted molecules contain antigens highly protective in experimental and natural vaccine models. More recently, we identified and characterized new *Leishmania* promastigote surface antigens, LaPSA-38S and LiPSA-50S, as major immunodominant excreted secreted components of *L. amazonensis* and *L. infantum*, respectively [36]. Members of this multi-gene family have been already described in *Leishmania* and the existence of membrane-bound members of the PSA family, such as the PSA-2 gene have been well documented [37-41]. PSA proteins are involved in *Leishmania* attachment and invasion of host macrophages *via* interactions with the complement receptor 3 (CR3) [42] and in resistance to complement lysis [43]. Previous studies indicate that native PSA-2 complex proteins are strong inducers of Th1 immune response in humans [44] and confer protection against virulent challenge in the mouse experimental infection [45]. We also clearly demonstrated that the native excreted secreted LaPSA-38S protein in recombinant form (rPSA) stimulates an appropriate Th1-dominant cell-mediated immune response within an overall mixed Th1/Th2 profile and a cytotoxic response in individuals with immunity against *L. major* and *L. infantum* infection, respectively [29]. Moreover, rPSA was selectively recognized by LiESAp-vaccinated and protected dogs [36]. We hypothesize that this protein could constitute a potential candidate for a next second generation vaccine design.

We report here an experimental vaccination trial on naïve Beagle dogs using the recombinant excreted secreted LaPSA-38S antigen (rPSA) and the recombinant LaPSA-12S antigen (Cter-rPSA), a truncated polypeptide corresponding to the carboxy terminal part of the LaPSA-38S, as vaccine candidates. Nineteen naïve Beagle dogs were divided in a double-blind randomized fashion into three

experimental groups that received three subcutaneous injections at 4-week interval of dose of either buffer saline (Placebo group) or of recombinant *L* α PSA-38S adjuvanted with QA-21 (rPSA group) or of *L* α PSA-12S polypeptide formulated with QA-21 (Cter-rPSA group). The humoral response and the cellular immune status of placebo and vaccinated dogs were analyzed prior and at different time points after vaccination. Vaccinated dogs had significantly higher levels of specific and efficient IgG2 antibodies. Moreover, they selectively developed an early and specific appropriate Th1-dominant cellular immune response as demonstrated by enhanced NO-mediated anti-leishmanial activity of canine monocyte-derived macrophages (CM-DM) in response to higher IFN- γ production by T-cells. We also demonstrated that this dominant Th1 immune profile produced by vaccinated dogs conferred good levels of protection against an intravenous experimental challenge with virulent *L. infantum* promastigotes.

2. Results

1. Local and/or general reactions upon vaccination

No local and/or general adverse reactions were observed in all immunized dogs. They remained at a constant body weight. No hyperthermia was induced. The overall tolerance of the candidate vaccine in dogs appeared as satisfactory.

2. Protection against canine visceral leishmaniasis

Dogs were monitored for parasite establishment and subsequent development of the disease by routine screening for classical clinical signs and assessment parasite load. Infection of dogs was assessed at 2, 4 and 6 months post-challenge.

2.1. Clinical manifestations

Immunized dogs were checked monthly for the appearance of external clinical manifestations until 6 months after administration of the parasites. Nevertheless, no obvious clinical signs of leishmaniasis were observed in any of the dogs during the entire period of the follow-up.

2.2. Parasite content in bone marrow aspirates

The presence of *Leishmania* parasites in sub-culturing bone marrow aspirates (figure 1A), the presence of parasite DNA (figure 1B) and the parasite loads using q-PCR (figure 1C) were determined for the three groups of dogs at 2, 4 and 6 months post-challenge. As shown in figure 1 (A and B), there are significant differences in the percentage of infected dogs between the placebo group and the groups of vaccinated dogs during the post-challenge period. In the control group (n=5), three and five dogs were culture positive at 4 months and 6 months respectively, whereas all the animals were PCR-positive at every time point. By contrast, only two (culture-positive) and one (PCR-positive) out of five dogs vaccinated with Cter-rPSA were found parasite-positive at 4 months and only one remained infected (PCR- and culture- positive) at the end of the study (6 months). In the group of dogs vaccinated with rPSA (n=9), 88.9 % and 78,8 % of animals were found free of *Leishmania* (PCR-negative and culture-negative) at 4 months and 6 months post-challenge, respectively. Group data for bone marrow parasite loads are presented in figure 1C. Mean values were significantly lower in the groups of vaccinated dogs (rPSA: $p= 0.019$ and 0.004 ; Cter-rPSA: $p= 0.018$ and 0.031) than in the placebo group at 4 and 6 months post-infection, respectively.

3. Specific IgG2 antibody responses to leishmanial antigens in vaccinated and control dogs

As shown in figure 2, specific IgG2 antibody responses against rPSA (A), Cter-PSA (B) and LiESAp (C) were measured by ELISA technique in all serum samples. Immediately before immunization (T0), all dogs from the three groups showed baseline low level of specific IgG2 antibodies. A similar weak specific IgG2 response was observed in dogs from the placebo group at different times post-immunization (T3 and T5). Interestingly, dogs vaccinated with rPSA/QA-21 and Cter-rPSA/QA-21 showed significantly higher levels of anti-LiESAp [except for Cter-rPSA group: $p=0.0420$ and $p=0.4206$, respectively (figure 2C)], anti-rPSA [$p=0.0033$ and $p=0.0010$, respectively (figure 2A)] and anti-Cter-rPSA [$p=0.0119$ and $p=0.0079$, respectively (figure 2B)] IgG2 antibodies were detected as early as one month after the second dose of vaccine candidates (T3) compared to placebo group for the same period. Specific IgG2 antibody titers remained significantly higher in vaccinated dogs compared to those of placebo animals two months after the third injection (T5). Overall, our data indicate that humoral response (IgG2 anti-leishmanial antigens) in the vaccinated groups was significantly higher than in the placebo groups.

4. Anti-leishmanial activity of canine monocyte-derived macrophages after incubation with peripheral lymphocytes from non-immune and immune dogs

Macrophage ability to kill *Leishmania* when pre-infected macrophages were exposed to autologous lymphocytes derived from canine PBMC is presented in the figure 3, expressed as percentage of

parasite index inhibition. Anti-leishmanial activities were evaluated immediately before immunization (T0) and two months after the third injection (T5). Results indicated that macrophages of all groups can be readily infected with *L. infantum* promastigotes. Before co-cultures, macrophages from placebo dogs were infected in a similar manner to those from animals of other groups (data not shown). At this starting point (T0), the assay did not reveal any anti-leishmanial activity in any of the dogs, either placebo and vaccinated groups (figure 3). By contrast, statistical differences were obtained between vaccinated and placebo groups two months after the completion of vaccine administration (T5). As shown in figure 3, higher leishmanicidal activities were evidenced by infected macrophages from dogs vaccinated with rPSA/QA-21 or Cter-rPSA/QA-21 after exposure to autologous lymphocytes as demonstrated by a significant parasitic index inhibition (86,4% and 63,8%, respectively) compared to placebo group (13,5%) ($p=0.0033$ and $p=0.0119$, respectively).

5. Cytokine production

The IFN- γ , IL-4 and IL-10 contents in supernatants of co-cultured cells from placebo and vaccinated dogs were evaluated prior immunization (T0) and at two months after the third injection (T5). As indicated in figure 4A, supernatants of co-cultured cells from all pre-immune dogs expressed IFN- γ levels in the range of 0.05 ng per ml. No significant increase in IFN- γ amount was observed in supernatants of pre-infected co-cultured macrophages from dogs of placebo group at T5. In contrast, supernatants of pre-infected canine macrophages upon activation with autologous T-cells from vaccinated dogs (rPSA/QA-21 and Cter-rPSA/QA-21) exhibited a significant higher IFN- γ activity (1.98 +/- 0.66 ng/ml, $p=0.0010$ and 1.99 +/- 0.59 ng/ml, $p= 0.0079$, respectively) than those from placebo (0.060 +/-0.007) and pre-immune dogs (0.052 +/-0.006) (figure 4A).

IL-4 level and IL-10 production measured in supernatants of co-cultured cells from vaccinated dogs (rPSA and Cter-rPSA) were low and did not differ significantly from those determined in supernatants of cells derived from placebo animals prior (T0) and 2 months after the vaccine course (T5) (data not shown).

6. Production of NO derivatives

The accumulation of NO $_3^-$ /NO $_2^-$ (NO derivatives) in supernatants of co-culture cells was directly correlated with the activation of the NO pathway and the intracellular killing of *L. infantum* amastigotes (figure 4B). The rates of NO production by canine co-cultured macrophages of placebo and vaccinated groups were also determined at the different time points analyzed prior immunization (T0) and two months after the third injection (T5). Infected macrophages of placebo

dogs produced low NO levels of about 0.6 nmol/10⁵ cells/72 hours when they were cultured in RPMI medium alone (data not shown) or co-cultured with autologous lymphocytes derived from placebo dogs (figure 4B). As shown in the figure 4B, the NO levels produced by macrophages from vaccinated dogs (rPSA/QA-21 and Cter-rPSA/QA-21) were significantly higher (20.75 +/- 4.88 nmol/10⁵ cells/72 hours, $p=0.0009$ and 12.24 +/- 4.48 nmol/10⁵ cells/72 hours, $p=0.0069$, respectively) than those evaluated before vaccination (0.52 +/- 0.06 nmol/10⁵ cells/72 hours) and in cell supernatants from placebo dogs at T5 time point (0.50 +/- 0.07 nmol/10⁵ cells/72 hours). Moreover, the mean value was significantly higher in the group of dogs vaccinated with rPSA/QA-21 compared to the group of dogs vaccinated with Cter-rPSA/QA-21 ($p=0.012$).

7. Effect of immunized dog sera on the in vitro viability and proliferation of promastigotes of *L. infantum*

Viability percentages of untreated promastigotes of *L. infantum* were closely similar with those of parasites treated for 30 min with sera of placebo dogs at dilution 1/4, collected two months after the third injection (T5). More than 90% of promastigotes remained healthy and viable. In contrast, 30 min exposure of promastigotes with sera of vaccinated dogs at the same dilution and the same time point (T5) revealed around 45 % of viability (data not shown). The anti-proliferative effects on the growth of promastigotes of *L. infantum* were evaluated by exposing 30 min to serum samples from placebo and vaccinated dogs [rPSA (n=9) or Cter-rPSA (n=5)], washing and culturing for 72 h under standard culture conditions. As shown in the figure 5, previous treatment of the promastigotes with sera of placebo dogs collected at T5 did not affect parasite's growth. However, a significant growth inhibitory effect was observed on the proliferation of promastigotes of *L. infantum* previously incubated with sera of vaccinated dogs collected at T5 (rPSA: $p=0.0010$, Cter-rPSA: $p=0.0079$, respectively) as determined by the parasite concentrations established in the entire 72-h culture period.

3. Discussion

In this study, we report that naïve Beagle dogs immunized twice with either the recombinant excreted secreted LaPSA-38S (rPSA) or the recombinant LaPSA-12S corresponding to the C terminal part of LaPSA-38S (Cter-rPSA) combined with QA-21 as adjuvant conferred high levels of protection against experimental infection by *L. infantum* promastigotes. Negative parasite contents in bone marrow aspirates of 77.8 % and 80.0 % vaccinated dogs respectively at 6 months post-challenge

follow-ups provided the evidence. Moreover, the parasite burden was significantly reduced in the three infected vaccinated dogs as demonstrated by the lower infection intensity using q-PCR. These data strongly suggest that the excreted secreted PSA and its carboxy-terminal part might be considered as an important active constituent of the CaniLeish[®] vaccine. The presence or absence of parasitemia was determined by very sensitive methods such as culturing and PCR. Using specific and very sensitive parasitological tests presented the advantage to detect early-infected dogs, while clinical canine VL cases are distant end-points which occur much later in the development of infection [10, 49, 50].

Leishmaniasis control remains a source of grave health concern worldwide. Control measures for canine VL rely primarily on serological survey and chemotherapy (“screen and treat” strategy) and are worsened by difficulty in health care access by the poorest populations at greater risk of exposure. Rapid serological diagnostic tests have been developed and are implemented as primary diagnostic tools when combined with clinical symptoms [51-53]. Molecular tests might constitute an alternative to detect dogs that are actively infected [54]. Drug treatments are highly toxic and many relapse cases occurred. Problems of emerging parasite resistance to the cheapest first-line treatment option (pentavalent antimonials) seriously limit their usefulness [55]. Moreover, treatment of infected dogs is of limited effectiveness as even the ones that respond to treatment may remain a parasite reservoir [56]. Furthermore, only some infected hosts are suspected as having clinical VL while the majority remains asymptomatic providing potential reservoirs [17, 51, 55-57]. Recent works suggest that treatment alone will not halt transmission of VL, and that other interventions are needed [58, 59]. One should also recognize that chemotherapy alone will not eliminate these diseases, because of the abundance of untreated carriers. The development of a safe, effective and affordable anti-leishmanial vaccine is a substantial goal for global public health and veterinary health. Preventive vaccination is a highly promising strategy for interrupting VL transmission and achieving elimination. Since defective cellular immune responses are restored after successful chemotherapy [60] and hosts who recover from leishmaniasis are usually refractory to further infection [49, 50, 61, 62], leishmaniasis remains one of the promising parasitic diseases for vaccine development.

Considerable effort has been made towards selecting potential *Leishmania* antigens as vaccine candidates as well as the best adjuvant for such vaccines [10, 63]. Initial attempts using inactivated vaccines prepared with killed or attenuated parasites, conceptually simple to produce in endemic areas at low cost, have performed disappointingly in field trials [8, 64]. Second-generation vaccines composed of whole cultured parasites or their excretory-secretory products have been tested under field conditions and made available in recent years. Only two vaccines for dogs achieved successful results in Phase III trials: Leishmune[®] (Fort Dodge Animal Health), prepared with a glycoprotein

known as the fucose mannose ligand of *Leishmania donovani* adjuvanted with QS-21 and deacylated saponins of *Quillajasaponaria*, has been licensed for use in Brazil [10, 65, 66] and a formulation related to the LiESAp vaccine using naturally excreted secreted antigens purified from *L. infantum* promastigotes culture supernatant combined to QA-21 as an adjuvant [27, 30, 32, 33, 67, 68] was licensed for commercialization as CaniLeish® in Portugal, Spain, France, Greece, and Italy since 2011 by Virbac Animal Health. The use of these vaccines in the immunotherapy of canine VL was also suggested [28, 69]. However, from the industrial point of view, growing protozoa and extracting native antigens is laborious, expensive and difficult to produce at low price in endemic areas, preventing a wide distribution. Many subunits of *Leishmania* antigens have already been described as promising vaccine candidates, and are even available in the recombinant form (reviewed by [70, 71]). But very few recombinant vaccines have advanced beyond the experimental stage in rodent models (mice, hamsters). This is consistent with the difficulty in developing a suitable animal model that reproduces the features of the natural infection and disease. Only LeishTec® vaccine composed of A2 antigen (a recombinant protein form) plus saponin conferred about 40% protection against an infectious challenge with *L. chagasi* promastigotes and has been registered in Brazil as a canine vaccine (Hertape Calier). However, several other vaccine candidates have been tested in dogs with less promising results. The multicomponent Leish-111f fusion protein containing the antigens TSA, LmSTI1, and LeIF, in formulation with MPL-SE or AdjuPrime, was immunogenic in dogs challenged with *L. chagasi* [72] and *L. infantum* [73], but failed to prevent *L. infantum* natural infection or disease progression in dogs in an open kennel trial [74, 75]. Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 did not protect dogs from *L. infantum* infection [76]. Histone H1, hydrophilic acylated protein B1 recombinant *Leishmania* vaccines, or *Leishmania* analog of activated C kinase receptor (LACK) antigen gave disappointing results in dog experimental trials [73, 74].

Recent technological advances have made possible to globally analyze the secretome of *Leishmania* [77, 78]. However, very little is known about functions of the *Leishmania* secretome since few of these molecules has been extensively characterized [77, 79, 80]. We recently showed that newly identified PSA, naturally excreted secreted by both viable promastigotes and axenically-grown amastigotes represent the major constituent and the highly immunogenic antigen of *L. infantum* and *L. amazonensis* excretory secretory products [29, 36]. Moreover this PSA was selectively recognized by vaccinated and protected dogs [36] and human cells from immune individuals [29]. Analysis of the recombinant rPSA and Cter-rPSA amino acid sequences for the prediction of secondary structure predicts the presence of α helix segments with a predominance of turn structure, especially in its carboxy-terminal part. This part contains a Threonine/Serine-rich domain and Proline/Cysteine-rich

regions, whose length varies considerably, and can be totally absent in some PSAs, and which are relatively conserved between *Leishmania* species [37]. The immunodominant humoral and cellular responses to this region might be linked to its proteolytic stability and hydrophobicity [40, 81, 82]. This suggests that excreted secreted PSA might have an important immunoregulatory role between parasites and their target cells and on the immune responses. Promastigotes might secrete PSA to modify macrophage functions even before parasite engulfment. Analogously, amastigotes might secrete PSA, transported across the parasitophorous vacuole membrane, to interfere with macrophage signaling pathways, thereby preventing macrophage activation. So, it is almost certain that, in *Leishmania* excreted secreted proteins, future candidates exist for new generation vaccine design.

Our results demonstrated clear differences in humoral and cellular immune responses between vaccinated and placebo groups. They were indicative of different regulatory mechanisms in protected and non-protected animals. Noteworthy, a significant and early increase in specific IgG2 antibodies was only observed in rPSA/QA-21 and Cter-rPSA/QA-21-immunized dogs and was highly correlated with vaccine protection. These results appear to support most studies defending the IgG2 predominance in vaccinated dogs. The IgG1 antibodies were associated with susceptibility and disease severity [83-85] while IgG2 were predominated in naturally resistant or vaccinated dogs [86-88]. IgG2 are, oftenly, associated with an appropriate Th1-dominant cell-mediated immune response whereas IgG1 correlates with a Th2 response. More recently, we provided direct evidence that cooperation of humoral response with cell mediated immunity might be essential in protective immunity in *LIESAp*/muramyl dipeptides vaccinated dogs [27]. We demonstrated here that inactivated sera from rPSA/QA-21 or Cter-rPSA/QA-21 -vaccinated dogs were found functionally active *in vitro*, promoting (i) early promastigotes killing and (ii) a significant growth inhibition of pretreated parasites. These results suggest that anti-rPSA and above all anti-Cter-rPSA antibodies might play an important role in protection against VL. We report here new evidence that a humoral mechanism, including an appropriate antibody response, might constitute an important element in an effective protective response, at least in canine VL.

Killing of *Leishmania* parasites by infected macrophages is critical in resolving an infection with this intracellular pathogen. To further characterize the protective cellular immune response generated in vaccinated dogs, we previously developed an *ex vivo* co-culture system of pre-infected canine macrophages exposed to autologous lymphocytes. This assay was used to determine the ability of canine monocyte-derived macrophages to be activated by the classical way to produce NO derivatives resulting in the killing of *Leishmania* parasites, when they were co-cultured with autologous canine lymphocytes. Enhanced production of IFN- γ and NO and significant increase in leishmanicidal

macrophage activity, were evidenced only in vaccinated protected dogs as early as one month after the second vaccine dose and lasted two months after the full vaccination course. This further argues that *Leishmania* killing is mediated by NO production *via* an L-arginine NO pathway, enhanced by cytokines derived from Th1-type lymphocytes such as IFN- γ . The above considerations support the hypothesis that excreted secreted PSA and its carboxy terminal sequence in recombinant forms induce protection in a canine model of zoonotic visceral leishmaniasis by inducing a Th1-dominant immune response and an appropriate specific antibody response. As NO and IFN- γ are also involved in human leishmaniasis, monitoring these parameters in vaccinees might represent markers of a protective response for vaccine development investigations and in large scale field studies. Overall, these promising results warrant further studies to evaluate these vaccine candidates against an important emerging disease in both humans and dogs in natural conditions of infection.

4. Materials and methods

1. Production and purification of vaccine candidates: LaPSA-38S (rPSA) and La PSA-12S (Cter-rPSA) recombinant proteins.

1.1. Preparation of LaPSA-38S (rPSA) recombinant protein

The *LaPSA-38S* gene (GenBank accession number: FJ974054, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), was cloned and identified as previously described [36], and was amplified from pBluescript-SK vector by PCR with Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) using the following primers: forward primer, F-PSA-38S (5'-CCATGGCGCAGTGCGTGCGG-3') and reverse primer, R-PSA-38S (5'-GCGGCCGCGTGATGGTGATGGTGATGATCGTGGTTCGCCAG-3'), containing *NcoI* and *NotI* restriction sites in each 5' end (underlined). DNA amplification was performed according to the following protocol: 5 min hot-start at 95°C followed by 30 cycles of 95°C for 30s, 62°C for 30s and 72°C for 90s, and a final extension at 72°C for 10 min. The purified PCR product was cloned in pCR2.1®-TOPO® TA vector using TOPO® TA cloning Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's procedures. The transformed cells *E. coli* TOP10 (Invitrogen) were screened for the presence of recombinant plasmid with the *LaPSA-38S* insert by gene-specific PCR and analysis with *NcoI* and *NotI* restriction enzymes. Isolated positive clones were sequenced. The insert was removed by *NcoI* and *NotI* digestion and subcloned into the *NcoI* and *NotI* insertion site of *Leishmania* expression vector pF4X1.4sat1 allowing selection with the antibiotic Nourseothricin to create the recombinant pF4X1.4-*LaPSA-38S* plasmid. The resulting construct, encoding a full sequence of *LaPSA-38S* secreted protein was fused to a C-

terminus (His6)-tag. *L. tarentolae* promastigotes were successfully maintained in continuous culture by successive passages of 5×10^5 flagellates/ml every week into 10 ml of completely defined CDM/LP medium free of serum, macromolecules, proteins and cell contaminants as previously described [34]. For stable integration of the expression cassette into the 18S ribosomal RNA (*ssu*) locus, 10 μ g of pF4X1.4sat1 plasmid containing *LaPSA-38S* gene was digested by *Swa*I restriction enzyme. Transfections of *L. tarentolae* promastigotes were performed by electroporation in 2 mm cuvettes using a Gene Pulser II (Biorad), a single pulse (5–6 msec) with the settings 450 V and 450 mF. After transfection, cells were transferred into a fresh CDM/LP medium [34]. 100 μ g/ml of Nourseothricin was added 24 h after electroporation to select stable transformants. One week later, only nourseothricin-resistant cells survived. Transgenic cells were selected as single colonies on the supplemented CDM/LP-agar medium containing 100 μ g/ml Nourseothricin (Jena Bioscience, Germany) as selective antibiotic.

Mass culture and protein purification were manufactured by Virbac Company in GMP conditions. Culture amplifications were performed on CDM/LP medium. The culture supernatant containing *L. amazonensis* excreted secreted *LaPSA-38S*, released by the parasite during its growth, was recovered at the late stationary phase of growth. The only proteins in the medium, with their native conformation, are parasite-produced. Recombinant excreted secreted PSA was purified from concentrated culture supernatant through Ni-NTA affinity chromatography. This purified recombinant *LaPSA-38S* protein migrated as a 45 kDa band in SDS-PAGE gel [29].

1.2. Preparation of recombinant *LaPSA-12S* (Cter-rPSA) protein

The *LaPSA-12S* gene (GenBank accession number: FJ974053) is a truncated *LaPSA-38S* gene corresponding to the C-terminal part of *LaPSA-38S* named Cter-rPSA, as previously described [36]. A pBluescript-SK vector with the cDNA encoding for *LaPSA-12S* gene was digested with specific endonucleases *Bam*HI and *Kpn*I (Eurogentec), compatible with multiple cloning site of pQE-31 vector (Qiagen). The final *Bam*HI–*Kpn*I-generated DNA fragment was extracted from agarose gel and purified using WizardTM DNA clean-up system (Promega) following the manufacturer's procedures. The purified DNA fragment was used in a ligation reaction in the presence of the *Bam*HI–*Kpn*I-digested and dephosphorylated pQE31 vector. The ligation product was transformed and propagated in *E. coli* M15 strain (Stratagene), purified and sequenced in both strands. The clones containing the correct coding frame were selected and used to prepare and purify the recombinant protein. Cter-rPSA was purified with Ni-NTA affinity chromatography. This purified truncated recombinant *LaPSA-12S* protein migrated as a 16 kDa band in SDS-PAGE gel (data not shown).

2. Animals and study design.

Nineteen young adult dogs, 10 males and 9 females, between 2 and 4 years old, were selected on clinical and serological criteria from a colony of naive Beagles from the kennel CEDS (Domaine des Souches, Mezilles, France). Dogs were housed at the animal facility of the National Veterinary School of Lyon (ENVL, France) in the “Unité d’Etudes PréCliniques” (UEPC) during the time course of the experiment under conditions designed to exclude any possible natural leishmanial infections. They were well-fed animals under constant scrutiny of health problems by a veterinarian and had all received their yearly routine vaccinations. Care and management of dogs were carried out according to ethical guidelines laid down in the National Veterinary School of Lyon (ENVL). Protocols were submitted to and approved by ethics committee of the ENVL (N° ICLB 135/08). All dogs had a specific code/ID throughout the experiment. The animals were maintained in quarantine for a period of 30 days before the initiation of the experiment. Prior to vaccination, blood was collected and then sera and genomic DNA of all dogs were separated and extracted in order to exclude any infected dog. Beagles were randomized by sex and age into three experimental groups and the study was performed in a double-blind randomized fashion. Dogs of each group received three subcutaneous injections at a 4-week interval of either freeze-dried dose of 1 ml buffer saline (Placebo group, n=5), 25 µg recombinant *La*PSA-38S adjuvanted with 20 µg QA-21 (rPSA group, n=9) or 25 µg recombinant *La*PSA-12S formulated with 20 µg QA-21 (Cter-rPSA group, n=5). Two months post-immunization, all dogs were challenged by intravenous injection of 10⁸ infective promastigotes of *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263 strain, clone 2). Primary cultures of virulent promastigotes, differentiated from amastigotes isolated from the spleen of heavily infected mice (BALB/c), were used for the virulent challenge.

3. Detection of specific IgG2 to *Li*ESAp, rPSA and Cter-rPSA by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Specific IgG2 antibody responses against rPSA, Cter-rPSA and *Li*ESAp were measured in the serum samples of control and vaccinated dogs by a standard ELISA procedure. Briefly, sera from immune or control dogs were added in triplicate at 1/50 dilution in PBS containing 0.05 % Tween-20 to 96-well plates previously coated with *Li*ESAp (1 µg per well, batch #0011), rPSA (0.1 µg per well, batch #A50054) or Cter-rPSA (0.1 µg per well, batch #070425). After 1 h incubation at 37°C, plates were washed extensively with PBS-0.05 % Tween-20 and incubated for 30 min at 37°C with secondary antibody (horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-dog IgG2, 1/5000). After three washes in PBS-0.05 % Tween-20, plates were developed with OPD substrate (with H₂O₂ in citrate buffer) and absorbance was read using microplate reader at 492 nm wavelength. For analysis, a threshold of

positivity was estimated by calculating a cut-off using the following formula: mean OD in sera collected from all dogs at the starting point (T0) + 3 standard deviations.

4. Effect of serum of unvaccinated and vaccinated dogs on the proliferation of promastigotes of *Leishmania infantum*.

Promastigotes of *Leishmania infantum* were collected by centrifugation and washed three times in PBS. 5×10^6 parasites were incubated (or not) with 100 μ l of complement-inactivated serum of dog for 30 min, at dilution $\frac{1}{4}$ in culture medium. These sera were collected from all dogs 2 months after vaccination. Cell's viability was assessed by trypan blue staining, the parasites were washed three times in PBS, and then cultivated at 25°C in 5 ml of RPMI medium supplemented with 20% foetal calf serum (FCS). Parasites were counted daily for three days by flow cytometry (FACSCanto, Becton Dickinson). Results are expressed in percentage of promastigote growth inhibition at day 3.

5. Assessment of canine monocyte-derived macrophages anti-leishmanicidal activity

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were obtained from heparinized peripheral blood by density centrifugation through Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Life Sciences). Canine monocyte-derived macrophages (CM-DM) and non-adherent cells (i.e. lymphocytes) were prepared by differential adherence of PBMC as previously described [30, 32]. CM-DM separated from lymphocytes were cultured for 5 days at 37°C and 5% CO₂ in RPMI 1640 medium (BioWhittaker), supplemented with 2 mM glutamine, 10% FCS, 100 μ g/ml streptomycin and 100 IU/ml penicillin. They were infected with stationary-phase promastigotes of *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263 strain, clone 2) at a parasite: macrophage ratio of 5:1 for 150 min in LabTek® 16-well glass chamber slides. Non-internalised parasites were removed by gentle washing. Infected macrophages were then incubated alone or in the presence of autologous lymphocytes at a lymphocyte: macrophage ratio of 2:1. After a 72-h co-culture, supernatants were collected for further analyses and the lymphocytes were removed by gentle washings. Macrophages were fixed with methanol and stained with Giemsa in order to determine the parasitic index. For assessment of anti-leishmanial activity, the percentages of infected cells and the number of amastigotes per macrophage were estimated in duplicate experiments by microscopic examination of Giemsa-stained preparation and were used to calculate the parasitic index (PI) inhibition. $PI \text{ inhibition} = 100 - [(\text{mean number of amastigotes per macrophage} \times \text{percentage of infected macrophages when macrophages were incubated with autologous lymphocytes}) / (\text{mean number of amastigotes per macrophage} \times \text{percentage of infected macrophages in untreated macrophages})] \times 100$.

6. Cytokines and nitric oxide measurements

IFN- γ , IL-10 and IL-4 levels were determined as previously described [30] in supernatants from 72-h co-cultured cells (pre-infected macrophages exposed to autologous lymphocytes) by a two-site sandwich Enzyme-Like Immunosorbent Assay (ELISA) using specific anti-dog IFN- γ (2 μ g/ml), anti-dog IL-4 (1 μ g/ml) and anti-dog IL-10 (1 μ g/ml) antibodies (R&D Systems, Minneapolis, USA), biotinylated anti-dog IFN- γ (100 ng/ml), anti-dog IL-4 (50 ng/ml) and anti-dog IL-10 (50 ng/ml) antibodies (R&D Systems, Minneapolis, USA) and streptavidin conjugated to horseradish peroxidase (1/200) (R&D Systems, Minneapolis, USA). Absorbance values were read at 490 nm wavelength in an automatic microplate reader (Wallac Victor2™ 1420 Multilabel counter, Perkin-Elmer life sciences). Standard curves for IFN- γ , IL-4 and IL-10, respectively, were performed by the use of recombinant canine proteins (R&D Systems, Minneapolis, USA).

NO₃/NO₂ accumulation in cell culture supernatants was used as an indicator of NO production by activated macrophages and was assayed by the Griess reaction using the nitrate/nitrite colorimetric assay of Alexis biochemicals. The Griess reagent was modified according to Pinelli *et al.* [46].

7. Clinical follow-up and assessment of parasite load.

The health status of the animals was followed by veterinarians routinely (including appetite, physical examination and physical activity). The dogs were monitored for 3 weeks after each injection. Local tolerance was investigated by direct visual examination and any lesions were scored daily over a period of 14 days after each injection. General tolerance was investigated by means of a weekly general clinical examination and a daily general health evaluation with rectal temperature measurement. Body weights were measured once a week throughout the trial period.

Dogs were monitored for parasite establishment and subsequent development of the disease by routine screening for classical clinical signs and parasite isolation. Infection was assessed at 2, 4 and 6 months post-challenge. For that, dogs were anesthetized and bone marrow aspirates were collected by sternal puncture into citrate tubes to assess parasite load.

The presence of *Leishmania* parasites was determined by culturing parasites in NNN biphasic medium at 25°C. Bone marrow samples (about 500 μ l) were cultured in NNN biphasic medium (containing 2 ml of RPMI-20% inactivated FCS) for 1 week. Subcultures were weekly realized by adding 0.5 ml or 1 ml of culture sample in NNN medium containing 3 ml of RPMI-20% FCS (4 subcultures). The presence of parasites was determined by regular microscopic observation for 20 min in an inverted microscope at 400x magnification. When parasites were observed, the sample was considered as parasite positive. All the animals included in this investigation were treated following the guidelines for animal experimentation of the National Veterinary School of Lyon, and

experiments were done in accordance with the institutional guidelines in order to keep the animal suffering the minimum as possible.

The presence of *Leishmania* DNA was also assayed in bone marrow samples of all the enrolled dogs by real-time quantitative PCR (qPCR) as previously described for kinetoplast DNA amplification [47]. After lysis, the DNA of each bone marrow sample was extracted using a silica column (QIAamp DNA mini kit). The Stratagene (La Jolla, California, USA) MX 4000 system was used for amplification and detection. Optimization experiments led us to use the Stratagene qPCR master mix (catalog number 600549-51), 15 pmol of forward primer (CTTTTCTGGTCCTCCGGGTAGG), 15 pmol of reverse primer (CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA), and 50 pmol of TaqMan probe (FAM-TTTTCGCAGAACGCCCTACCCGC-TAMRA). Assays were performed with a 25 µl final volume with 1 µl of DNA sample. The standard curve was established from *Leishmania* DNA extracted from 5×10^6 parasites; 1 µl of each serial dilution, ranging from 50,000 to 0.0001 parasites, was introduced into reaction tubes. TaqMan chemistry allowed two-step temperature (94 and 55°C) cycling over 45 cycles. Comparative quantification was performed by using a single copy gene, the DNA polymerase gene, as a normalizer. Primers and a probe described previously by Bretagne *et al.* [48] (TGTCGCTTGCAGACCAGATG [200 pmol], GCATCGCAGGTGTGAGCAC [200 pmol], and VIC-CCAGGCTCGAAGTTGTTGCTGCCC-TAMRA [200 pmol]) and the same working conditions as previously described for kinetoplast DNA amplification were used. Results were expressed as the number of parasites per ml of bone marrow aspirate. A sample was considered as positive when the established parasite concentration was superior to 40 parasites per ml.

8. Statistical analysis

Data analysis was performed with GraphPad Prism version 5.03 for Windows, GraphPad Software (San Diego, California USA). Statistical significance of differences between groups was determined by Mann-Whitney-Wilcoxon test. A p -value ≤ 0.05 was considered significant.

5. Acknowledgements

We thank Joana Pissarra for revising the language in the manuscript.

Author contributions. JLL and GP conceived and designed the experiments. EP, RBG, GP, and JP performed the experiments. EP and JLL analyzed and interpreted the data. JLL, EP, PV and RBG wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript

Funding. The work presented here was supported by the “Service de la Direction Générale des Entreprises” (DGE, convention FCE No. 072906234, FUI French Ministry) and the «Institut de Recherche pour le Développement» (IRD).

Competing interests. The authors have declared that no competing interests exist.

6. Legend to the figure

Figure 1: Parasitological evaluation of placebo and vaccinated dogs.

The presence of live *Leishmania* parasites was highlighted by sub-culture analysis of bone marrow aspirates isolated from dogs of placebo (n=5), rPSA/QA-21 (n=9) and Cter-rPSA (n=5) groups at 2, 4 and 6 months post-challenge (PC) (A). A sample was considered as positive when *Leishmania* parasites were detected during the seeding or sub-culture analysis.

The presence of *Leishmania* DNA (B) and the parasite load (C) in bone marrow aspirates of dogs of each group were assessed by quantitative PCR. Dogs were considered as positive when the titer was superior to 40 parasites per ml. Data are expressed as (B) the percentage of positive dogs at each time points post-challenge and (C) the mean number of parasites per ml of bone marrow aspirate at different times post-challenge (4 and 6 months) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Figure 2: Vaccine specific serological responses as detected by ELISA.

Evolution of levels of anti-rPSA (A), anti-Cter-rPSA (B) and anti-LiESAp (C) specific IgG2 antibodies in serum samples isolated from dogs of each group immediately before immunization (T0) and at different times post-immunisation: first month after the second dose (T3) and two months after the third dose (T5). Each serum sample was tested in triplicates. Cut-off value was calculated using the following formula: mean OD in sera from all dogs at T0 + 3 standard deviations. Values represent means OD +/- standard deviation of triplicate experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Figure 3: Anti-leishmanicidal activity of canine monocyte-derived macrophages in non-immune and immune dogs

The ability of pre-infected canine monocyte-derived macrophages to kill *leishmania* parasites when they were exposed to autologous peripheral lymphocytes derived from PBMC was expressed as the percentage of parasitic index inhibition after *in vitro* infection with *Leishmania infantum* promastigotes (MHOM/MA/67/ITMAP-263) and 72 h incubation with and without autologous

lymphocytes. Anti-leishmanicidal activity of co-cultured canine macrophages was evaluated immediately before immunization (T0) and two months after the third dose (T5). Values represent means +/- standard deviation of duplicate experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Figure 4: IFN- γ and NO derivative productions by 72 hours co-cultured canine macrophages from placebo and vaccinated groups of dogs (rPSA and Cter-rPSA).

(A) IFN- γ levels were determined by a two-site sandwich Enzyme-Like Immunosorbent Assay (ELISA) in cell culture supernatants of 72 hours co-cultured cells.

(B) NO₃⁻/NO₂⁻ accumulation in the same samples was used as an indicator of NO production by activated macrophages and was assayed using the modified Griess reaction according to Pinelli *et al.* [46].

Values represent means +/- standard deviation of triplicate experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Figure 5: Effect of immunized dog sera on the proliferation of *L. infantum* promastigotes

The anti-proliferative effects on the growth of promastigotes of *L. infantum* previously exposed for 30 min to serum samples from placebo (n=5) and vaccinated dogs [rPSA (n=9) or Cter-rPSA (n=5)], collected before immunization (T0) and at 2 months post-vaccination (T5), and then washed and cultured for 3 days at 25°C in 5 ml of RPMI medium supplemented with 20% foetal calf serum (FCS). At day 3, parasites were counted by flow cytometry (FACSCanto, Becton Dickinson) to assess cellular viability and parasite concentration. Results are expressed in percentage of promastigote growth inhibition +/- standard deviation (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

7. References

- [1] Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PloS one. 2012;7:e35671.
- [2] Bates PA. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. International journal for parasitology. 2007;37:1097-106.

- [3] Rogers ME, Hajmova M, Joshi MB, Sadlova J, Dwyer DM, Volf P, et al. Leishmania chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cellular microbiology*. 2008;10:1363-72.
- [4] Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual review of microbiology*. 2001;55:453-83.
- [5] Control of the leishmaniasis. World Health Organization technical report series. 2010:xii-xiii, 1-186, back cover.
- [6] Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2004;27:305-18.
- [7] Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature reviews Microbiology*. 2007;5:873-82.
- [8] Evans KJ, Kedzierski L. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. *Journal of tropical medicine*. 2012;2012:892817.
- [9] Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in parasitology*. 2011;27:403-9.
- [10] Palatnik-de-Sousa CB. Vaccines for canine leishmaniasis. *Frontiers in immunology*. 2012;3:69.
- [11] Palatnik-de-Sousa CB, Day MJ. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites & vectors*. 2011;4:197.
- [12] Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4:e584.
- [13] Otranto D, Dantas-Torres F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends in parasitology*. 2013;29:339-45.
- [14] Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends in parasitology*. 2012;28:531-8.
- [15] Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*. 2000;16:188-9.
- [16] Rioux JA, Lanotte G. *Leishmania infantum* as a cause of cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1990;84:898.
- [17] Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, et al. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1996;55:273-7.
- [18] Lanotte G, Rioux JA, Perieres J, Vollhardt Y. [Ecology of leishmaniasis in the south of France. 10. Developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniasis in relation to epidemiology. (author's transl)]. *Annales de parasitologie humaine et comparee*. 1979;54:277-95.

- [19] Athanasiou LV, Kontos VI, Saridomichelakis MN, Rallis TS, Diakou A. A cross-sectional sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in Greek mainland. *Acta tropica*. 2012;122:291-5.
- [20] Gradoni L, Gramiccia M, Mancianti F, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1988;82:568-71.
- [21] Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andres M, Gonzalez F, Castillo JA, et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994;88:491-3.
- [22] Laurenti MD, Rossi CN, da Matta VL, Tomokane TY, Corbett CE, Secundino NF, et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the natural vector. *Veterinary parasitology*. 2013;196:296-300.
- [23] Rock KS, le Rutte EA, de Vlas SJ, Adams ER, Medley GF, Hollingsworth TD. Uniting mathematics and biology for control of visceral leishmaniasis. *Trends in parasitology*. 2015;31:251-9.
- [24] Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1996;55:125-30.
- [25] Lee BY, Bacon KM, Shah M, Kitchen SB, Connor DL, Slayton RB. The economic value of a visceral leishmaniasis vaccine in Bihar state, India. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2012;86:417-25.
- [26] Bongiorno G, Paparcone R, Foglia Manzillo V, Oliva G, Cuisinier AM, Gradoni L. Vaccination with LIESP/QA-21 (CaniLeish(R)) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs--a preliminary xenodiagnosis study. *Veterinary parasitology*. 2013;197:691-5.
- [27] Bourdoiseau G, Hugnet C, Goncalves RB, Vezilier F, Petit-Didier E, Papierok G, et al. Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAP-MDP vaccinated protected dogs. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2009;128:71-8.
- [28] Bourdoiseau G, Hugnet C, Papierok G, Lemesre J. Canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*: immunotherapy trials. *Bull Acad Vet France*. 2004;157:63-7.
- [29] Chamakh-Ayari R, Bras-Goncalves R, Bahi-Jaber N, Petitdidier E, Markikou-Ouni W, Aoun K, et al. In vitro evaluation of a soluble *Leishmania* promastigote surface antigen as a potential vaccine candidate against human leishmaniasis. *PloS one*. 2014;9:e92708.
- [30] Holzmuller P, Cavaleyra M, Moreaux J, Kovacic R, Vincendeau P, Papierok G, et al. Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2005;106:247-57.

- [31] Hugnet C, Lemesre J, Papierok G, Bourdoiseau G. Results of vaccination against canine visceral leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in enzootic areas. *Bull Acad Vet France*. 2006;159:127-30.
- [32] Lemesre JL, Holzmuller P, Cavaleyra M, Goncalves RB, Hottin G, Papierok G. Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine*. 2005;23:2825-40.
- [33] Lemesre JL, Holzmuller P, Goncalves RB, Bourdoiseau G, Hugnet C, Cavaleyra M, et al. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine*. 2007;25:4223-34.
- [34] Merlen T, Sereno D, Brajon N, Rostand F, Lemesre JL. *Leishmania* spp: completely defined medium without serum and macromolecules (CDM/LP) for the continuous in vitro cultivation of infective promastigote forms. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1999;60:41-50.
- [35] Oliva G, Nieto J, Foglia Manzillo V, Cappiello S, Fiorentino E, Di Muccio T, et al. A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naive dogs exposed to two *leishmania infantum* transmission seasons. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8:e3213.
- [36] Bras-Goncalves R, Petitdidier E, Pagniez J, Veyrier R, Cibrelus P, Cavaleyra M, et al. Identification and characterization of new *Leishmania* promastigote surface antigens, LaPSA-38S and LiPSA-50S, as major immunodominant excreted/secreted components of *L. amazonensis* and *L. infantum*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014;24:1-14.
- [37] Devault A, Banuls AL. The promastigote surface antigen gene family of the *Leishmania* parasite: differential evolution by positive selection and recombination. *BMC evolutionary biology*. 2008;8:292.
- [38] Jimenez-Ruiz A, Boceta C, Bonay P, Requena JM, Alonso C. Cloning, sequencing, and expression of the PSA genes from *Leishmania infantum*. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1998;251:389-97.
- [39] McMahon-Pratt D, Traub-Cseko Y, Lohman KL, Rogers DD, Beverley SM. Loss of the GP46/M-2 surface membrane glycoprotein gene family in the *Leishmania braziliensis* complex. *Molecular and biochemical parasitology*. 1992;50:151-60.
- [40] Symons FM, Murray PJ, Ji H, Simpson RJ, Osborn AH, Cappai R, et al. Characterization of a polymorphic family of integral membrane proteins in promastigotes of different *Leishmania* species. *Molecular and biochemical parasitology*. 1994;67:103-13.
- [41] Webb JR, Campos-Neto A, Ovendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, et al. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania* major recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infection and immunity*. 1998;66:3279-89.

- [42] Kedzierski L, Montgomery J, Bullen D, Curtis J, Gardiner E, Jimenez-Ruiz A, et al. A leucine-rich repeat motif of Leishmania parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3. *J Immunol.* 2004;172:4902-6.
- [43] Lincoln LM, Ozaki M, Donelson JE, Beetham JK. Genetic complementation of Leishmania deficient in PSA (GP46) restores their resistance to lysis by complement. *Molecular and biochemical parasitology.* 2004;137:185-9.
- [44] Kemp M, Handman E, Kemp K, Ismail A, Mustafa MD, Kordofani AY, et al. The Leishmania promastigote surface antigen-2 (PSA-2) is specifically recognised by Th1 cells in humans with naturally acquired immunity to L. major. *FEMS immunology and medical microbiology.* 1998;20:209-18.
- [45] Handman E, Symons FM, Baldwin TM, Curtis JM, Scheerlinck JP. Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from Leishmania major is mediated by a TH1 type of immune response. *Infection and immunity.* 1995;63:4261-7.
- [46] Pinelli E, Gebhard D, Mommaas AM, van Hoeij M, Langermans JA, Ruitenbergh EJ, et al. Infection of a canine macrophage cell line with leishmania infantum: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Veterinary parasitology.* 2000;92:181-9.
- [47] Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of Leishmania infantum DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *Journal of clinical microbiology.* 2004;42:5249-55.
- [48] Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, et al. Real-time PCR as a new tool for quantifying Leishmania infantum in liver in infected mice. *Clinical and diagnostic laboratory immunology.* 2001;8:828-31.
- [49] Kharazmi A, Kemp K, Ismail A, Gasim S, Gaafar A, Kurtzhals JA, et al. T-cell response in human leishmaniasis. *Immunology letters.* 1999;65:105-8.
- [50] Sassi A, Louzir H, Ben Salah A, Mokni M, Ben Osman A, Dellagi K. Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic Leishmania major infection in Tunisia. *Clinical and experimental immunology.* 1999;116:127-32.
- [51] Boelaert M, Verdonck K, Menten J, Sunyoto T, van Griensven J, Chappuis F, et al. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. *The Cochrane database of systematic reviews.* 2014;6:CD009135.
- [52] Cunningham J, Hasker E, Das P, El Safi S, Goto H, Mondal D, et al. A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2012;55:1312-9.

- [53] Hasker E, Malaviya P, Gidwani K, Picado A, Ostyn B, Kansal S, et al. Strong association between serological status and probability of progression to clinical visceral leishmaniasis in prospective cohort studies in India and Nepal. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8:e2657.
- [54] de Ruiter CM, van der Veer C, Leeflang MM, Deborggraeve S, Lucas C, Adams ER. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52:3147-55.
- [55] Makala LHC, Baban B. Novel Therapeutic Approaches to Leishmania Infection. In: Claborn DD, editor. *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment: InTech*; 2014. p. 495-523.
- [56] Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International journal for parasitology*. 2000;30:1269-81.
- [57] Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in parasitology*. 2008;24:371-7.
- [58] Ahmed B, Nabi S, Rahman M, Selim S, Bashar A, Rashid M, et al. Kala-azar (Visceral Leishmaniasis) elimination in Bangladesh: Successes and challenges. *Curr Trop Med Rep*. 2014;1:163-9.
- [59] Matlashewski G, Arana B, Kroeger A, Battacharya S, Sundar S, Das P, et al. Visceral leishmaniasis: elimination with existing interventions. *The Lancet Infectious diseases*. 2011;11:322-5.
- [60] Modabber F. Vaccines against leishmaniasis. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 1995;89 Suppl 1:83-8.
- [61] Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infection and immunity*. 2000;68:1760-4.
- [62] Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, Rocha H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1995;53:273-7.
- [63] Das A, Ali N. Vaccine Development Against *Leishmania donovani*. *Frontiers in immunology*. 2012;3:99.
- [64] Modabber F. Leishmaniasis vaccines: past, present and future. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;36 Suppl 1:S58-61.
- [65] Borja-Cabrera GP, Santos FN, Santos FB, Trivellato FA, Kawasaki JK, Costa AC, et al. Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 2010;28:597-603.
- [66] Oliveira-Freitas E, Casas CP, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Nico D, Souza LO, et al. Acylated and deacylated saponins of *Quillaja saponaria* mixture as adjuvants for the FML-vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 2006;24:3909-20.

- [67] Lemesre JL. Methods for the culture in vitro of different stages of tissue parasites. World Intellectual Property Organization 1994.
- [68] Martin V, Vouldoukis I, Moreno J, McGahie D, Gueguen S, Cuisinier AM. The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (Canileish(R)) remains effective against an experimental challenge one year later. *Veterinary research*. 2014;45:69.
- [69] Borja-Cabrera GP, Santos FN, Bauer FS, Parra LE, Menz I, Morgado AA, et al. Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine*. 2008;26:4991-7.
- [70] Costa CH, Peters NC, Maruyama SR, de Brito EC, Jr., Santos IK. Vaccines for the leishmaniasis: proposals for a research agenda. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5:e943.
- [71] Palatnik-de-Sousa CB, Barbosa Ade F, Oliveira SM, Nico D, Bernardo RR, Santos WR, et al. FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine. *Expert review of vaccines*. 2008;7:833-51.
- [72] Fujiwara RT, Vale AM, Franca da Silva JC, da Costa RT, Quetz Jda S, Martins Filho OA, et al. Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTI1) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Veterinary research*. 2005;36:827-38.
- [73] Moreno J, Nieto J, Masina S, Canavate C, Cruz I, Chicharro C, et al. Immunization with H1, HASPB1 and MML Leishmania proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine*. 2007;25:5290-300.
- [74] Gradoni L. Canine Leishmania vaccines: still a long way to go. *Veterinary parasitology*. 2015;208:94-100.
- [75] Gradoni L, Foglia Manzillo V, Pagano A, Piantedosi D, De Luna R, Gramiccia M, et al. Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from Leishmania infantum infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine*. 2005;23:5245-51.
- [76] Poot J, Spreuuenberg K, Sanderson SJ, Schijns VE, Mottram JC, Coombs GH, et al. Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with Leishmania infantum. *Vaccine*. 2006;24:2460-8.
- [77] Lambertz U, Silverman JM, Nandan D, McMaster WR, Clos J, Foster LJ, et al. Secreted virulence factors and immune evasion in visceral leishmaniasis. *Journal of leukocyte biology*. 2012;91:887-99.
- [78] Silverman JM, Chan SK, Robinson DP, Dwyer DM, Nandan D, Foster LJ, et al. Proteomic analysis of the secretome of Leishmania donovani. *Genome biology*. 2008;9:R35.
- [79] Chenik M, Chaabouni N, Ben Achour-Chenik Y, Ouakad M, Lakhel-Naouar I, Louzir H, et al. Identification of a new developmentally regulated Leishmania major large RAB GTPase. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;341:541-8.

- [80] Chenik M, Louzir H, Ksontini H, Dilou A, Abdmouleh I, Dellagi K. Vaccination with the divergent portion of the protein histone H2B of *Leishmania* protects susceptible BALB/c mice against a virulent challenge with *Leishmania major*. *Vaccine*. 2006;24:2521-9.
- [81] Kahl LP, McMahon-Pratt D. Structural and antigenic characterization of a species- and promastigote-specific *Leishmania mexicana amazonensis* membrane protein. *J Immunol*. 1987;138:1587-95.
- [82] Lohman KL, Langer PJ, McMahon-Pratt D. Molecular cloning and characterization of the immunologically protective surface glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania amazonensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87:8393-7.
- [83] Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *The Journal of infectious diseases*. 2002;186:1314-20.
- [84] Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Webster HK, Johnson AJ. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Veterinary pathology*. 1984;21:74-9.
- [85] Nogueira FS, Moreira MA, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Menz I, Parra LE, et al. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*. 2005;23:4805-10.
- [86] Borja-Cabrera GP, Cruz Mendes A, Paraguai de Souza E, Hashimoto Okada LY, de ATFA, Kawasaki JK, et al. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine*. 2004;22:2234-43.
- [87] de Oliveira Mendes C, Paraguai de Souza E, Borja-Cabrera GP, Maria Melo Batista L, Aparecida dos Santos M, Ellner Parra L, et al. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 2003;21:2589-97.
- [88] Santos FN, Borja-Cabrera GP, Miyashiro LM, Grechi J, Reis AB, Moreira MA, et al. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. *Vaccine*. 2007;25:6176-90.

**ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE**

La PSA (Promastigote Surface Antigen) soluble de *Leishmania* induit, sous forme recombinante ou peptidique, une réponse immune protectrice chez le chien

PETITDIDIER-LESIN ÉLODIE

10 Décembre 2015

RÉSUMÉ

Les leishmanioses ont pour origine un protozoaire flagellé appartenant au genre *Leishmania* qui infecte l'Homme et de nombreux mammifères. Les animaux infectés, tels que le chien, constituent une source de parasites pour l'insecte vecteur, favorisant leur transmission à l'Homme. Ces maladies parasitaires représentent un véritable problème de santé publique dans le monde. Malgré le nombre de pays touchés et une incidence de deux millions de nouveaux cas par an, elle compte cependant parmi les maladies les plus négligées. À ce jour, aucun vaccin n'existe contre la leishmaniose humaine et l'arsenal thérapeutique utilisé reste coûteux et peu efficace. Le traitement des leishmanioses dépend donc de la mise au point de méthodes diagnostiques plus sensibles et surtout de la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques et/ou vaccinales. Nos travaux ont récemment abouti à l'élaboration du premier vaccin européen contre la leishmaniose viscérale canine, commercialisé sous le nom de CaniLeish®. Ce vaccin est composé d'un extrait d'antigènes naturellement excrétés-sécrétés par les formes promastigotes de *Leishmania infantum* (LiESAp), formulé avec le QA-21. La protéine LiPSA-50S, appartenant à la famille des « Promastigote Surface Antigen » (PSA), a ensuite été identifiée comme étant l'immunogène majeur et l'un des principaux constituants actifs du vaccin CaniLeish®.

Notre étude démontre clairement la perte de virulence des promastigotes transgéniques de *L. infantum* surexprimant la protéine LiPSA-50S en induisant la production d'anticorps spécifiques chez la souris BALB/c (réponse immunitaire mixte Th1/Th2). Ces anticorps sont capables d'opsoniser les parasites *in vitro* et d'activer les molécules du complément, provoquant la lyse des parasites. De plus, les promastigotes surexprimant LiPSA-50S protègent la souris d'une infection expérimentale à *L. infantum*, suggérant les propriétés immunoprotectrices de cette protéine. À défaut de pouvoir purifier la protéine recombinante LiPSA-50S sous sa forme recombinante, son homologue chez *L. amazonensis* a été produit dans un système d'expression permettant d'obtenir une protéine recombinante de conformation native, la protéine LaPSA-38S. Le pouvoir vaccinal de la protéine LaPSA-38S, de sa partie carboxy-terminale (la protéine LaPSA-12S) et de ses dérivés peptidiques, a été analysé dans des essais précliniques de vaccination chez le chien, principal hôte réservoir naturel à *L. infantum*. Nous montrons ici que les protéines recombinantes confèrent chez le chien un excellent taux de protection (environ 80%) à l'encontre d'une infection expérimentale à *L. infantum*. La combinaison de trois peptides issus de la protéine LaPSA-12S confère un taux de protection de 60 à 70% dans un modèle expérimental de leishmaniose viscérale canine. La protection des chiens s'accompagne d'une réponse immune cellulaire de type Th1 et d'une réponse anticorps spécifique appropriée. Ces résultats prometteurs nous encourageant aujourd'hui à évaluer l'efficacité de ces candidats vaccinaux en situation d'exposition naturelle à l'infection.

Mots-clés : *Leishmania*, antigènes excrétés-sécrétés, PSA recombinante, peptides, vaccin, réponses immunitaires, protection, chien.