m/s SYNTHÈSE

médecine/sciences 1997 ; 13 : 934-41

Nouveaux aspects moléculaires et cellulaires du parasite Leishmania

Marc Ouellette
Barbara Papadopoulou
Martin Olivier

La leishmaniose, due au parasite intracellulaire *Leishmania*, est endémique dans plusieurs pays et affecte plus de 12 millions de personnes. Son traitement est compliqué par l'émergence de résistance aux médicaments disponibles. Le locus *H* est impliqué dans cette résistance. On y a mis en évidence le gène *pgpA*, qui code pour un transporteur de type ABC *(ATP-binding cassette)* impliqué dans la résistance aux oxyanions (arsenite et antimoine), et le gène de résistance aux antifolates codant pour une déshydrogénase insensible aux antifolates qui remplace la cible de cette classe de molécules. L'invalidation de ces gènes impliqués dans la survie intracellulaire de *Leishmania* devrait permettre de créer des parasites vivants atténués qui pourraient constituer les prémices d'un vaccin. Par ailleurs, la mise à jour des mécanismes par lesquels les *Leishmania* altèrent la transmission du signal de leurs cellules hôtes, leur permettant de survivre dans les macrophages et de contourner la réponse immune, devraient donner des pistes thérapeutiques nouvelles.

La leishmaniose, due au parasite protozoaire *Leishmania*, est endémique dans plusieurs pays et affecte plus de 12 millions de personnes avec 400 000 nouveaux cas chaque année [1]. Selon l'espèce, ce parasite peut causer des infections cutanées qui cicatrisent seules (bouton d'Orient) mais aussi des infections viscérales (Kala-azar) qui, si elles ne sont pas traitées, sont fatales. Les cas de leishmaniose sont en recrudescence, d'une part, en raison des voyages et de l'augmentation des interventions humanitaires ou militaires comme lors de l'opération « tempête du désert » [2] et, d'autre part, chez les patients atteints par le virus VIH [3]. Le médicament de premier choix contre les infections à *Leishmania* est dérivé de l'antimoine [4] mais le traitement des leishmanioses, et des maladies parasitaires en général, est compliqué par l'arsenal limité d'antiprotozoaires et par l'émergence de la résistance aux médicaments disponibles [5]. Le parasite *Leishmania* a un cycle de vie relativement simple : il est retrouvé sous forme de promastigote flagellé chez l'insecte vecteur, le phlébotomone, ou sous forme d'amastigote aflagellé à l'intérieur des macrophages de l'hôte infecté

ADRESSES

M. Ouellette : *professeur agrégé, département de microbiologie, Université Laval et chercheur senior, centre de recherche en infectiologie du CHU.* B. Papadopoulou : *professeur adjoint, département de microbiologie, Université Laval et chercheur senior centre de recherche en infectiologie du CHUL.* M. Olivier : *professeur adjoint, département de microbiologie, Université Laval et chercheur senior centre de recherche en infectiologie du CHUL.* Centre de recherche en infectiologie de l'université Laval, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL), et Département de microbiologie, Faculté de médecine, Université Laval, 2705, boulevard Laurier, Sainte-Foy, Québec, G1V 4G2 Canada.

(figure 1). Une connaissance approfondie des mécanismes de résistance aux médicaments et de la biologie du parasite est nécessaire pour développer des stratégies visant à mieux le contrôler.

Mécanismes de résistance aux médicaments

La compréhension des mécanismes de résistance aux médicaments est importante à trois niveaux : pour développer des outils de détection précoce de la résistance, pour suggérer de nouvelles utilisations d'agents chimiothérapeutiques et pour trouver de nouvelles cibles afin de développer la recherche de nouveaux agents antiparasitaires.

L'amplification de régions spécifiques du génome de *Leishmania* est un événement fréquent chez des mutants résistants aux médicaments [6]. Nous avons particulièrement étudié, dans notre laboratoire, celle du locus *H*. En effet, ce locus est amplifié *(figure 2)* tant chez des mutants résistants aux oxyanions, en particulier à l'antimoine, que chez les mutants résistants aux antifolates, une classe d'antimicrobiens largement utilisés contre les parasites. Le locus *H* est amplifié sous forme d'éléments extrachromosomiques linéaires ou circulaires [7] qui peuvent être facilement distingués des chromosomes de *Leishmania (figure 2B)*.

Le domaine de la parasitologie a été récemment révolutionné par la mise au point de techniques de transfection qui utilisent l'électroporation, permettant l'introduction d'ADN exogène chez les parasites. Chez *Leishmania* l'ADN transfecté peut, soit se maintenir sous forme épisomique, soit s'intégrer dans le génome par recombinaison homologue [5, 6]. Le maintien de l'ADN sous forme d'épisomes en nombre de copies élevé permet de produire en excès des protéines potentiellement impliquées dans la résistance. Jusqu'à récemment, les travaux concernant la résistance chez les parasites étaient descriptifs, mais l'avènement des techniques de transfection a permis d'étudier directement l'apport d'un gène dans la résistance.

Les gènes de résistance aux médicaments présents sur le locus *H* ont été isolés par transfection. Le premier gène décrit sur ce locus est *pgpA* codant pour un transporteur de type ABC *(ATP binding cassette)* apparenté de façon lointaine aux phosphoglycoprotéines de type ABC [8]. Ces grosses protéines membranaires sont responsables du phénotype de résistance multiple aux médicaments rencontré dans les cellules cancéreuses, quand elles sont produites en excès [9]. Le transporteur de type ABC le plus voisin de PgpA est la protéine MRP *(multidrug resistance protein)*, une autre protéine impliquée dans cette résistance [10]. Les études de résistance aux médicaments de *Leishmania* transfectée par *pgpA* ont, en fait, montré une faible résistance aux oxyanions de type arsenite et antimoine mais pas de résistance aux médicaments anticancéreux habituellement associés au phénotype de résistance déterminée par MDR *(multidrug resistance)* [11, 12]. Toutefois, dans ces expériences, le niveau de résistance

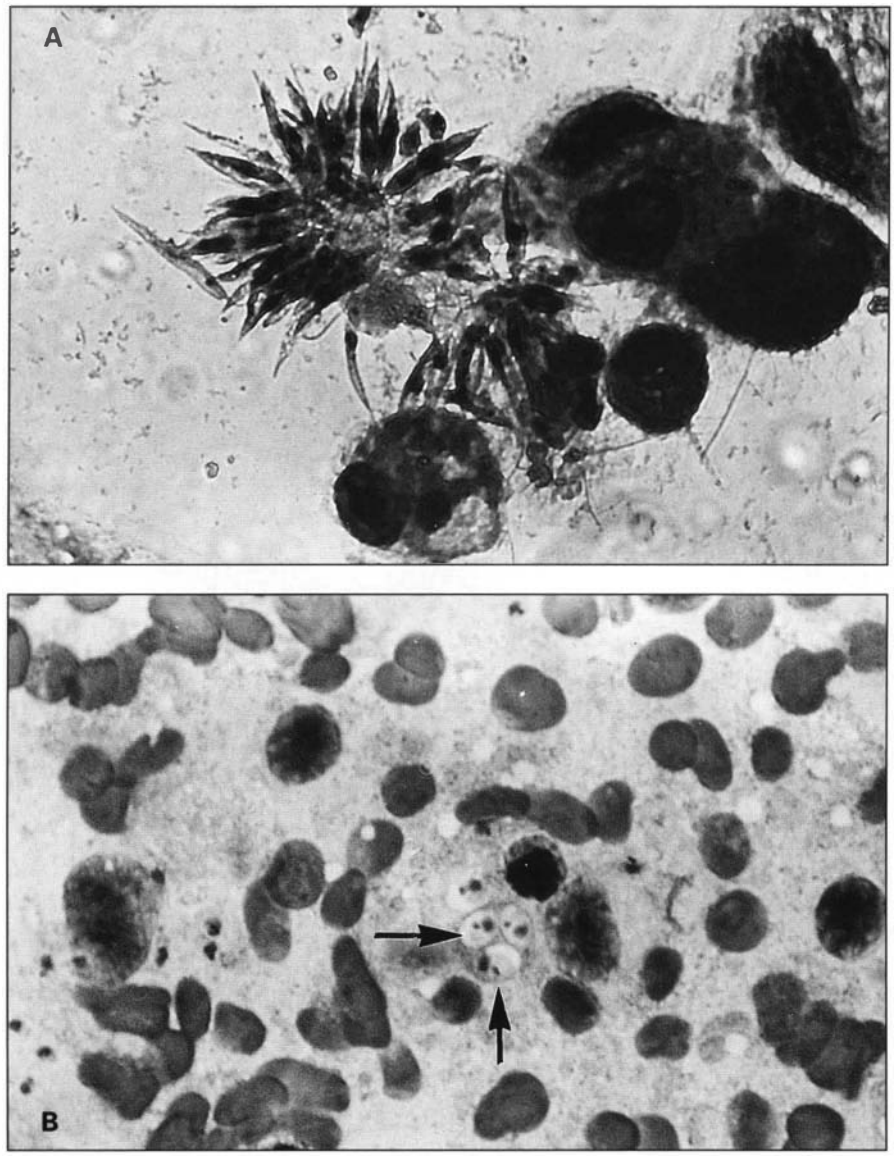

Figure 1. **Leishmania donovani.** ***A.*** *forme promastigote flagellée (extracellulaire) seule ou en forme de rosette retrouvée chez le vecteur ou en culture.* ***B.*** *forme amastigote aflagellée (intracellulaire) retrouvée à l'intérieur de sa cellule hôte chez les mammifères (frottis par impression d'une coupe de foie murin infecté) ou en culture cellulaire.*

conféré par la transfection de *pgpA* dans *Leishmania* est beaucoup plus bas que celui rencontré chez les mutants sélectionnés pour leur résistance aux oxyanions et dans lesquels on a montré que *pgpA* est amplifié : la résistance aux oxyanions serait donc multifactorielle [5]. L'amplification d'un locus non apparenté à *pgpA* [13] et un système d'expulsion du médicament [14, 15] ont été observés chez des *Leishmania* résistantes aux oxyanions. La co-transfection de *pgpA* et de ce nouveau locus a effectivement montré que ces produits agissent en synergie pour conférer une plus grande résistance aux oxyanions [5].

Le gène de résistance aux antifolates présent sur le locus *H* code pour une déshydrogénase à chaîne courte appelée LTDH/PTR1 [16, 17]. L'amplification d'un gène codant pour une telle protéine représente un nouveau mécanisme de résistance aux antifolates. Des analyses génétiques et biochimiques indiquent que la protéine LTDH/PTR1 est impliquée dans la réduction des ptérines et des folates [18, 19] ; son activité de folate réductase explique que sa surproduction confère la résistance aux antifolates en remplaçant l'enzyme dihydrofolate réductase, la cible principale des antifolates.

Les bases moléculaires de la résistance aux oxyanions induite *in vitro* commencent donc à être définies. Ces études produiront les outils nécessaires pour étudier si les souches de *Leishmania* isolées sur le terrain ne répondant pas au traitement à base d'antimoine ont les mêmes mutations que les mutants du laboratoire. Quant à la caractérisation de la protéine LTDH/PTR1, elle a permis d'identifier une nouvelle cible thérapeutique. Le développement d'inhibiteurs de cette enzyme, combinés en particulier à des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase, pourrait s'avérer très efficace dans le traitement d'infections à *Leishmania*.

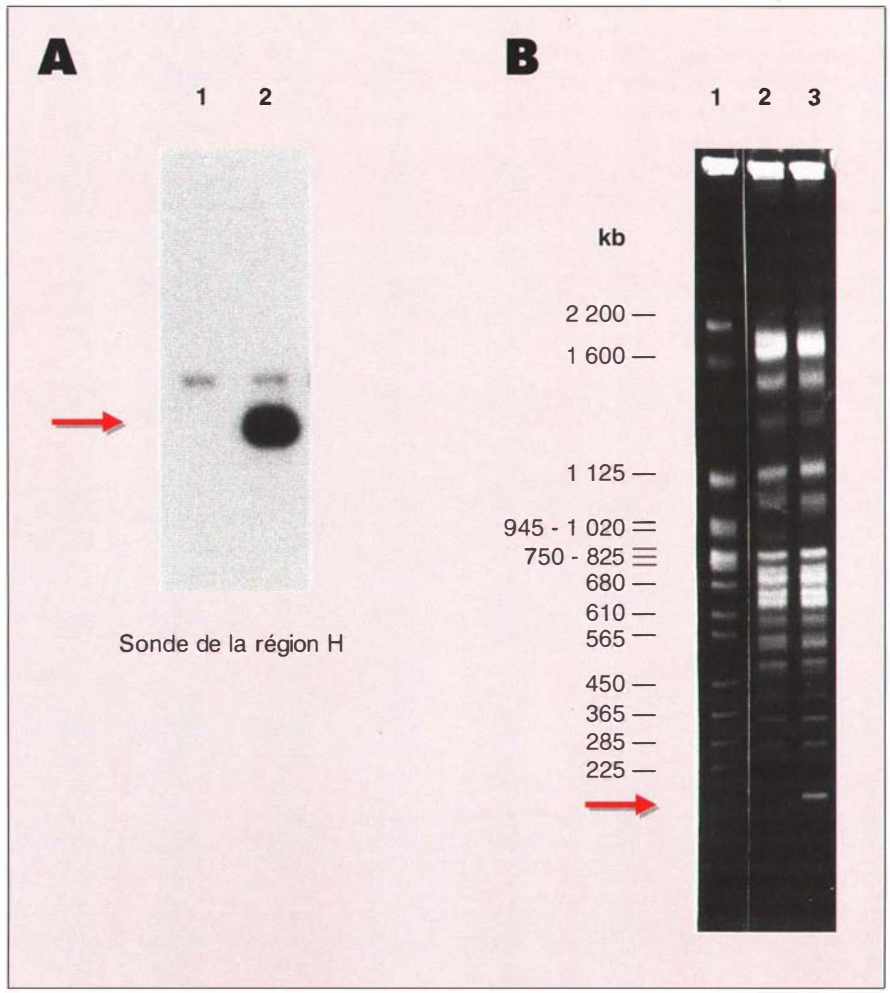

Figure 2. ***A. Exemple d'amplification de l'ADN chez* Leishmania *après une sélection au méthotrexate.*** *Les ADN digérés de la souche de* Leishmania tarentolae *TarII WT (position 1) et du mutant VlaMTX1000 résistant à 1 mM de méthotréxate (position 2) ont été séparés par migration sur gel d'agarose transféré sur support solide par transfert de type* Southern *et hybridé avec la sonde du gène* ltdh. *Une très forte amplification du gène est observée dans la souche résistante au méthotrexate.* ***B. Séparation des chromosomes de* L. tarentolae *sur un gel en champs pulsés.*** *En position 1 le marqueur des chromosomes de la levure* Saccharomyces cerevisiae, *en position 2 une souche sauvage Tar II WT et en position 3 un mutant sélectionné pour la résistance au méthotrexate qui contient un amplicon linéaire indiqué par la flèche.*

Ciblage moléculaire

L'introduction d'ADN par recombinaison homologue permet l'inactivation de gènes impliqués dans la résistance ou dans la survie intracellulaire. *Leishmania* étant un organisme diploïde sans cycle sexuel connu, deux allèles d'un gène à simple copie doivent être inactivés successivement en utilisant deux marqueurs de sélection différents. Le ciblage moléculaire a été utile pour déterminer les fonctions physiologiques des protéines PgpA et LTDH/PTR1. Une souche dans laquelle le gène *ltdh/ptr1* est inactivé est hypersensible aux antifolates, phénotype attendu étant donné l'activité folate réductase de l'enzyme, mais elle perd également sa capacité de récupérer les ptérines oxydées du milieu [18, 19] ; par un mécanisme qui reste à déterminer, *Leishmania* a la capacité de convertir les ptérines en folates. Une souche n'exprimant pas *pgpA* est hypersensible aux oxyanions, à l'acidité du milieu, à l'eau oxygénée et sa survie intracellulaire est diminuée (manuscrit soumis). Ces résultats sont en accord avec une hypothèse que nous avions proposé, il y a quelques années [20] selon laquelle la protéine PgpA serait impliquée dans une réponse générale au *stress*.

La modification du génome par inactivation de gènes permettrait de créer des souches de *Leishmania* atténuées qui pourraient être utilisées comme vaccins vivants. Les vaccins les plus efficaces contre les infections virales sont fabriqués à partir de souches de virus vivants atténués et nous croyons que cette approche mérite d'être étudiée pour le développement de vaccins contre la leishmaniose. En effet, plusieurs observations suggèrent que la vaccination contre la leishmaniose serait possible, car une résistance à la réinfection a été observée chez des patients atteints de leishmaniose cutanée, traités et guéris [21]. En outre, une immunité a été développée après le traitement de patients souffrant de Kala-azar [22]. Plusieurs essais de préparation de vaccins ont été tentés, soit à partir de promastigotes tués ou chimiquement atténués, soit à partir de dérivés d'une des protéines majeures de surface de *Leishmania*, mais aucun n'a entraîné une immunité suffisante. Les gènes impliqués dans la survie intracellulaire du parasite sont des cibles de choix pour tenter de produire des vaccins vivants. Dans ce but, nous essayons actuellement de créer des mutants de *Leishmania* pathogènes virulents dans lesquels le gène *pgpA* sera inactivé. On mesurera la survie intracellulaire du parasite recombinant, *in vitro* à l'intérieur de macrophages, et *in vivo* chez la souris. L'absence d'infection pourra indiquer que les souches sont suffisamment atténuées et une protection contre la réinfection signifiera que les souches atténuées ont produit une immunité cellulaire suffisante.

Une autre approche de la production de vaccins vivants serait d'introduire de l'information génétique exogène chez *Leishmania* afin de favoriser son élimination. On peut introduire deux types de séquences : soit des marqueurs de sélection négative dominante, soit des gènes codant pour des cytokines. Le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex transfecté dans des promastigotes, confère au parasite une hypersensibilité au ganciclovir [23] par rapport au type sauvage. Nous avons récemment montré que ce marqueur négatif est exprimé au stade amastigote du parasite et l'infection, chez la souris, causée par *L. major* exprimant un gène de thymidine kinase virale peut être contrôlée par le ganciclovir (manuscrit soumis).

Pour que la réponse immunitaire de type cellulaire soit efficace, les macrophages infectés doivent être en mesure d'activer des lymphocytes T de façon spécifique. Ces lymphocytes T sécrètent alors diverses lymphokines qui joueront un rôle dans l'activation des macrophages et dans l'induction de leurs fonctions cytocides. L'importance des lymphokines dans le contrôle de l'infection par *Leishmania* a été montrée de façon très claire. Les cytokines associées à la réponse de type Th1 (INF-γ, IL-2, IL-12) contribuent à l'élimination du parasite tandis que les cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-10) exacerbent l'infection [25]. Cela explique les succès thérapeutiques obtenus par l'utilisation combinée de l'antimoine pentavalent et de l'INF-γ [26] dans des cas de leishmaniose difficile à traiter. Récemment, la transfection de *Leishmania* avec le gène codant pour l'INF-γ a montré que cette cytokine était correctement sécrétée et rendait des souris déficientes en cellules T *(nude mice)* plus résistantes à l'infection [27]. Ces résultats suggèrent qu'en produisant en excès différents gènes de cytokines, *Leishmania* pourrait contribuer à sa propre élimination.

Survie intracellulaire et transmission du signal

La survie intracellulaire de *Leishmania* est due à sa capacité de court-circuiter les fonctions de sa cellule hôte, la rendant inapte à utiliser ses fonctions naturelles de défense. Une meilleure compréhension de la survie intracellulaire pourrait éventuellement nous permettre de la moduler pour contrôler l'infection. L'induction de la plupart des fonctions cellulaires, en réponse à une stimulation extracellulaire, implique la participation de messagers biochimiques permettant la transmission du signal, de la surface de la cellule jusqu'à son noyau ou vers d'autres protéines de choix nécessaires à l'activation cellulaire désirée.

Par exemple, une cascade biochimique est déclenchée en réponse à l'interaction du peptide chimiotactique f-Met-Leu-Phe (fMLP) avec son récepteur situé à la surface des macrophages : cette interaction induisant l'activation de protéines G sensibles à la toxine de *B. pertussis* [28-31] active la phospholipase C qui hydrolyse le phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphate ($PtdInsP_2$) en inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) et en diacylglycérol *(figure 3)*. Le second messager IP_3 interagit avec des organites intracellulaires qui lui sont sensibles, entraînant la libération de Ca^{2+} retenu dans ces compartiments. D'autre part, le diacylglycérol active la protéine kinase C cytosolique (PKC) avec la participation de lipides et du Ca^{2+} (pour les isoformes α, β et γ de la PKC). La PKC activée est transportée vers la membrane où elle phosphoryle des protéines sur leurs résidus sérine et/ou thréonine, phénomène biochimique essentiel à la réponse fonctionnelle de la cellule après la stimulation extracellulaire [32]. Outre cette voie de transmission du signal dépendante de la PKC, plusieurs études ont aussi montré le rôle primordial joué par le Ca^{2+} comme second messager lors de l'activation des cellules phagocytaires [33-39]. Par exemple, il a été bien montré que l'activité tumoricide des macrophages péritonéaux murins induite après stimulation par le lipopolysaccharide (LPS) et l'interféron (IFN-γ), peut être inhibée par des antagonistes de la calmoduline-kinase (W7, calmidazolium et chloropromazine), ainsi que par des inhibiteurs de canaux calciques [38]. Il semblerait aussi que la modulation de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II à la surface de la lignée de cellules promyélocytaires humaines HL-60, dépende du calcium [39]. Il a été rapporté, en outre, que le traitement des cellules par l'EGTA, un chélateur du Ca^{2+}, ou par des inhibiteurs des voies de transmission du signal dépendantes du calcium et de la calmoduline diminue l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II en réponse à l'INF-γ [32]. En utilisant le chélateur de Ca^{2+} BAPTA, nous avons pu montrer dans les monocytes humains, que l'inhibition d'une élévation transitoire du Ca^{2+}, en réponse au peptide chimiotactique fMLP, se traduit par une

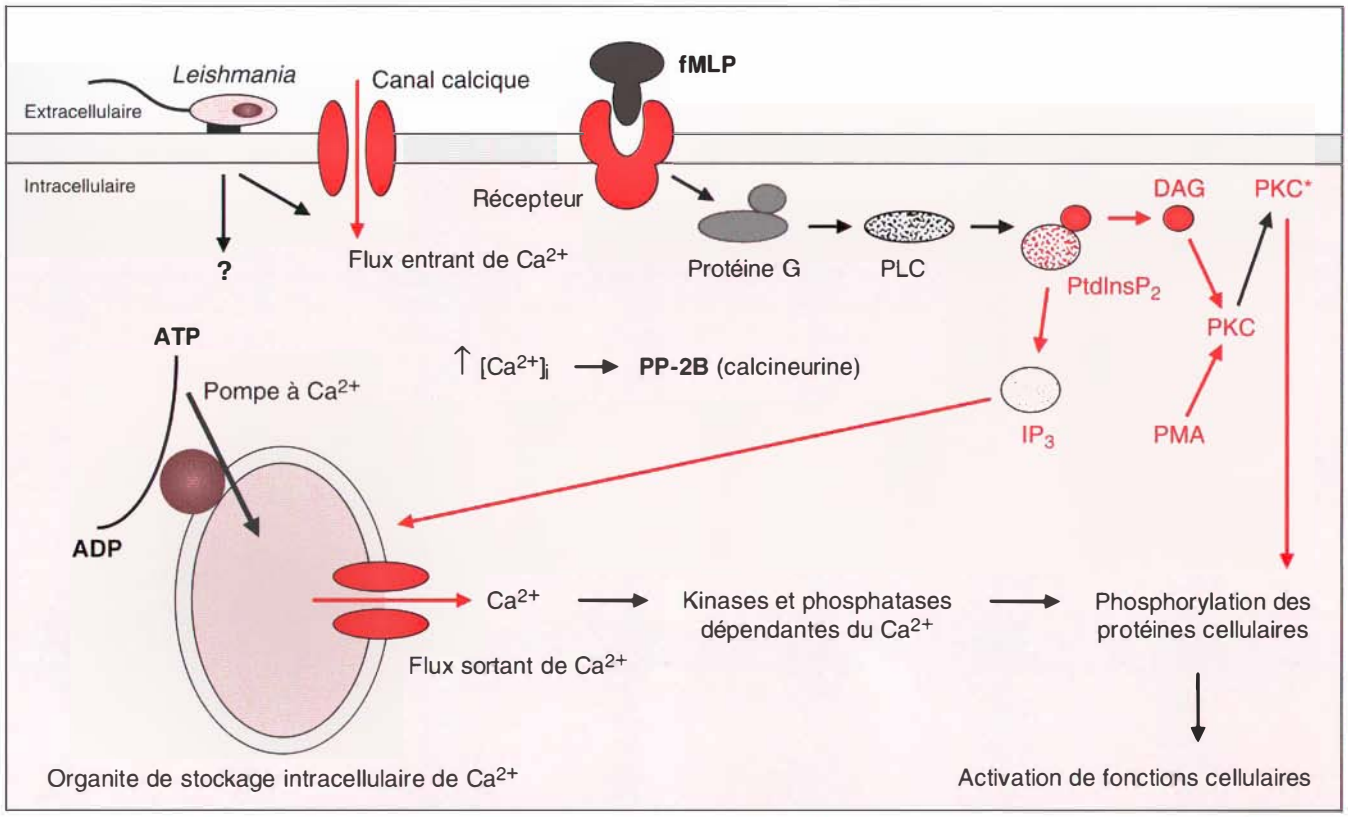

Figure 3. ***Altérations de certains mécanismes de transmission du signal du macrophage infecté par* Leishmania donovani.** *La cascade biochimique déclenchée par l'interaction du peptide chimiotactique fMLP (f-met-leu-phe) avec son récepteur comporte l'activation de protéines G, et de la phospholipase C (PLC); cette dernière hydrolyse le phosphatidyl inositol (4,5)-bisphosphate ($PtdInsP_2$) en inositol (1,4,5)-trisphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG); le second messager IP_3 induit la libération de Ca^{2+} des organites cellulaires et le DAG et le Ca^{2+} activent la protéine kinase C (PKC) qui est transportée à la membrane (PKC*) où elle va activer une voie de transmission du signal. Les voies biochimiques altérées sont indiquées en rouge; elles utilisent les seconds messagers $PtdInsP_2$, IP_3, PKC et le Ca^{2+}. PMA, phorbol 12-myristate 13-acétate; $[Ca^{2+}]_i$, concentration de calcium intracellulaire.*

inhibition de la production de radicaux de l'oxygène, totale et dépendante de la dose [33].

Lors d'études précédentes nous avions montré que les voies de transmission du signal biochimique utilisant le Ca^{2+} et/ou la PKC comme seconds messagers étaient défectueuses dans les monocytes humains infectés par *Leishmania donovani* [33, 34]. En fait, nous avions observé que l'activité spécifique de la PKC ainsi que son transport du cytoplasme à la membrane en réponse à l'ester de phorbol PMA étaient significativement réduites. Ce défaut de mobilisation se traduisait par une diminution du niveau de phosphorylation des protéines des macrophages analysées par migration sur gel en deux dimensions [34]. Finalement, cette altération de la transmission du signal *via* la voie utilisant la PKC se traduisait par une incapacité fonctionnelle de la cellule infectée de produire des radicaux actifs de l'oxygène (superoxyde et peroxyde d'hydrogène) qui sont des moyens de défense de première ligne contre les micro-organismes. Cette déficience n'était pas liée à une diminution du nombre de récepteurs des esters de phorbols (PMA, PDBu) actifs sur la kinase, ni à une dégradation possible de la PKC. Par ailleurs, nous avons clairement montré que l'inefficacité du système de transmission du signal empruntant la PKC était directement liée à une réduction de la sensibilité de la kinase vis-à-vis de son activateur naturel, le diacylglycérol [34].

Une autre étude de l'homéostasie du calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) dans les monocytes humains infectés par *L. donovani* [33], nous a permis de corroborer les observations initiales rapportées par Eilam *et al.* [40] de l'augmentation du niveau basal de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules infectées par *Leishmania*. Cette élévation est due à l'augmentation de la perméabilité au Ca^{2+} de la membrane des macrophages infectés [33]. Nous avons aussi montré que, dans ces cellules, la voie de transmission du signal dépendante du calcium en réponse au peptide chimiotactique fMLP est défectueuse, inhibant la formation de radicaux de l'oxygène. Des altérations du métabolisme des inositol-lipides et des inositol-phosphates observées dans les monocytes infectés par *Leishmania* peuvent être, en partie, responsables de cette déficience. Il est possible que la phosphatase

acide produite par *Leishmania* puisse déphosphoryler l'IP_3, comme cela a été montré dans un système *in vitro* [41], venant donc expliquer, en partie, l'activité réduite d'IP_3 en réponse à la stimulation par le fMLP que nous avions observée dans les cellules infectées. Il faut noter, cependant, qu'aucune étude n'a jusqu'ici montré que la phosphatase acide de *Leishmania* pouvait se libérer de la vacuole phagolysosomale et atteindre l'environnement cytoplasmique de la cellule. Mais, il est possible, également, que le niveau basal élevé de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les phagocytes infectés par *L. donovani* puisse activer une phosphatase déphosphorylant et dégradant les IP_3, comme cela a été rapporté par d'autres équipes [42]. En outre, une telle élévation du calcium intracellulaire pourrait aussi activer la Ser/Thr phosphatase dépendante du calcium comme cela a été montré pour la calcineurine (phosphatase PP-2B) [43]. En fait, nous avons récemment obtenu des résultats (non publiés) suggérant que l'activité de la calcineurine serait effectivement augmentée dans les cellules infectées par *L. donovani*. Alors que l'activité des Ser/Thr phosphatases PP-1 et PP-2A ne montre aucune variation significative, l'activité de la PP-2B ou calcineurine est presque doublée. Cette augmentation d'activité semble liée à la plus grande synthèse de cette phosphatase dans les cellules infectées (résultats non publiés) ; elle pourrait donc être responsable de la déphosphorylation, non seulement de divers seconds messagers ($PtdInsP_2$, IP_3 ou PKC), mais aussi de l'ensemble des autres protéines de la cellule, frappant celle-ci d'une forme de paralysie physiologique qui vient anéantir toute chance de se défendre contre l'envahisseur. Des expériences sont encore nécessaires pour mieux comprendre l'importance de ces observations. D'autres phosphatases d'origine endogène dirigées contre les phosphotyrosines pourraient être induites lors de l'infection. Des phosphatases pourraient également provenir du parasite lui-même (origine exogène), comme cela a été rapporté dans le cas de la bactérie *Yersinia* qui possède une tyrosine phosphatase (YopH) induite par les concentrations de Ca^{2+} retrouvées dans la cellule infectée, et qui déphosphoryle des résidus tyrosine des protéines de la cellule hôte [44-46].

Il est donc clair que le déséquilibre de l'homéostasie du Ca^{2+} de la cellule après l'infection peut être responsable en grande partie de l'inhibition générale de plusieurs fonctions dans les macrophages infectés. Nous avons montré que le traitement des macrophages par la toxine de *B. pertussis* ne prévient en aucun cas l'élévation du niveau basal de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par *L. donovani*, ce qui suggère que le signal ne serait pas transmis *via* une protéine G sensible à la toxine de *B. pertussis* [33]. L'ouverture des canaux calciques induite par l'interaction d'un agoniste avec son récepteur spécifique est bien démontrée [28], mais ce mécanisme ne peut vraisemblablement pas expliquer les anomalies liées au calcium observées dans les cellules infectées par *L. donovani*.

Les principales molécules de surface retrouvées dans les promastigotes de *Leishmania* sont la GP63 (glycoprotéine de 60-65 kDa, protéase de surface) et le lipophosphoglycane. En l'absence d'opsonines du sérum, l'attachement à la cellule hôte se fait par les molécules de GP63 et de lipophosphoglycane interagissant principalement avec les récepteurs CR3 et P150,95 des macrophages [47]. En présence de sérum non immun, les promastigotes métacycliques semblent pouvoir activer la voie classique du complément et accumuler le C3b [47]. Dans ce cas, l'attachement se ferait de façon prédominante avec le CR1 qui servirait de récepteur des macrophages pour le C3b. En outre, dans le cas de *L. donovani*, l'attachement peut aussi se faire *via* les récepteurs du mannose-fucose. On a montré que le blocage spécifique de ces récepteurs abolit la phagocytose du parasite par le macrophage [48]. La liaison initiale des molécules de surface du parasite à celles du macrophage est donc un événement essentiel dans l'invasion de la cellule hôte. Des études ont rapporté que la molécule de lipophosphoglycane, ainsi que d'autres molécules du parasite, peuvent altérer les mécanismes de transmission du signal dans les macrophages [49]. Comme l'interaction entre les molécules de surface du parasite et les récepteurs de la cellule hôte semble être primordiale pour la phagocytose, nous avons formulé l'hypothèse que les phénomènes biochimiques conduisant au déséquilibre du calcium se produisent après le couplage initial entre le parasite et la cellule hôte. Il a été montré dans le passé que la molécule de lipophosphoglycane de *L. major* pouvait moduler l'influx de Ca^{2+} dans les macrophages ayant ingéré des globules rouges recouverts de lipophosphoglycane [40] et, comme pour l'infection par le parasite entier, provoquer une élévation permanente de la $[Ca^{2+}]_i$ [33]. En collaboration avec Salvatore Turco (université du Kentucky, USA) nous tentons d'élucider ce phénomène. Nos résultats ont clairement montré que la molécule de lipophosphoglycane, ainsi que la partie phosphoglycane et le domaine de fixation du lipophosphoglycane au parasite *(core-PI)* peuvent induire une élévation progressive du niveau de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les macrophages stimulés. L'inhibition de la phagocytose du parasite par le macrophage à l'aide de la cytochalasine B n'affecte pas l'influx initial causé par le premier contact parasite/cellule hôte, mais l'ingestion totale de l'agent pathogène est un prérequis pour que l'élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ dans le macrophage soit soutenue. En outre, ce phénomène ne semble pas impliquer des canaux calciques réglés par le potentiel ; néanmoins, l'ouverture des canaux calciques mis en cause semble être plutôt réglée par les mouvements de calcium s'opérant au niveau des lieux de stockage intracellulaires de la cellule hôte. Il est donc clair que la régulation du calcium lors de l'infection des macrophages par le parasite *Leishmania* est un phénomène très important dans l'installation de l'agent pathogène dans sa cellule hôte. Les mécanismes impliqués dans l'induction de ces différentes modulations des mouvements du calcium, ainsi que dans l'altération du niveau basal de la $[Ca^{2+}]_i$ restent largement inconnus. Une analyse plus approfondie de ces phénomènes est requise pour mieux comprendre leurs implications dans le développement de l'état immunosuppressif retrouvé dans les cellules infectées par des agents pathogènes.

Conclusions

Le traitement des leishmanioses est compliqué par le petit nombre de médicaments disponibles et par l'émergence de la résistance à ces médicaments. Les études en cours pour élucider ces mécanismes de résistance contribueront à contourner ce problème ou à trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Les études de biologie cellulaire concernant la transmission du signal devraient permettre de moduler la réponse de l'hôte; la production de parasites atténués par ciblage moléculaire pourrait s'avérer une approche prometteuse pour la prévention. Enfin, la cartographie des génomes de plusieurs parasites, dont *Leishmania*, est en cours. Les résultats contribueront sans doute à débusquer des gènes potentiellement impliqués dans la résistance, à trouver de nouvelles cibles thérapeutiques, ou encore à identifier des locus impliqués dans la survie intracellulaire et la pathogénie de *Leishmania*. L'ensemble de ces recherches, apportant une meilleure compréhension du parasite et de ses interactions avec son hôte, devrait, à l'aube du troisième millénaire, nous permettre de mieux le contrôler ■

Summary

New molecular and cellular aspects of infection by *Leishmania*

The intracellular parasite *Leishmania* is distributed worldwide and affects more than 12 million people. Cases of leishmaniasis are increasing and their treatment is complicated by the emergence of drug resistance. Understanding the molecular mechanisms of drug resistance should permit the development of tests to detect resistance early during infection, to suggest novel therapeutic avenues or to pinpoint novel intracellular targets. To control the infection more efficiently, a better understanding of the mechanisms of intracellular survival is required. It is now possible to introduce exogenous DNA into *Leishmania* using electroporation. The transfected DNA can be maintained as an episome or can integrate into the genome by homologous recombination. Gene targeting permits to inactivate genes that could yield attenuated parasites for use in the generation of live vaccines. A better understanding of the mechanisms used by the parasite to survive within the macrophages and to subvert the immune response by altering the transductional mechanisms of the host cells, may lead to the identification of new cellular targets from the parasite or the macrophage that will permit the development of new therapies. Overall these studies should provide a better understanding of the biology of this parasite which is necessary for its control and eradication.

RÉFÉRENCES

1. Ashford RW, Desjeux P, deRaadt P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitol Today* 1992; 8: 104-5.

2. Magill AJ, Grögl M, Gasser RA, Wellington S, Oster C. Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of operation desert storm. *N Engl J Med* 1993; 328: 1383-7.

3. Altes J, Salas A, Riera M, Udina M, Galmés A, Balanzat J, Ballesteros A, Buades J, Salva F, Villalonga C. Visceral leishmaniasis: another HIV-associated opportunistic infection? Report of eight cases and review of the literature. *AIDS* 1991; 5: 201-7.

4. Olliaro PL, Bryceson ADM. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitol Today* 1993; 9: 323-8.

5. Borst P, Ouellette M. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 427-60.

6. Ouellette M, Papadopoulou B. Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. *Parasitol Today* 1993; 9: 150-3.

7. Papadopoulou B, Roy G, Ouellette M. Frequent amplification of a short chain dehydrogenase gene as part of circular and linear amplicons in methotrexate resistant *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 4305-12.

8. Ouellette M, Fase-Fowler F, Borst P. The amplified *H* circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *EMBO J* 1990; 9: 1027-33.

9. Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 385-427.

10. Lepage P, Gros P. La glycoprotéine P: de la résistance croisée aux médicaments au transport des lipides biliaires. *Med Sci* 1995; 11: 357-66.

11. Callahan HL, Beverley SM. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *J Biol Chem* 1991; 266: 18427-30.

12. Papadopoulou B, Roy G, Dey S, Rosen BP, Ouellette M. Contribution of the *Leishmania* P-glycoprotein related gene *ltpgpA* to oxyanion resistance. *J Biol Chem* 1994; 269: 11980-6.

13. Grondin K, Papadopoulou B, Ouellette M. Homologous recombination between direct repeat sequences yields P-glycoprotein containing circular amplicons in arsenite resistant *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 1895-901.

14. Dey S, Papadopoulou B, Roy G, Grondin K, Dou D, Rosen BP, Ouellette M. High level arsenite resistance in *Leishmania tarentolae* is mediated by an active extrusion system. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 67: 49-57.

15. Singh AK, Liu HY, Lee ST. Atomic absorption spectrophotometric measurement of intracellular arsenite in arsenite-resistant *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 66: 161-4.

16. Papadopoulou B, Roy G, Ouellette M. A novel antifolate resistance gene on the amplified *H* circle of *Leishmania*. *EMBO J* 1992; 11: 3601-8.

17. Callahan HL, Beverley SM. A member of the aldoketo reductase family confers methotrexate resistance in *Leishmania*. *J Biol Chem* 1992; 267: 24165-8.

18. Papadopoulou B, Roy G, Mourad W, Leblanc E, Ouellette M. Changes in folate and pterin metabolism after disruption of the *Leishmania H* locus short-chain dehydrogenase gene. *J Biol Chem* 1994; 269: 7310-5.

19. Bello AR, Nare B, Freedman D, Hardy L, Beverley SM. PTR1: a reductase mediating salvage of oxidized pteridines and methotrexate resistance in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11442-6.

20. Ouellette M, Borst P. Drug resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. *Res Microbiol* 1991; 142: 737-46.

21. Modabber F. Development of vaccines against leishmaniasis. *Scand J Infect Dis* 1990 (suppl 76): 72-8.

22. Liew FY. Functional heterogeneity of CD4+ T cells in leishmaniasis. *Immunol Today* 1989; 10: 40-5.

23. LeBowitz JH, Cruz A, Beverley SM. Thymidine kinase as a negative selectable marker in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 51: 321-6.

RÉFÉRENCES

24. Gradoni L, Gramiccia M, Mancianti F, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. II. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the isle of Elba, Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 568-71.

25. Heinzel FP, Sadick MD, Mutha SS, Locksley RM. Production of IFN-gamma, Il-2, IL-4 and IL-10 by CD4+ lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7011-5.

26. Falcoff E, Bernabo J, Bottasso O. L'interféron gamma transforme le pronostic des patients atteints de leishmaniose chimiorésistante. *Med Sci* 1993; 9: 1214-7.

27. Tobin JF, Reiner SL, Hatam F, Zheng S, Leptak CL, Wirth DF, Locksley RM. Transfected *Leishmania* expressing biologically active IFN-γ. *J Immunol* 1993; 150: 5059-69.

28. Taylor SJ, Smith JA, Exton JH. Purification from bovine liver membranes of a guanine nucleotide-dependent activator of phosphoinositide-specific phospholipase C. Immunologic identification as a novel G-protein alpha subunit. *J Biol Chem* 1990 (suppl 65): 17150-6.

29. Kikuchi A, Kozana O, Kaibuchi K, Katada T, Ui M, Takai Y. Direct evidence for involvment of a guanine nucleotide-binding protein in chemotactic peptide-stimulated formation of inositol biphosphate and triphosphate in differential human leukemic (HL-60) cells. *J Biol Chem* 1986; 261: 11558-62.

30. Freissmuth M, Casey PJ, Gilman AG. G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *FASEB J* 1989; 3: 2125-31.

31. Moriarty TM, Padrell E, Carty DJ, Omri G, Landau EM, Lyengar R. G0 protein as signal transducer in the pertussis toxin-sensitive phophatidyl inositol pathway. *Nature* 1990; 343: 79-82.

32. Hamilton TA, Adams DO. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunol Today* 1987; 8: 151-8.

33. Olivier M, Baimbridge KG, Reiner NE. Stimulus-response coupling in monocytes infected with *Leishmania*. Attenuation of calcium transients is related to defective agonist-induced accumulation of inositol phosphates. *J Immunol* 1992; 148: 1188-96.

34. Olivier M, Brownsey RW, Reiner NE. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7481-5.

35. Kovacs EJ, Radzioch D, Young HA, Varesio L. Differential inhibition of IL-1 and TNF-alpha mRNA expression by agents which block second messenger pathways in murine macrophages. *J Immunol* 1988; 141: 3101-5.

36. Scully SP, Segel GB, Lichtman MA. Relationship of superoxide production to cytoplasmic free calcium in human monocytes. *J Clin Invest* 1986; 77: 1349-56.

37. Kemmerich B, Pennington JE. Different calcium and oxidative metabolic responses in human blood monocytes during exposure to various agonists. *J Leukocyte Biol* 1988; 43: 125-32.

38. Wright B, Zeidman I, Greig R, Poste G. Inhibition of macrophage activation by calcium channel blockers and calmodulin antagonists. *Cell Immunol* 1985; 95: 46-53.

39. Koide Y, Ina Y, Nezu N, Yoshida TO. Calcium influx and the Ca^{2+}-calmodulin complex are involved in interferon-gamma-induced expression of HLA class II molecules on HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3120-4.

40. Eilam Y, El-On J, Spira DT. *Leishmania major:* excreted factor, calcium ions, and the survival of amastigotes. *Exp Parasitol* 1985; 59: 161-8.

41. Das S, Saha AK, Remaley AT, Glew RH, Dowling JN, Kajiyoshi M, Gottlieb M. *Mol Biochem Parasitol* 1986; 20: 143-53.

42. Kukita M, Hirata M, Koga T. Requirement of Ca^{2+} for the production and degradation of inositol 1,4,5-triphosphate in macrophages. *Biochem Biophys Acta* 1986; 85: 121-8.

43. Klee CB, Crouch TH, Krinks MH. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 6270-4.

44. Bliska JB, Guan KL, Dixon JE, Falkow S. Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential Yersinia virulence determinant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1187-91.

45. Bliska JB, Galan E, Falkows S. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell* 1993; 73: 903-20.

46. Cornélis G. Le plasmide pW, élément clé de la virulence des *Yersinia*. *Med Sci* 1995; 11: 1295-304.

47. Russell DJ, Talamas-Rohana P. *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. *Immunol Today* 1989; 10: 328-33.

48. Mauel J. Macrophage-parasite interactions in *Leishmania* infection. *J Leuk Biol* 1990; 47: 187-93.

49. Turco SJ, Descoteaux A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 1992; 46: 65-94.

TIRÉS À PART

M. Ouellette.

RETROUVEZ LES REVUES MASSON SUR INTERNET

http://www.masson.fr

e-mail : revues@masson.fr