

Université de Montréal

**Découvertes de nouveaux mécanismes de résistance  
au Topotecan, un inhibiteur des topoisomérases,  
chez *Leishmania infantum***

*Par*

Chloé Rosa-Teijeiro

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)  
en sciences vétérinaires, option microbiologie

Juin 2021

© Chloé Rosa-Teijeiro, 2021

Université de Montréal

Département pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

---

*Ce mémoire intitulé*

**Découvertes de nouveaux mécanismes de résistance au Topotecan, un inhibiteur des topoisomérases, chez *Leishmania infantum***

*Présenté par*

**Chloé Rosa-Teijeiro**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Levon Abrahamyan**

Président-rapporteur

**Christopher Fernandez-Prada**

Directeur de recherche

**Rubens Monte Neto**

Codirecteur

**Alexandre Thibodeau**

Membre du jury

## Résumé

Le protozoaire *Leishmania* est à l'origine d'une maladie tropicale négligée qui peut s'avérer mortelle si elle n'est pas traitée adéquatement. Dans les dernières années, l'efficacité des médicaments utilisés dans le combat de la leishmaniose a grandement diminué en raison de la résistance du parasite à ceux-ci. Bien que le Topotecan (TPT), présentement utilisé comme antitumoral, ait démontré une activité antileishmaniale puissante ( $EC_{50}$  de l'ordre des nanomolaires), son efficacité pourrait être compromise par l'émergence de la résistance du parasite d'autant plus que des résistances tumorales cliniques au TPT ont déjà été rapportées.

Dans cette étude, les mécanismes de résistance au TPT par *Leishmania infantum* ont été caractérisés d'un point de vue moléculaire. Le génome complet des parasites sélectionnés résistants au TPT ( $16 \times EC_{50}$ ) (TPT700.1, TPT700.2, TPT700.3) a été séquencé. Le rôle dans la résistance des différents éléments génétiques identifiés a été confirmé à l'aide d'une complémentation par nucléofection épisomale dans le parasite sauvage et a été étudié avec des simulations computationnelles.

Aucune amplification ni délétion n'a été identifiée et seulement une variation mineure du nombre de chromosomes a été observée. Cependant, un polymorphisme d'un seul nucléotide non synonyme a été identifié dans le gène de la grande sous-unité de la topoisomérase IB (TOP IB), la cible du TPT, chez chacun des parasites mutants résistants conférant des niveaux de résistance variables (TPT700.1<sup>F187Y</sup> > TPT700.3<sup>W232R</sup> > TPT700.2<sup>G191A</sup> > sauvage). De plus, des modélisations *in silico* ont permis d'illustrer la proximité de ces substitutions d'acides aminés au site catalytique de TOP IB ainsi qu'au site de liaison du TPT.

En conclusion, ces résultats suggèrent qu'une mutation ponctuelle dans la grande sous-unité TOP IB est suffisante pour engendrer des hauts niveaux de résistance (environ  $24 \times EC_{50}$ ) chez TPT700.1<sup>F187Y</sup>, TPT700.2<sup>G191A</sup> et TPT700.3<sup>W232R</sup>. TPT pourrait être considéré comme un modèle pharmacologique pour l'étude de la résistance chez *Leishmania*.

**Mots-clés:** *Leishmania*, topoisomérase, Topotecan, résistance médicamenteuse, génome, polymorphisme d'un seul nucléotide, mutation.

## Abstract

*Leishmania*, a protozoan parasite, causes a neglected tropical disease that is fatal if left untreated. In recent years, the effectiveness of the drugs used to tackle leishmaniasis has decreased dramatically due to the emergence of drug resistant parasites. Even though Topotecan (TPT), currently employed as an anti-tumoral drug, has shown strong anti-leishmanial activity (its EC<sub>50</sub> being measured in nanomoles), its efficiency may be compromised by the resistance developed by the parasites, similarly to the resistance already recorded by tumoral cells to the drug.

In this study, the mechanisms of resistance to TPT by *Leishmania infantum* were characterised at the molecular level. The whole genome of parasites resistant to TPT (16 x EC<sub>50</sub>) (TPT700.1, TPT700.2, TPT700.3) was sequenced. The role of various genetic elements in the resistance mechanisms was confirmed via a complementation by episomal nucleofection in the wild type and was studied with the help of computational models.

Neither amplifications nor deletions were identified and only a minor variation in the chromosome number was observed. However, a non-synonymous single nucleotide polymorphism was identified in the gene coding the large subunit of topoisomerase IB, TPT's target, within each of the resistant mutant parasites conferring variable levels of resistance (TPT700.1<sup>F187Y</sup> > TPT700.3<sup>W232R</sup> > TPT700.2<sup>G191A</sup> > wild type). Furthermore, *in silico* models highlighted the proximity of these amino acid substitutions to the catalytic site of topoisomerase IB and also to the binding pockets of TPT.

In conclusion, these results suggest that a point mutation in the large subunit of TOP IB is sufficient to confer high levels of resistance (about 24 x EC<sub>50</sub>) to TPT700.1<sup>F187Y</sup>, TPT700.2<sup>G191A</sup> and TPT700.3<sup>W232R</sup>. Therefore, TPT can be considered a pharmacological tool to study resistance in *Leishmania*.

**Keywords** : *Leishmania*, topoisomerase, Topotecan, drug resistance, genome, single-nucleotide polymorphism, mutation.

<b>Table des matières</b>	
<b>Résumé</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>4</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>5</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>8</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>9</b>
<b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	<b>10</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>13</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>14</b>
<b>Section I – Revue de littérature</b> .....	<b>17</b>
<b>Chapitre I – <i>Leishmania</i> et leishmaniose</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1 Situation épidémiologique</b> .....	<b>17</b>
1.1.1 Contexte humain .....	17
1.1.2 Contexte canin .....	18
<b>1.2 Pathologie</b> .....	<b>20</b>
1.2.1 Leishmaniose viscérale .....	20
1.2.2 Leishmaniose cutanée .....	21
1.2.3 Leishmaniose muco-cutanée .....	21
1.2.4 Autres manifestations cutanées .....	22
1.2.5. Diagnostic .....	22
<b>1.3 Cycle de vie du parasite</b> .....	<b>24</b>
1.3.1 Vecteur .....	24
1.3.1.1 Promastigotes .....	25
1.3.2 Réservoirs .....	26
1.3.2.1 Amastigotes .....	27
<b>Chapitre II – Génomique</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1 Évolution clonale prépondérante</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2 Organisation du génome</b> .....	<b>30</b>
<b>2.2.1 Transcription polycistronique</b> .....	<b>31</b>
<b>2.3 Variations du nombre de copies des gènes</b> .....	<b>32</b>
2.3.1 Polypléidie .....	32
2.3.2 Amplification et délétion de gènes spécifiques à un locus.....	33
<b>2.5 Étude de la régulation génique</b> .....	<b>34</b>
2.5.1 Séquençage du génome complet .....	34
<b>Chapitre III – Résistance aux antiparasitaires</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1 Facteurs favorisant la résistance</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2 Dérivés de l’antimoine</b> .....	<b>38</b>
3.1.2 Mécanismes de résistance.....	39
<b>3.2 Miltéfosine (MTF)</b> .....	<b>39</b>

3.2.1 Mécanismes de résistance.....	40
<b>3.3 Amphotéricine B (AmB).....</b>	<b>40</b>
3.3.1 Mécanismes de résistance.....	41
<b>3.4 Paromomycine (PMM) .....</b>	<b>41</b>
3.4.1 Mécanismes de résistance.....	42
<b>3.5 Pentamidine (PTD) .....</b>	<b>42</b>
3.5.1 Mécanisme de résistance .....	42
<b>3.2 Stratégies contre la résistance aux antiparasitaires .....</b>	<b>43</b>
3.2.1 Combinaison de traitements .....	43
3.3.2 Repositionnement de médicaments.....	45
<b>Chapitre IV – ADN topoisomérases et leurs poisons .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1 Agents antitumoraux.....</b>	<b>48</b>
4.1.1 Topotecan: dérivé semi-synthétique de la camptothécine .....	48
<b>4.2 Topoisomérase: la cible du Topotecan.....</b>	<b>49</b>
4.2.1 Topoisomérases de type I.....	50
4.2.2.1 Mécanisme d’action de la topoisomérase IB au niveau moléculaire .....	51
4.2.2.2 Topoisomérase IB humaine .....	53
4.2.2.3 Topoisomérase IB leishmaniale .....	54
<b>4.3 Mécanisme d’action du Topotecan .....</b>	<b>56</b>
<b>4.4 Résistance tumorale.....</b>	<b>56</b>
<b>Section 2: Description du projet de maîtrise .....</b>	<b>58</b>
<b>1. Problématique .....</b>	<b>58</b>
<b>2. Hypothèse de recherche .....</b>	<b>59</b>
<b>3. Objectifs spécifiques .....</b>	<b>59</b>
<b>Section 3: Article.....</b>	<b>60</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>60</b>
<b>3.1 Background .....</b>	<b>61</b>
<b>3.2 Methods .....</b>	<b>63</b>
3.2.1 <i>Leishmania</i> cultures .....	63
3.2.2 Mutant selection .....	63
3.2.3 Drug susceptibility assays .....	64
3.2.4 Whole-genome sequencing of TPT-resistant mutants .....	64
3.2.5 DNA constructs and nucleofection .....	65
3.2.6 Computational methods for the <i>in silico</i> study of <i>Leishmania</i> topoisomerase 1B .....	65
<b>3.3 Results .....</b>	<b>67</b>
3.3.1 <i>In vitro</i> resistance selection and characterization of the TPT-resistant mutants .....	67
3.3.2 Comparative WGS.....	67
3.3.3 Impact of LiTOP1B mutant variants in <i>L. infantum</i> TPT drug resistance .....	68
3.3.4 Structural effect of the SNPs and impact on TPT sensitivity.....	69
<b>3.4 Discussion .....</b>	<b>70</b>
<b>3.5 Conclusions .....</b>	<b>73</b>

3.5.1 Acknowledgements .....	74
<b>3.6 Abbreviations.....</b>	<b>86</b>
<b>3.7 References .....</b>	<b>88</b>
<b>Section 4: Discussion .....</b>	<b>96</b>
<b>Section 5: Conclusion .....</b>	<b>104</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>105</b>

# Liste des tableaux

## Section 1 – Revue de littérature :

<b>Tableau 1.</b> Agents étiologiques des leishmanioses tégumentaires.....	24
<b>Tableau 2.</b> Homologation du TPT en Amérique du Nord aux usages humain et vétérinaire. ....	49
<b>Tableau 3.</b> Sous-familles des topoisomérases et leurs conditions d’action. ....	51

## Section 3 - Article :

<b>Table 4.</b> Overview of the common mutated genes in the three TPT-resistant mutants. ....	82
<b>Table 5.</b> Analysis of the hydrogen-bond network in covalent complex simulations. ....	84
<b>Table 6.</b> Analysis of the hydrogen-bond network in non-covalent complex simulations.....	85

# Liste des figures

## Section 1 – Revue de littérature :

<b>Figure 1.</b> Cycle de vie de <i>Leishmania</i> . .....	<b>28</b>
<b>Figure 2.</b> Transcription polycistronique chez <i>Leishmania</i> .....	<b>32</b>
<b>Figure 3.</b> Mécanisme d’action de la topoisomérase IB humaine. ....	<b>53</b>
<b>Figure 4.</b> La TOP IB humaine et la TOP IB de <i>L. donovani</i> . ....	<b>56</b>

## Section 3 - Article :

<b>Figure 5.</b> Phenotypic characterization of <i>L. infantum</i> TPT-resistant mutants selected in vitro.....	<b>76</b>
<b>Figure 6.</b> Dynamics of aneuploidy of <i>L. infantum</i> after in vitro adaptation to TPT.....	<b>77</b>
<b>Figure 7.</b> Impact of overexpression of the leishmanial top1BWT gene, as well as three mutated versions, on the TPT-sensitivity profile of <i>L. infantum</i> . ....	<b>78</b>
<b>Figure 8.</b> Structural alignment between LiTop1B (PDB 2b9s) and hTop1B crystallized in covalent complex with DNA and in the presence of the inhibitor topotecan (PDB 1k4t). ....	<b>79</b>
<b>Figure 9.</b> Covalent simulations reporting the three-dimensional arrangement of the catalytic pentad in the four systems and its intra-pentad and pentad-DNA hydrogen bonds. ....	<b>80</b>
<b>Figure 10.</b> Non-covalent simulations, reporting the three-dimensional arrangement of the catalytic pentad in the four systems and its intra-pentad and pentad-DNA hydrogen bonds. ....	<b>81</b>

## Liste des sigles et abréviations

ABC: Cassette liant l'ATP – (*ATP-Binding Cassette*)

AM: Antimoniote de méglumine

AmB: Amphotéricine B

AQP1: Aquaglycéroporine 1

ARNm: ARN messenger

As(III): Arsenic trivalent

AVCI: Années de vie corrigées de l'incapacité

BVA: *British Veterinary Association*

CDC : *Centers for Disease Control and Prevention*

CPT: Camptothécine

DNDi: *Drug for Neglected Diseases initiative*

DRO: Dérivé réactif de l'oxygène

ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*

FDA: *Food and Drug Administration*

gsu: Grande sous-unité

INSPQ: Institut national de santé publique du Québec

LCan: Leishmaniose canine

LMC: Leishmaniose mucocutanée

LV: Leishmaniose viscérale

Mpb: Millions de paires de bases

MDR-1: *multiple-drug-resistance-1*

MP: Macrophage

MSF: Médecins sans frontières

mt: mitochondriale

MT: Transporteur à la miltéfosine

MTF: Miltéfosine

MTN: Maladie tropicale négligée

nc: Nucléaire

NT: Neutrophiles

OMS: Organisation mondiale de la santé

OPS : Organisation panaméricaine de la santé

PhRMA: *Pharmaceutical Research and Manufacturers of America*

PMM: Paromomycine

psu: Petite sous-unité

PTD: Pentamidine

Sb(V): Antimoine pentavalent

Sb(III): Antimoine trivalent

SGS: Stibogluconate de sodium

SHR: séquence homologue répétée

SNP: Polymorphisme d'un seul nucléote – (*Single Nucleotide Polymorphisms*)

TOP: Topoisomérase

VNC: nombre du nombre de copies des gènes

*À ma tante Shona à qui j'ai dit : « Quand je serai grande, je serai une scientifique comme toi! »,*

## Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier **Dr Fernandez-Prada**, mon directeur de recherche, pour la confiance qu'il a eue en moi dans la réalisation de ce projet et pour toutes les opportunités qu'il m'a offertes pendant mon parcours D.M.V.-M.Sc. J'aimerais aussi remercier **Dr Do Monte-Neto** et son équipe sans qui mon séjour inoubliable au Brésil n'aurait pas été possible. Merci aussi infiniment à mes collègues de laboratoire, dont **Noélie, Audrey et Victoria** qui m'ont toujours prêté main-forte quand j'en avais besoin. Merci à **Dre Minguez-Menendez** pour son écoute entre mères et son incroyable talent en graphisme.

À **Dr Leprohon et Dre D'Annessa**, merci pour vos collaborations essentielles à la réussite de ce projet.

À **Jesse et Lily**, mes fidèles supporteurs, je vous remercie d'avoir su me faire rire dans les moments plus difficiles qu'implique un double programme.

Merci à mes parents et ma soeur, **Jean, Maruxa et Sarah**, pour m'avoir toujours soutenu et surtout en début de parcours lors que je ne savais pas que je deviendrais vétérinaire.

À ma tante **Porte**, merci pour ton soutien, tes commentaires afin d'améliorer mon travail, tes connaissances et le plus important, pour ton inspiration.

## Introduction

Au tout début du 20<sup>e</sup> siècle, William Boog Leishman, un pathologiste de l'armée britannique, découvre de multiples corps ovoïdes microscopiques en examinant le frottis de la rate d'un soldat anglais ayant été déployé en Inde. Le patient présentait de la fièvre, de l'anémie et une splénomégalie. Le Dr Boog Leishman attribue alors l'infection à des protozoaires du genre *Trypanosomes* déjà identifiés en Afrique et en Amérique du Sud (Bailey et Bishop, 1959). En 1903, il publie un article dans le *British Medical Journal* au sujet de sa découverte dans lequel il nomme cette condition la Fièvre de Dum Dum. Quelques mois plus tard, à Madras en Inde, indépendamment, le Dr Charles Donovan confirme la découverte des «corps de Leishman» dans le sang et la rate de patients présentant des signes cliniques similaires à ceux du soldat anglais (Boyd, 1966). Pendant ce temps, à Biskra dans le nord de l'Algérie, les frères Sergent de l'Institut Pasteur d'Alger découvrent que cette maladie est transmise par un phlébotome maintenant connu sous le nom de la mouche des sables (Théodoridès, 1997). Sans le savoir, ils ont tous contribué à la découverte du protozoaire du genre *Leishmania* : l'agent étiologique de la leishmaniose.

Aujourd'hui, la leishmaniose figure parmi la liste des maladies tropicales négligées (MTNs) de l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Ces maladies, toutes d'origines infectieuses, étaient autrefois dispersées un peu partout dans le monde. Maintenant, elles se retrouvent surtout dans les régions les plus pauvres du globe (OMS, 2010). Elles sont qualifiées de négligées, parce qu'elles touchent principalement les communautés les plus démunies du globe et il est difficile d'en faire une préoccupation importante auprès de l'ensemble de la population et de ses décideurs internationaux (OMS, 2012). Pourtant, selon Médecins sans frontières (MSF), *Leishmania* est le second parasite le plus meurtrier après *Plasmodium*, l'agent causal du paludisme (MSF, 2013). La pauvreté engendre et maintient des conditions insalubres et l'inaccessibilité aux soins médicaux ce qui contribue à conserver les MTNs omniprésentes dans ces régions rendant les populations qui y vivent d'autant plus vulnérables. Ce cercle vicieux entre pauvretés et

MTNs engendrent un fardeau économique important dans les pays touchés (OMS, 2010). Ce groupe de maladies se caractérise également par le potentiel de lésions graves et chroniques et ultimement à la mort (OMS, 2010). La majorité des MTNs sont d'origine parasitaire dont la leishmaniose. Les statistiques fiables sur la prévalence de la leishmaniose sont peu nombreuses, mais indiquent qu'environ 12 millions de personnes dans le monde sont affectées par la maladie et qu'entre 900 000 et 1.6 million de nouvelles personnes en sont atteintes chaque année (OPS/OMS, 2017). Selon le *Drug for Neglected Diseases initiative* (DNDi), plus d'un milliard de personnes sont à risque de développer la leishmaniose et entre 20 000 et 30 000 décès imputables à cette maladie sont recensés chaque année (OPS/OMS, 2017).

Le contrôle de la leishmaniose est difficile notamment parce que les tests diagnostiques non invasifs et fiables n'existent pas et les mesures de prévention et de traitement sont peu efficaces. Les thérapies disponibles contre cette maladie sont restreintes et présentent plusieurs désavantages importants: un faible index thérapeutique, un coût élevé, une administration par voie parentérale et des soins de longue durée. La pharmacopée est constituée de cinq médicaments principaux soit l'amphotéricine B, le stibogluconate de sodium qui contient de l'antimoine, la miltéfosine, la paromomycine et la pentamidine (Balaña-Fouce et al., 2014). Dans plusieurs régions du monde, les traitements deviennent inefficaces en raison de l'émergence de la résistance chez les parasites. Par exemple, dans le nord du Bihar en Inde, depuis les 20 dernières années, plus de la moitié des patients traités avec SGS ne guérissent pas en raison de ce phénomène (Ponte-Sucre et al., 2017).

Le processus de recherche et développement des médicaments est long et peut prendre une dizaine d'années pour un seul traitement selon *The Pharmaceutical Research and Manufacturers of America* (PhRMA). De plus, il en coûte environ 2,6 milliards de dollars pour chaque nouveau médicament mis sur le marché (PhRMA, 2015). C'est pourquoi le repositionnement de médicament gagne du terrain. Cette stratégie consiste à utiliser un

médicament qui existe déjà pour traiter d'autres maladies que la maladie initiale pour laquelle celui-ci a été développé. Ceci permet de proposer rapidement de nouveaux plans thérapeutiques à moindre coût (Pushpakom et al., 2019). Dans la présente étude, le Topotecan (Hycamtin®), un antitumoral déjà homologué, est proposé comme médicament modèle. L'objectif principal de cette étude est de déterminer le ou les mécanismes de résistance, d'un point de vue moléculaire, que pourrait potentiellement développer *Leishmania* lorsqu'exposé au Topotecan (TPT).

## Section I – Revue de littérature

### Chapitre I – *Leishmania* et leishmaniose

#### 1.1 Situation épidémiologique

L'étude de la distribution de la leishmaniose est complexe, car elle doit inclure plusieurs facteurs, dont ceux qui affectent l'hôte tel que les déplacements entre régions et la densité populationnelle ainsi que les facteurs qui influencent les parasites comme la résistance aux antiparasitaires. Puisque la leishmaniose est transmise par la mouche des sables (du genre *Phlébotomus* dans l'Ancien Monde et du genre *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde), les facteurs propres à celui-ci comme son taux de morsure et sa longévité de même que les facteurs qui l'influencent tels que les changements climatiques sont aussi à considérer (Bates, 2007; Loker et Hofkin, 2015).

##### 1.1.1 Contexte humain

La leishmaniose est retrouvée sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique (OMS, 2019). Selon l'Organisation mondiale de la santé, la leishmaniose est endémique à 98 pays (OMS, 2021). La maladie est généralement caractérisée par de grandes épidémies dans des villes densément peuplées, car l'humain peut alors agir comme un réservoir du parasite (cycle anthroponotique). La transmission de la leishmaniose est accentuée dans les zones de guerres et dans les camps de réfugiés, puisque la densité populationnelle est souvent très élevée et que les conditions d'hygiène y sont rudimentaires. De plus, l'accessibilité aux soins y est souvent diminuée, voire inexistante, ce qui permet à la maladie de persister à ces endroits. Par exemple, depuis le début du conflit qui sévit en Syrie, le nombre de cas de leishmaniose cutanée rapporté a pratiquement doublé et se concentre principalement dans la population des personnes réfugiées (Al-Salem et al., 2016).

De plus, avec le réchauffement climatique, les aires de répartition des animaux se modifient et c'est ainsi que la mouche des sables, soit le vecteur de cette maladie, peut

parfois se retrouver beaucoup plus au nord que sa zone d'origine. Selon le *Center of Disease Control and Prevention* (CDC), bien que rare, des cas humains indigènes de leishmaniose ont été rapportés dans les états du Texas et de l'Oklahoma et, plus récemment, en 2014, un cas autochtone a été rapporté au Dakota du Nord (Clarke et al., 2013; Douvoyiannis et al., 2014). Également, l'écotourisme se faisant de plus en plus populaire, plus de gens affluent vers les régions endémiques à la leishmaniose les rendant ainsi davantage vulnérables à cette maladie. Même les pays non endémiques ne sont d'ailleurs plus à l'abri d'infections, car des transmissions verticales (mère-fœtus) à partir de personnes infectées ayant voyagé sont possibles (Mescouto-Borges et al., 2013). Plusieurs autres facteurs peuvent influencer la distribution de la maladie tels que: les catastrophes naturelles, le manque de médicaments efficaces, l'insalubrité et la proximité physique d'un réservoir de la maladie comme le chien.

### **1.1.2 Contexte canin**

La prévalence de la leishmaniose canine (LCan) est importante dans plusieurs pays, et ce particulièrement dans le bassin méditerranéen et en Amérique latine. Seulement dans le sud de l'Europe, on estime qu'environ 2.5 millions de chiens sont infectés par *Leishmania infantum*. Le nombre de pays endémiques à la LCan est en augmentation (Baneth et al., 2008). Dernièrement, des cas autochtones chez des chiens en Finlande ont même été décrits (Karkamo et al., 2014). Les changements de distribution de la maladie sont dus, d'une part, aux mouvements du vecteur et d'une autre part, aux va-et-vient des chiens entre une zone endémique et une zone non endémique. L'importation de chiens provenant de pays endémiques, tels que le Maroc, la Grèce et l'Espagne, vers des pays non endémiques, tels que le Canada et le Royaume-Uni, connaît une tendance grandissante dans le monde et elle n'est pas sans risque. En effet, selon la *British Veterinary Association* (BVA):

«Worryingly, BVA's survey shows that 40% of companion animal vets have seen new or rare conditions in their practice over the last year that are associated with dog import, with the potentially fatal zoonotic disease leishmaniasis emerging as the most common one [...]».  
(BVA, 2018)

Les animaux qui reviennent infectés ou qui arrivent infectés d'un pays sont source d'inquiétude grandissante au Canada. Les cas qui sont les plus problématiques sont souvent ceux dont l'historique médical est inconnu: une situation fréquente lors d'adoption d'animaux. D'ailleurs, l'an passé, un cas de leishmaniose chez un chien importé du Maroc a été diagnostiqué au Québec (Wagner et al., 2020). Un rare cas de la maladie, mais qui n'est pas unique. Effectivement, d'autres chiens ont été diagnostiqués avec la leishmaniose en Amérique du Nord.

Aux États-Unis, en 2000, dans l'état de New York, des chiens provenant d'un chenil de Foxhound ont été diagnostiqués séropositifs à *Leishmania*. Suivant cette découverte, des chiens séropositifs au parasite ont été détectés dans 22 états du pays et 2 provinces canadiennes soit l'Ontario et la Nouvelle-Écosse. Une transmission n'impliquant pas le vecteur était en cause. La transmission transplacentaire étant la plus probable, il est tout de même possible qu'un autre mode de transmission soit en cause comme par le lait, lors de transfusion sanguine et/ou par contact direct avec le sang (Petersen et Barr, 2010). Plus récemment, dans le nord de la Californie, une transmission verticale aurait aussi été à l'origine d'un cas de leishmaniose chez un chien dont la mère provenait de la Serbie (Alonso, F. et al., 2020).

De plus, même si pour le moment, la mouche des sables pourrait ne pas être retrouvée dans le pays qui accueille l'animal, il est possible que d'autres vecteurs comme la tique brune du chien (*Rhipicephalus sanguineus*) puissent jouer un rôle dans la transmission (Campos et Costa, 2014; Dantas-Torres, 2011 ; Solano-Gallego et al., 2012) .

## **1.2 Pathologie**

Plusieurs manifestations cliniques de la leishmaniose sont décrites chez l'humain, mais les trois principales formes sont: la leishmaniose cutanée (LC), la leishmaniose muco-cutanée (LCM) et la leishmaniose viscérale (LV). Cette dernière est aussi connue sous le nom de fièvre noire ou kala-azar (OMS, 2020). Chez le chien, il n'y a pas ces types de distinctions, car la LCan est plutôt décrite comme engendrant à la fois des symptômes viscéraux et, à la fois, des signes cliniques dermiques.

Afin de hiérarchiser les maladies, une mesure nommée «années de vie corrigées de l'incapacité» (AVCI) est utilisée et permet de calculer combien d'années en bonne santé une personne perd en raison de sa maladie en considérant la morbidité et la mortalité (INSPQ, 2012). L'AVCI totale mondiale de la leishmaniose, toutes formes cliniques prises en compte, est près de 2.5 millions et se classait au deuxième rang des maladies parasitaires après le paludisme (OMS, 2020).

### **1.2.1 Leishmaniose viscérale**

Suite à la piqure infectante du phlébotome, seulement 10% des individus développeront la maladie (Dos Santos et al., 2016). La LV peut être divisé en trois formes qui peuvent évoluer et représenter différents stades de la maladie soient la LV asymptomatique, la LV subclinique et la LV clinique (Gama et al., 2004 ; Bispo et al., 2020 ; Burza et al., 2018). La LV subclinique est caractérisée par une présentation clinique non spécifique: diarrhée, fièvre faible, toux intermittente et une perte de poids (Badaro et al., 1986 ; Gama et al., 2004). Les symptômes et les signes cliniques de la LV clinique apparaissent de façon progressive sur plusieurs semaines et même sur plusieurs années (Karunaweera et Ferreira, 2018). Une fièvre au long cours, hépatomégalie, splénomégalie, une anémie, une leucopénie, une perte de poids et une faiblesse sont présents. Si aucun traitement n'est donné, 95% des patients mourront , le plus souvent, d'une infection bactérienne secondaire en raison d'une leucopénie sévère ou d'une

hémorragie des suites de l'insuffisance hépatique en quelques mois après le début des signes cliniques (Pan American Health Organization, 2012; MSF, 2020; Sundar, 2015).

### **1.2.2 Leishmaniose cutanée**

La LC n'engendre pas la mort de l'individu qui en est atteint. Cette forme de la maladie cause des lésions cutanées principalement ulcéreuses et possiblement compliquées par une surinfection bactérienne se limitant au site d'inoculation du phlébotome (Palumbo, 2010). Toutefois, la lésion peut parfois prendre l'apparence d'une verrue. On qualifie donc la LC de maladie polymorphique (Silveira et al., 2004). L'évolution de cette forme clinique est lente et il faudra, en général, plus d'une semaine pour que la lésion atteigne sa taille définitive. L'ulcère peut guérir sans traitement et est sans douleur, mais peut aussi engendrer des cicatrices diffuses et progressives (Litt et al., 2012; Garapati et al., 2018; Scorza et al., 2017). Si cette cicatrisation extensive est prise en considération, l'AVCI de la LC augmente de 10 fois en raison de l'exclusion sociale qu'elle peut engendrer et de la stigmatisation qui en découle dans certains pays (Aflatoonian et al., 2019). Par exemple, en Afghanistan, les femmes qui sont affectées par cette forme de la maladie ne peuvent pas avoir de contact rapproché avec leurs enfants, car il serait faussement trop risqué de leur transmettre la maladie (Bailey et al., 2019).

### **1.2.3 Leishmaniose muco-cutanée**

La LMC peut être le résultat des métastases tardives de la LC ou peut être le prolongement d'un ulcère de la LC localisé près des muqueuses (Amato et al., 2008). Il a été estimé qu'entre 1 et 10% des cas de LC vont progresser vers la LMC. Cette dernière forme de la maladie s'attaque plus particulièrement aux muqueuses du nez, de la bouche et de la gorge. Progressivement, elle atteint aussi le cartilage ce qui mène à des complications secondaires comme des infections et des obstructions respiratoires. La LMC, contrairement à la LC, peut s'accompagner de signes cliniques systémiques comme de la fièvre ou de l'ictère causé par une hépatomégalie. Bien que la LC ne soit pas dangereuse pour la vie du patient, la LMC peut engendrer la mort si elle n'est pas

traitée (revue dans David et Craft, 2009). Effectivement, lorsque les dommages aux voies respiratoires deviennent importants, une pneumonie par aspiration peut survenir et entraîner la mort (Markle et al., 2004).

#### **1.2.4 Autres manifestations cutanées**

La LC va progresser, dans 10% des cas, vers des formes plus graves dont la LMC, mais aussi la LC diffuse, qui cause des nodules non ulcératifs répandus sur tout le corps, la LC disséminée, qui cause un grand nombre de papules et de lésions acnéiformes, et la LC récidivante (Burza et al., 2018; Hashiguchi et al., 2016; Reithinger et al., 2007; Scorza et al., 2017). La LC diffuse ainsi que la LC disséminée sont souvent confondues en raison de leurs présentations cliniques très similaires. D'autres caractéristiques permettent aux cliniciens de les différencier telles que la présence ou non de parasites dans les lésions. Ils seront trouvés en grand nombre dans la LC diffuse, mais seront très rares dans la LC disséminée (Hashiguchi et al., 2016).

#### **1.2.5. Diagnostic**

Il existe différentes façons de diagnostiquer la leishmaniose et il est recommandé d'utiliser plusieurs tests afin d'augmenter les probabilités d'obtenir un résultat positif étant donné le manque de sensibilité des outils diagnostics présentement disponibles (Aronson et al., 2017). De plus, plusieurs tests couramment utilisés ne permettent pas de différencier une infection active d'une infection asymptomatique. Ils ne permettent pas non plus d'identifier les cas de rechutes, car plusieurs des tests utilisés resteront positifs plusieurs mois après la guérison du patient (Srivastava et al., 2011). Aussi, il est souvent difficile d'identifier l'espèce du parasite en cause. Un aspect important, car selon l'espèce, le pronostic peut varier (CDC, 2021). Celle-ci ne sera connue que dans 70% des cas avec la LC et dans 50% des cas avec la LCM (Handler et al., 2015).

Le diagnostic final et officiel de la leishmaniose repose sur la visualisation directe des parasites ou par la mise en évidence de son ADN suite à l'aspiration de la rate, de la

moelle osseuse et/ou d'un nœud lymphatique dans le cas de la LV ainsi que de la peau pour la LC et la LMC. Une procédure qui peut parfois être dangereuse pour le patient. Certains tests sérologiques (recherche d'antigènes et d'anticorps) sont disponibles et peuvent être effectués afin de supporter un diagnostic de LV (CDC, 2021).

Maladie	Espèces de <i>Leishmania spp.</i> en cause
LC	<i>L. major</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. aethiopica</i> , <i>L. panamanensis</i> , <i>L. infantum</i> , <i>L. donovani</i>
LMC	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. panamanensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. amazonensis</i> .
LC diffuse	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. pifanoi</i> , <i>L. aethiopica</i> , <i>L. major</i>
LC disséminée	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. panamanensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. amazonensis</i>

**Tableau 1.** Agents étiologiques des leishmanioses tégumentaires.

Selon les différentes espèces de *Leishmania* en cause, la forme clinique peut varier. Reproduit et adapté à partir de (Scorza et al., 2017).

### 1.3 Cycle de vie du parasite

*Leishmania* est un protozoaire, c'est-à-dire un organisme unicellulaire eucaryote, qui possède un cycle de vie comprenant un vecteur, le phlébotome, qui joue aussi le rôle d'hôte intermédiaire, et d'un hôte définitif, soit l'humain ou le chien par exemple. Ces derniers sont aussi reconnus comme des réservoirs de la maladie. Dans le vecteur, les parasites sont des promastigotes, la forme mobile extracellulaire, tandis que dans le réservoir, ils sont des amastigotes, c'est-à-dire leur forme intracellulaire non mobile.

#### 1.3.1 Vecteur

D'un point de vue étymologique, le mot phlébotome provient de deux mots grecs: *phlebos* qui veut dire «veine» et *tenmein* pour «couper» (Kravetz, 2000). Les phlébotomes se nourrissent à partir d'un « pool » sanguin (télmophagie) et non directement à partir d'un vaisseau sanguin (solénophagie) (Volfova et al., 2008). Plus de 500 espèces de phlébotomes ont été identifiées à ce jour, mais seulement 30 d'entre elles peuvent transmettre le parasite *Leishmania* (OMS, 2019). Ils sont retrouvés dans les régions tropicales et tempérées. Aussi appelée la mouche des sables, celle-ci ne couvre pas de grandes distances, car même un faible vent peut atténuer sa capacité à voler comparativement aux moustiques. Elle reste donc souvent proche de leur site de reproduction (ECDC, 2020; Maroli et al., 2012). Le mâle et la femelle se nourrissent du nectar des fruits et seulement la femelle va se nourrir du sang des mammifères, car elle

a besoin d'un apport énergétique plus important en vue de la ponte de ses œufs (ECDC, 2020)

La mouche des sables se nourrit du sang de plusieurs hôtes vertébrés incluant les mammifères et les oiseaux. Les chiens, périodostomes surtout, les rongeurs, les chats, les renards sont responsables du cycle zoonotique dans certaines régions du globe, tandis que les humains peuvent maintenir un cycle anthrozoootique lorsque la maladie y est hyperendémique (Hassan et al., 2009 ; Roque et Jansen, 2014).

À ce jour, le phlébotome est le seul vecteur reconnu et accepté de la leishmaniose (Dantas-Torres, 2011). Cependant, certaines études rapportent une possible transmission par les puces et les tiques chez le chien et même par les moucheron de la famille des Ceratopogonidae chez le kangourou (Colombo et al., 2011; Coutinho et Linardi, 2007; Dantas-Torres, 2011; Dougall et al., 2011, Ferreira et al., 2009).

#### **1.3.1.1 Promastigotes**

Le parasite se développe dans l'intestin du phlébotome à la suite de son repas de sang. Pendant 7 à 14 jours, les protozoaires vont se développer à l'intérieur du vecteur en passant de promastigotes procycliques à promastigotes nectomonades qui s'attacheront à l'épithélium intestinal pour éviter d'être expulsés lors de la défécation par la mouche des sables (Schlein, 1993). Ensuite, les nectomonades deviennent soit des promastigotes leptomonades, qui eux deviendront à leur tour des promastigotes haptomonades, ou des promastigotes métacycliques (Sunter et Gull, 2017). Les leptomonades vont contribuer à produire un bouchon de gel composé majoritairement de phosphoglycoprotéines et de phosphatases. Ce faisant, ils vont bloquer l'intestin moyen du phlébotome ce qui va aider à déclencher la régurgitation lors du repas de sang du phlébotome (Bates et Dwyer, 1987; Rogers et al., 2002). Les haptomonades ne font pas la division binaire ou que très rarement (Gossage et al., 2003). Ils sont fixés à la valve stomodéale, localisée entre l'intestin moyen et l'oesophage, à l'aide

d'hémidesmosomes (Sunter et Gull, 2017). Les haptomonades restent fermement fixés à cet endroit et contribuent probablement à maintenir la présence de parasite dans le vecteur (Hendry et Vickerman, 1988; Sunter et Gull, 2017).

Une fois infecté, le phlébotome le sera pour toute la durée de sa vie soit 4 à 15 jours (Bates, 2018 ; Ferro et al., 1998). Le promastigote métacyclique est une forme libre, infectieuse et préadaptée à l'hôte vertébré (Bates, 2018 ; Loker et Hofkin, 2015). Cette forme est flagellée (Pace, 2014). Contrairement aux leptomonades, les promastigotes métacycliques ne peuvent pas se diviser (Gossage et al., 2003). Cependant, une recherche récente a démontré que les promastigotes métacycliques peuvent se différencier pour redevenir des leptomonades et se multiplier. Appelés rétroleptomonades (Figure 1), ils contribuent, à chaque nouveau repas de sang, à augmenter l'infectiosité du phlébotome (Serafim et al., 2018).

Les parasites *Leishmania* du sous-genre *Leishmania*, soit de l'Ancien Monde, vont se développer strictement dans l'intestin moyen de la mouche des sables, tandis que *Leishmania* du sous-genre *Vianna*, soit du Nouveau Monde, vont se développer dans l'intestin postérieur puis migreront vers l'intestin moyen pour terminer leur différenciation (Lainson et Shaw, 1987).

### **1.3.2 Réservoirs**

Pour être considéré comme un réservoir, l'hôte définitif doit être une source de parasites pour le phlébotome et donc contribuer au maintien de la maladie. Plusieurs animaux vertébrés sont considérés comme d'importants réservoirs du parasite: les paresseux, l'opossum, le tatou, différents rongeurs, etc. Cependant, les chiens domestiques et errants, de par leur proximité avec les populations humaines, sont parmi les réservoirs plus significatifs en Amérique du Sud et dans le bassin méditerranéen (Baneth et al., 2008; Roque et Jansen, 2014). Les rongeurs sont d'importants réservoirs en Afrique et en Asie. Cependant, dans certains pays comme l'Inde, un cycle anthroponotique est davantage prévalent. Peu importe le réservoir

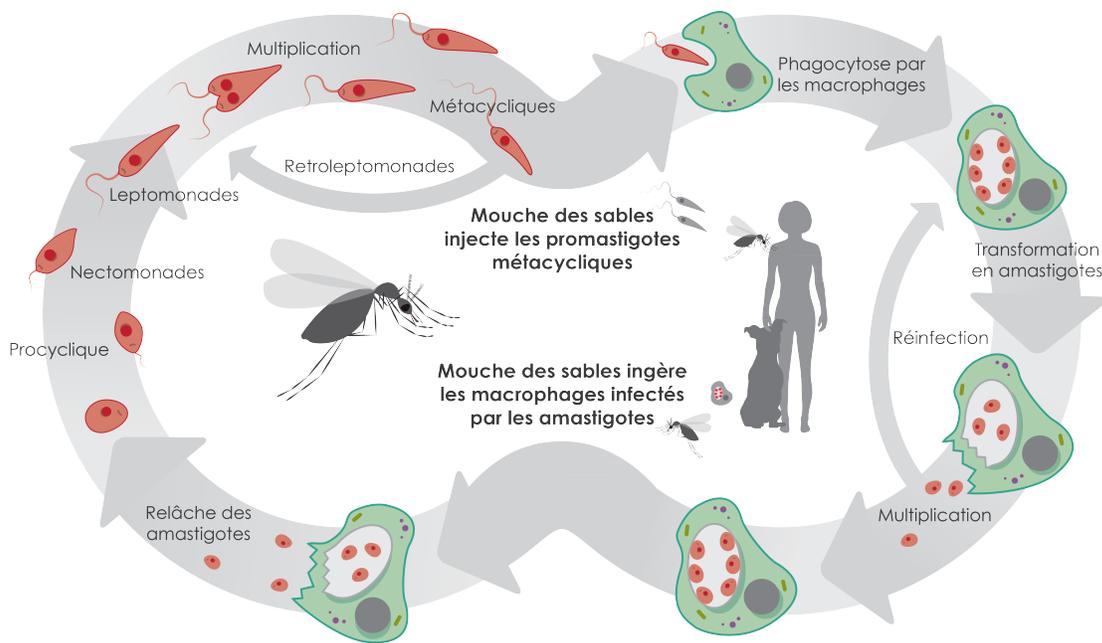
en cause, le parasite est retrouvé, chez l'hôte définitif, sous sa forme non motile: l'amastigote.

### **1.3.2.1 Amastigotes**

Après le repas sanguin du phlébotome, les parasites, dans le sang de l'hôte définitif, sont retrouvés sous forme d'amastigotes. Ils ne sont alors pas flagellés (Pace, 2014). Cette forme est non mobile et est contenue dans les cellules phagocytaires (Boyd, 1966).

Différents types de cellules sont infectés lors de l'entrée de *Leishmania* dans le corps de l'hôte. Suite à la pique du phlébotome et de l'injection des protozoaires, les neutrophiles (NTs) sont les premiers à arriver au site d'infection. Ils phagocytent les parasites, mais ne sont pas capables de les éliminer (Van Zandbergen et al., 2004). Ils agissent comme chevaux de Troie. Ainsi, ils vont sécréter la chimiokine *macrophage inflammatory protein-1 $\beta$*  (MIP-1 $\beta$ ) qui va attirer les MPs au site d'infection. Une fois arrivés, les MPs vont phagocyter les NTs apoptotiques qui contiennent les parasites, encore sous la forme de promastigotes, sans activer leurs fonctions antimicrobiennes (Van Zandbergen et al., 2004). C'est ainsi que les parasites se fauillent jusque dans les MPs pour les infecter « silencieusement ».

Une fois à l'intérieur des MPs, les promastigotes se transforment en amastigotes notamment en raison d'un changement acide du pH et aussi en raison de l'augmentation de la température reliée à la différence thermique entre le corps de la mouche et celui de l'hôte vertébré (Mauël, 1990; Podinovskaia et Descoteaux, 2015). Après multiplication, les MPs lysent sous la charge parasitaire relâchant ainsi les amastigotes ce qui permet l'infection d'autres cellules avoisinantes (Hommel, 1999).



**Figure 1.** Cycle de vie de *Leishmania*.

Les parasites sont sous la forme d'amastigote contenus dans les cellules phagocytaires de l'hôte vertébré. Lors du repas de sang, le phlébotome s'infecte et les amastigotes se transforment alors en promastigotes procycliques dans l'intestin pour devenir des nectomonades afin de survivre à la digestion. Ces derniers vont devenir des leptomonades qui deviendront soit des haptomonades ou des promastigotes métacycliques qui peuvent à leur tour devenir des rétroleptomonades. La prochaine piqûre du phlébotome est alors infectieuse et les parasites infectent les macrophages de l'hôte définitif. Le cycle recommence ensuite avec le prochain repas sanguin du vecteur. Figure réalisée par Dre Aida Mínguez-Menendez, Laboratoire du Dr Fernandez-Prada, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal. Figure adaptée de (Wagner et al., 2019)

## Chapitre II – Génomique

### 2.1 Évolution clonale prépondérante

Bien qu'encore discuté, *Leishmania*, comme la majorité des pathogènes, posséderait un mode de reproduction clonal. Cependant, le déficit hétérozygote significatif détecté chez différentes souches de *L. braziliensis* ne concorde pas avec une clonalité stricte (Rougeron et al., 2009). Effectivement, dans ce cas, des résultats contraires seraient attendus: une accumulation des mutations et une augmentation de l'hétérozygoté (De Meeûs et al., 2007). Cette découverte indiquerait donc que qu'une reproduction entre les parasites est aussi est important (Rougeron et al., 2009). La différence entre les deux quant aux conséquences sur le génome réside principalement dans la capacité de réparation de l'ADN lors d'homogamie (Tibayrenc et Ayala, 2013).

Puisque le mode de reproduction est encore sujet à débat chez les Trypanosomes, certains auteurs proposent d'adopter la théorie de l'évolution clonale prépondérante qui se définit par des niveaux très faibles de recombinaisons génétiques (Tibayrenc et Ayala, 2013). Bien que très peu fréquentes, celles-ci n'en seraient pas pour le moins importantes (Kuhls et al., 2013). Effectivement, la reproduction sexuée permet, entre autres, de restreindre l'effet des mutations et de générer de nouvelles combinaisons de matériel génétique (Rougeron et al., 2017). Récemment, des hybrides génomiques ont été produits à partir d'une co-culture axénique de deux souches de *L. tropica*. Grâce à cette avancée, des études futures pourraient permettre de comprendre l'impact de ce mode de reproduction à l'échelle d'une génération (Louradour et al., 2020).

Un mode de reproduction mixte confère fort probablement au parasite un avantage majeur, puisqu'il est coûteux biologiquement de maintenir différents mécanismes de multiplication. Il permettrait au parasite de s'adapter à la variété d'environnements extrêmes auquel il est exposé durant son cycle de vie: l'intestin du phlébotome, le sang de l'hôte vertébré, le milieu intracellulaire des macrophages par exemple. La clonalité

permet une croissance exponentielle de la population parasitaire et représente un moyen rapide de disséminer les gènes les plus favorables à un environnement donné (Rougeron et al., 2017).

## 2.2 Organisation du génome

La taille du génome du parasite varie entre 32,0 et 32,8 millions de paires de bases (Mpb) en fonction de l'espèce (Peacock et al., 2007). Cette variation s'explique, entre autres, par le fait que *Leishmania* du sous-genre *Leishmania* (Ancien Monde) possède 34 ou 35 chromosomes, tandis que *Leishmania* du sous-genre *Viannia* (Nouveau Monde) en possède 36. La taille des chromosomes est aussi très variable soit entre 0,28 Mb et 28 Mb (Kazemi, 2011). Encore plus particulier, plusieurs parasites au sein d'une même population clonale ne présentent pas les mêmes nombres de chromosomes homologues ce qu'on appelle l'aneuploïdie mosaïque (Lachaud et al., 2014; Mannaert et al., 2012).

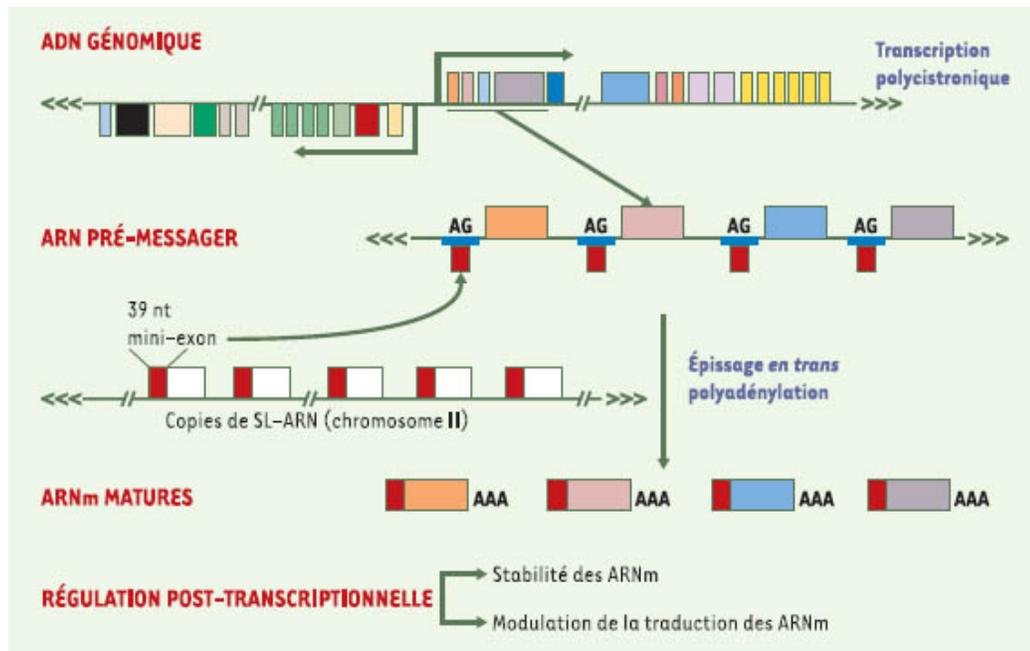
La majorité du matériel génétique est contenu dans le noyau du parasite sous forme d'ADN chromosomique ainsi que sous forme d'ADN épisomale. On retrouve aussi de 10 à 20 % de l'ADN total dans le kinétoplaste, un organite équivalent à la mitochondrie chez les trypanosomes, sous forme de mini-cercles et de maxi-cercles (Shapiro et Englund, 1995).

En 2005, le premier séquençage complet du parasite a été réalisé. Depuis, les séquences de 15 différentes espèces dont *Leishmania infantum* sont connues et disponibles sur le moteur de recherche TriTrypDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb>) (National Center for Biotechnology Information, 1988). Les gènes sont hautement conservés entre les différentes espèces et peu d'entre eux leur sont spécifiques (Peacock et al., 2007). Selon l'espèce, le génome comprend entre 8153 et 8298 gènes codant pour une protéine. À titre d'exemple, *L.infantum* en possède 8241 (Cruz et Freitas-Castro, 2019). La majorité de ces gènes codent pour des protéines dont la fonction n'est pas connue pour le moment (Peacock et al., 2007).

Cependant, une quantité importante de séquences répétitives non codantes variant entre 500 et 600 pb sont retrouvées un peu partout dans le génome de *Leishmania*. Celles-ci sont hautement conservées chez le parasite, sont spécifiques aux chromosomes. Par exemple, le génome de *L. infantum* en compte plus de 2 000 (Ubeda et al., 2014). Ces régions flanquent les gènes et jouent le rôle de plate-forme durant la transcription polycistronique.

### 2.2.1 Transcription polycistronique

Chez la plupart des cellules eucaryotes et procaryotes, le point de contrôle le plus important à l'initiation de la transcription est le promoteur d'un gène. Cependant, le protozoaire n'en possède aucun et il n'y a donc pas de contrôle individuel de l'initiation de la transcription chez *Leishmania*. Il tire plutôt profit de la transcription polycistronique bidirectionnelle. Entre une dizaine et une centaine de gènes sont organisés en une même unité polycistronique. Chacun des gènes est séparé par des séquences répétitives tandem 5'-CCCTAA-3' et les groupes de gènes ne codent pas nécessairement pour des protéines dont les fonctions seront reliées (Ellis et Crampton, 1988; Clayton, 2002). Des histones spécifiques indiquent à la polymérase II, responsable de la transcription, le début et la fin d'une unité polycistronique (Clayton, 2002). Une fois transcrit, le parasite ne procède pas comme la majorité des cellules eucaryotes par l'épissage *cis*, c'est-à-dire en enlevant les introns d'un ARN prémessager (pré-ARNm) enfin de former, à l'aide des exons uniquement, un ARN messager (ARNm). Effectivement, *Leishmania* ne possède pratiquement aucun intron avec la seule exception du gène codant pour la polymérase poly(A) (Mair et al., 2000; Martínez-Calvillo, et al., 2010). Le kinétoplaste va plutôt tirer profit de l'épissage *trans* en clivant l'ARN polycistronique en plusieurs ARNm matures qui codent chacun pour une seule protéine fonctionnelle. À l'extrémité 5', une coiffe, le chef d'épissage, de 39 nucléotides est alors ajouté. Une polyadénylation en 3' a aussi lieu pour augmenter la stabilité de l'ARNm (Clayton, 2002 ; Haile et Papadopoulou, 2007 ; Matthews et al. 1994).



**Figure 2.** Transcription polycistronique chez *Leishmania*.

L'ADN est formé d'unités polycistroniques qui sont clivées grâce à l'épissage *trans*. Le parasite ne possède pas de promoteur. Figure tirée de (Ouellet, M. 2003)

## 2.3 Variations du nombre de copies des gènes

Chez *Leishmania*, puisque le contrôle de l'initiation de la transcription est minimal voir absent, la régulation des niveaux d'expression des protéines se fait majoritairement par des modifications du dosage des gènes. Cette régulation inclut des variations dans le nombre de copies des gènes (VNCs) telles que la délétion des gènes, la formation d'amplicons linéaires et de matériel génétique extrachromosomal circulaire ainsi que la modification du nombre de chromosomes (Ubeda et al., 2014).

### 2.3.1 Polypléidie

Tout d'abord, le concept de l'évolution clonale prépondérante pourrait sembler contradictoire avec les variations importantes de ploïdie caractéristiques du parasite (voir section 2.1 Organisation du génome). En fait, l'incroyable hétérogénéité génomique observée chez *Leishmania* réside majoritairement dans les variations du nombre de copies de gènes et non dans la différence entre les gènes partagés entre

espèces. Par d'exemple, des chercheurs ont démontré que bien que chacun des 17 isolats de leur étude présentait un nombre de chromosomes variables, seulement 0,011% des nucléotides étaient différents témoignant des fluctuations principalement dans le dosage des gènes (Downing et al., 2011).

Généralement, chez l'humain, des variations du nombre de chromosomes sont associées à des anomalies sévères telles qu'observées lors de trisomie 13 ou 18 chez les foetus. Pour le protozoaire, elle est bien tolérée et semble même représenter un moyen efficace de survie face à un stress environnemental. En effet, des changements du nombre de chromosomes est un mécanisme de résistance déployé par le parasite pour survivre en présence d'une pression médicamenteuse (Laffitte et al., 2016).

Des variations dans le nombre de chromosomes ont été observées chez des souches de *L. donovani* provenant directement de patients atteints de leishmaniose viscérale en Inde et au Népal. Effectivement, 26 chromosomes, sur un total de 36, présentaient une polysomie (disomique, trisomique, tétrasomique, etc.) différente pour les 17 souches cliniques (Downing et al., 2011). Cependant, s'il y a déjà plusieurs copies de mêmes gènes sur un chromosome, les probabilités que celui-ci soit dupliqué sont plus faibles. Effectivement, répliquer un chromosome qui contient déjà de multiples copies de gènes représente un coût d'adaptation biologique (*fitness cost*) important (Roberts et al., 2011). C'est pourquoi le parasite peut aussi amplifier une région plus spécifique du génome.

### **2.3.2 Amplification et délétion de gènes spécifiques à un locus**

La majorité des gènes chez *Leishmania* sont retrouvés en plusieurs copies (Beverley, 1991). Le génome du parasite est constamment en réarrangement et l'amplification constitutive et stochastique de gènes se produit à partir des séquences homologues directes et inversées répétitives (voir section 2.1 Organisation du génome) à l'aide de la recombinaison homologue (Ubeda et al., 2014). La réparation homologue permet de réparer les cassures doubles brins à l'aide de séquences homologues intactes

ce qui permet d'éviter la réplication de l'ADN endommagé. Bien qu'elle soit importante au maintien de l'intégrité du génome parasitaire, elle permet aussi, et surtout, la formation d'amplicons linéaires ou circulaires ainsi que la délétion de gènes. C'est d'ailleurs une stratégie fréquemment employée chez *Leishmania* afin de résister à l'action d'un médicament (Laffitte et al., 2014). Cette capacité à amplifier des gènes est propre à chaque cellule d'une population clonale et permet donc d'obtenir une grande variété de parasites arborant différents amplicons (Ubeda et al., 2014).

## **2.5 Étude de la régulation génique**

Bien que les gènes chez *Leishmania* soient hautement conservés, le nombre de copies d'un même gène peut différer grandement d'une population parasitaire à une autre (Roberts et al., 2011). Les variations du nombre de copies de gènes, à l'échelle d'un chromosome complet ou d'une région plus spécifique du génome, peuvent être exacerbées lorsque *Leishmania* est exposé à des conditions environnementales adverses. Par exemple, le nombre de copies des gènes impliqués dans la résistance médicamenteuse peut être 2 à 20 fois plus important par rapport à la souche sensible (Kazemi, 2011). Avec la disponibilité grandissante des nouvelles technologies dont le séquençage à haut débit, l'étude du génome complet du protozoaire est maintenant beaucoup plus accessible.

### **2.5.1 Séquençage du génome complet**

Chez la majorité des cellules eucaryotes, l'étude de l'expression des gènes à partir de l'ADN est plutôt statique. Cependant, puisque les niveaux d'expression des protéines du parasite sont régulés en majorité par des modifications du dosage des gènes, le séquençage du génome complet est idéal pour analyser ces réarrangements en comparant le génome d'un parasite résistant à celui d'un sensible (Ubeda et al., 2008). Cette technique permet aussi de comparer et d'analyser d'autres variations génomiques qui n'impliquent pas des modifications du dosage des gènes tel que le polymorphisme d'un seul nucléotide.

### **2.5.1.1 Polymorphisme d'un seul nucléotide**

Le polymorphisme d'un seul nucléotide, mieux connu sous son acronyme anglais *SNP* (*single nucleotide polymorphism*), peut être non synonyme ou synonyme selon s'il engendre un changement dans la séquence de la protéine ou non respectivement. Les SNPs non synonymes peuvent être subdivisés en mutation non-sens qui engendre un codon arrêt prématuré, et sens, qui engendre une substitution d'acide aminé. L'impact de SNPs varie aussi en fonction de la région, codante ou non codante, dans laquelle la mutation survient.

Contrairement à la faible résolution qui peut être obtenue à l'aide des microsatellites, utilisés pour identifier les SNPs, le séquençage complet du génome permet de révéler avec une haute résolution la diversité génotypique cellulaire (Downing et al., 2012).

À l'aide du séquençage du génome complet, une étude a pu démontrer la variabilité intraspécifique importante chez *L. panamensis*. À partir de 22 isolats cliniques, plus de 60 000 SNPs ont pu être identifiés dont 2700 SNPs par génome en moyenne (min: 1831 et max: 3732). Les SNPs étaient majoritairement situés dans des régions qui codent pour des transporteurs, des protéines du cytosquelette et des protéines de surface. On sait aussi que plus la taille du chromosome est importante, plus on y retrouvera de SNPs (Patino et al., 2020). Ces résultats contrastent fortement avec ceux retrouvés chez des isolats cliniques de *L. infantum* et démontre aussi la variabilité interspécifique importante chez le parasite. Effectivement, les SNPs n'étaient pas distribués de façon homogène dans les chromosomes et la majorité d'entre eux survenaient dans des régions non codantes (intergénique, en amont et en aval d'un gène) (Carvalho et al., 2020).

Les SNPs sont une source majeure de variations génétiques qui peuvent contribuer à des différents phénotypes. Par exemple, ils peuvent être des marqueurs de la résistance aux antiparasitaires. Effectivement, les SNPs peuvent s'insérer dans des gènes clefs

comme un transporteur de médicament et causer une diminution de la sensibilité des parasites à celui-ci (Cojean et al., 2012).

## Chapitre III – Résistance aux antiparasitaires

### 3.1 Facteurs favorisant la résistance

Peu de traitements sont présentement approuvés pour contrer cette maladie: les dérivés de l'antimoine pentavalent (Sb(V)), l'amphotéricine B (AmB), la miltéfosine (MTF), la paromomycine (PMM) et la pentamidine (PTD). Actuellement, leur efficacité respective est grandement réduite en raison de l'émergence de la résistance du parasite. L'origine de ce phénomène est complexe et plusieurs facteurs y contribuent de façon variable.

Chez *Leishmania*, l'absence de contrôle de la transcription des gènes au niveau individuel est largement palliée par son impressionnante plasticité génomique. Effectivement, le protozoaire est capable de générer de multiples copies d'un même gène ce qui contribue à l'émergence rapide de la résistance. Ces réarrangements génomiques surviennent de façon stochastique et les parasites qui possèdent des loci amplifiés favorables à leur survie sont positivement sélectionnés (Ubeda et al., 2014). Ceci représente un avantage évolutif majeur qui permet à *Leishmania* de s'adapter rapidement à son environnement.

C'est pourquoi le parasite est capable de survivre dans un environnement riche en métaux lourds tel que l'arsenic (As(III)). Puisque l'As(III) et le Sb(V) sont des métalloïdes structurellement et chimiquement similaires, une exposition chronique à des faibles doses d'As(III) dans les eaux polluées permet aux parasites de devenir résistant au Sb(V) (Perry et al., 2013). Cette résistance se traduit cliniquement par un taux de mortalité à la LV proportionnelle à la contamination de l'eau par l'As(III) (Perry et al., 2015).

Bien que des facteurs externes au traitement peuvent favoriser l'apparition de la résistance, les caractéristiques pharmacologiques mêmes des médicaments utilisés contre la leishmaniose contribuent considérablement à la sélection de parasites résistants. Par exemple, en raison de leur faible absorption orale, l'administration des

dérivés de Sb(V), de l'AmB, la PEN, en cas de LV, doit se faire par voie parentérale (Lemke et al., 2005; Moore et Lockwood, 2010). Cette contrainte peut diminuer l'observance du traitement étant donné qu'une hospitalisation est requise et que la leishmaniose sévit dans des contextes socio-économiques précaires. De plus, la forte toxicité aux doses thérapeutiques qui caractérisent ces médicaments, à l'exception de la MTF, engendre parfois des effets adverses assez importants pour justifier l'arrêt temporaire du traitement (Ponte-Sucre et al., 2017; Moore et Lockwood, 2010). Également, l'utilisation des médicaments dont la qualité n'est pas contrôlée peut entraîner des dosages inadéquats (Chakravarty et Sundar, 2010). Tous ces facteurs peuvent favoriser, à un certain point durant la thérapie, une exposition des parasites à des doses médicamenteuses sublétales ce qui leur permet de s'adapter et devenir résistants.

### **3.2 Dérivés de l'antimoine**

Les dérivés de l'antimoine pentavalent (Sb(V)) soient le stibogluconate de sodium (SGS) et l'antimoniate de méglumine (AM) constituent les plus vieux traitements disponibles contre la leishmaniose. Leurs coûts sont relativement bas et ils sont aisément disponibles (Torres-Guerrero et al., 2017). Bien qu'encore peu compris et encore sujet à la controverse, le mécanisme de fonctionnement de ce traitement impliquerait une réduction du Sb(V) en antimoine trivalent (Sb(III)) dans les macrophages et/ou dans le parasite (Haldar et al., 2011). Le Sb(III) diminuerait les niveaux de trypanothione, un puissant antioxydant, en augmentant son efflux et en inhibant la trypanothione réductase ce qui mènerait à l'apoptose (Wyllie et al., 2004). La résistance au SGS est rencontrée fréquemment sur le terrain notamment dans l'état du Bihar en Inde, une région fortement touchée par la LV. Puisque le SGS constitue le traitement de première ligne tant en médecine humaine que médecine vétérinaire, les mécanismes de résistance ont été étudiés extensivement (Torres-Guerrero et al., 2017).

### 3.1.2 Mécanismes de résistance

Cliniquement, plusieurs mécanismes de résistance ont été rapportés et il semblerait qu'ils soient fréquemment associés entre eux (Rai et al., 2013). Comme premier moyen de défense contre le SGS, le parasite produit une plus grande quantité de protéines de choc thermique et de trypanothione (Brochu et al., 2004; Mukhopadhyay et al., 1996). Par la suite, il met en place des mécanismes de résistance plus spécifiques aux dérivés de Sb(V). Un des plus importants implique le gène *mrpA* codant pour des transporteurs de la famille *ATP-binding cassette* (ABC) (Légaré et al., 2001). Celui-ci permet la séquestration du Sb(III) à l'intérieur d'une vésicule intracellulaire localisée près du flagelle du parasite. Au niveau moléculaire, il a été démontré *in vitro* que ce gène est régulé à la hausse grâce à une augmentation du nombre de copies du chromosome 23 et par des amplifications extrachromosomales (Douanne et al., 2020; Moreira et al., 2013). De plus, une diminution de l'entrée du médicament à l'intérieur du parasite peut engendrer la résistance. Chez la souche sensible, le canal aquaglycéroporine 1 (AQP1) transporte le Sb(III) à l'intérieur du parasite, tandis que chez la souche résistante, une diminution de l'expression de ce canal peut être observée (Gourbal et al., 2004). Effectivement, une délétion d'environ 25 kb de la région subtélomérique du chromosome 31, qui contient le locus du canal AQP1, a déjà été identifiés chez des clones résistants au Sb(V) *in vitro*. Un SNP non synonyme, dans ce même gène, peut aussi à lui seul conférer la résistance (Monte-Neto et al., 2015). Étant donné la résistance significative du parasite dans certaines régions, plusieurs médicaments ont été approuvés comme traitement de deuxième ligne.

### 3.2 Miltéfosine (MTF)

La MTF, un antitumoral à l'origine, est présentement le traitement de choix pour les patients souffrant de LV en Inde où les cas de résistance sont régulièrement rapportés (Ponte-Sucre et al., 2017). Son administration se fait par voie orale ce qui présente un important avantage comparativement aux dérivés de Sb(V). Le mécanisme d'action de la MTF est encore peu compris, mais il semblerait que le médicament

interfère avec le métabolisme des lipides, la biosynthèse des phospholipides et d'autres composantes de la membrane cellulaire (Fernandez-Prada et al., 2016). Récemment, en Inde et au Népal, des cas d'échec au traitement liés à une résistance du parasite ont été rapportés (Ponte-Sucre et al., 2017; Srivastava et al., 2017).

### **3.2.1 Mécanismes de résistance**

Plusieurs mécanismes de résistance ont été décrits dans les dernières années. L'un des plus connus est le blocage de l'entrée de la MTF causée par une diminution des niveaux du transporteur à la MTF (MT), une ATPase de type P. *In vitro*, des mutations ponctuelles des allèles du gène *miltefosine transporter* (MT) ont inactivé le MT empêchant ainsi la MTF de s'accumuler à l'intérieur du parasite (Pérez-Victoria et al., 2003). La MTF requiert, en plus du MT, une autre protéine spécifique, la Ros3, pour passer à travers la membrane cellulaire. Une mutation d'un seul nucléotide dans le gène *ros3* ainsi que le nombre de copies du gène (dosage des gènes), engendre aussi la résistance chez le parasite (Pérez-Victoria et al., 2006 ; Espada et al., 2021). Il est aussi possible qu'un efflux du médicament se produise par l'augmentation de l'expression de certains transporteurs ABC (Ponte-Sucre et al., 2017). Également, il existerait une résistance croisée entre l'AmB et la MTF, puisqu'un SNP non synonyme dans le gène MT engendrerait des changements majeurs dans la composition lipidique de la membrane cellulaire. Une découverte inquiétante, puisqu'un des plans thérapeutiques proposés en cas de résistance au Sb(V) est une combinaison séquentielle de ces médicaments (Fernandez-Prada et al., 2016).

### **3.3 Amphotéricine B (AmB)**

L'AmB est un antibiotique polyène qui possède aussi des propriétés antifongiques et antiparasitaires (Lemke et al., 2005). L'AmB cible les ergostérols situés dans la membrane cellulaire du micro-organisme ce qui engendre la formation de pores. L'augmentation de la perméabilité de la cellule mène éventuellement à la mort cellulaire (Ponte-Sucre et al., 2017). L'AmB a été proposée comme traitement alternatif

de la LV en raison de l'émergence de la résistance au Sb(V) dans plusieurs pays, mais des cas de résistances cliniques sont maintenant décrits (CDC, 2020). Ces cas demeurent toutefois inhabituels pour le moment (Purkait et al., 2012; Srivastava et al., 2011).

### 3.3.1 Mécanismes de résistance

Déjà observé chez les souches de *Candida albicans* résistantes, le mécanisme de résistance de *Leishmania* réside majoritairement dans un changement de la fluidité membranaire. L'expression des ergostérols, la cible primaire de l'AmB, est diminuée et ils sont remplacés par leurs précurseurs, c'est-à-dire le cholesta-5,7,24-trien-3 $\beta$ -ol (Purkait et al., 2012). L'affinité de l'AmB pour le parasite est donc altérée ce qui réduit l'effet thérapeutique (Lemke et al., 2005; Ponte-Sucre et al., 2017). Expérimentalement, un SNP non synonyme dans le gène de l'enzyme C5-réductase, nécessaire à la biosynthèse du stérol, a été identifié chez des parasites résistants (Pountain et al., 2019). Aussi, à partir d'isolats cliniques résistants, des niveaux d'expression du gène MDR1 significativement plus élevés ont été détectés. Le gène MDR1 encode un transporteur de la famille ABC, comme le gène *mrpA* responsable, en partie, de la résistance au Sb(V). Ces transporteurs permettent l'efflux des médicaments hors du parasite (Purkait et al., 2012).

### 3.4 Paromomycine (PMM)

La PMM est un antibiotique de la classe des aminoglycosides à large spectre aux propriétés antiparasitaires (Davidson et al., 2009). Ce médicament est actuellement le traitement le moins cher de tous les traitements disponibles et peut se révéler aussi efficace que l'AmB contre la LV (Moore et Lockwood, 2010). Le traitement est aussi l'unique disponible en crème pour appliquer localement au site affecté par la LC (CDC, 2020). Chez *Leishmania*, le mécanisme de fonctionnement n'est pas aussi bien compris et peu de littérature est disponible à ce sujet. Toutefois, un mécanisme d'action proposé impliquerait l'altération de la membrane mitochondriale des parasites compromettant leur respiration cellulaire (Davidson et al., 2009). Étant donné sa moindre utilisation

clinique, seulement deux rapports de cas de rechutes sont mentionnés dans la littérature et font suite à un traitement prolongé pour traiter la LC (Croft et al., 2006; Ponte-Sucre et al., 2017).

### **3.4.1 Mécanismes de résistance**

Chez la bactérie, des résistances cliniques ont déjà été rapportées. Cependant, à ce jour, la résistance chez le parasite n'a été que caractérisée à partir d'isolats expérimentaux (Ponte-Sucre et al., 2017). La PMM n'arrive plus à s'accumuler aussi efficacement dans les parasites résistants *in vitro* (Jhingran et al., 2009). Ceci pourrait s'expliquer par un efflux du médicament grâce à l'augmentation de l'expression des gènes des transporteurs MDR1 et MRPA (Bhandari et al., 2014). Un mécanisme d'action déjà décrit chez des souches résistantes aux autres médicaments anti-leishmaniaux.

### **3.5 Pentamidine (PTD)**

La PTD, une diamidine aromatique, est utilisée comme traitement en cas de résistance aux dérivés de Sb(V) (CDC, 2020). Son mécanisme d'action est encore mal compris. Cependant, il semblerait que ce médicament cible les topoisomérases II d'ADN, des enzymes dont le rôle est de relâcher l'ADN pour permettre la réplication et la transcription (Cortazar et al., 2007). Il est aussi possible que la PTD modifie le potentiel de la membrane mitochondriale engendrant ultimement l'apoptose du parasite (Mukherjee et al., 2006). Ce médicament n'est que rarement choisi pour traiter la LV étant donné son efficacité insatisfaisante dans la majorité des cas avec un taux d'échec au traitement allant jusqu'à 33% en Inde (Mukherjee et al., 2006; Sundar, 2001). Malgré ce fait, aucune résistance clinique n'a encore été caractérisée.

#### **3.5.1 Mécanisme de résistance**

*In vitro*, la surexpression du transporteur *pentamidine resistance protein 1* (PRP1) contribue à la résistance chez *L. major* et *L. amazonensis* (Coelho et al., 2003). Il est possible que PRP1 transporte la PTD directement hors du parasite ou qu'il séquestre celle-ci à l'intérieur de vésicules intracellulaires (Coelho et al., 2006). C'est d'ailleurs de

cette dernière façon que le transporteur MRPA, appartenant à la sous-famille ABCC tout comme PRP1, confère la résistance aux SGS. Le fort taux d'échec au traitement observé avec ce médicament pourrait s'expliquer par la résistance à la PEN induite par l'administration ultérieure de SGS. Aussi, de la même façon qu'avec l'AQP-1 et les dérivés de Sb(V), une diminution de l'expression du pore aquaglyceroporine-2 engendre une résistance à la PTD chez les trypanosomes (Baker et al., 2012).

### **3.2 Stratégies contre la résistance aux antiparasitaires**

La vaccination constituerait le meilleur moyen afin de contrôler la maladie et de prévenir l'apparition de la résistance aux antiparasitaires (Kedzierski, 2010). Pourtant, à ce jour, aucun vaccin humain n'est disponible et les vaccins canins (CaniLesh®, LetiFend®, Leish-Tec®) n'offrent pas une protection adéquate et complète (European Medicines Agency, 2020). L'euthanasie des chiens séropositifs représente une option efficace de contrôle de la maladie tant chez les chiens que chez les humains, mais son acceptation générale demeure un obstacle majeur à son application (Sevá et al., 2016). Une autre option économique qui pourrait permettre de diminuer significativement la prévalence de la maladie est l'utilisation de collier pour les chiens imprégnés d'insecticides (Sevá et al., 2016). Il est aussi possible d'épandre du dichlorodiphényltrichloroéthane, mieux connu sous son acronyme DDT, de l'environnement afin de tuer le phlébotome, le vecteur de la maladie (Thakur, 2007). Néanmoins, la résistance de la mouche des sables à cet insecticide avait déjà été mise en évidence en 1990 (Mukhopadhyay, 1990). Ces options restent encore à optimiser pour le combat de la maladie, mais demeurent inutiles dans son traitement et lors d'échec thérapeutique en raison de la résistance.

#### **3.2.1 Combinaison de traitements**

Étant donné le peu d'options disponibles pour traiter la leishmaniose, la combinaison de traitements déjà disponibles semble être une stratégie avantageuse afin de pallier au problème de résistance aux antiparasitaires. Ce type de plan de traitement

a d'ailleurs déjà été proposé pour tenter d'enrayer la tuberculose, le VIH et le paludisme (Sundar et al., 2008). Dans les années 1990, en Inde, au Soudan et au Kenya, la PMM en combinaison avec le SGS a été proposé et s'est avéré efficace en cas d'échec au traitement unique au SGS. De plus, chez certains patients, la durée du traitement était plus courte ce qui offre plusieurs avantages : une diminution de la toxicité, une meilleure compliance de la part du patient, une réduction des coûts associés à la médication et une potentielle diminution du risque d'émergence de la résistance (Sundar et al., 2008). D'autres combinaisons sont aussi possibles comme la MTF à la PMM ou à l'AmB (Bryceson, 2001).

Plusieurs raisons peuvent justifier ce choix. Premièrement, les probabilités qu'un parasite survive à deux drogues ayant des mécanismes d'action différents sont plus faibles, puisqu'il est moins probable que celui-ci possède un mécanisme de résistance commun aux deux agents thérapeutiques. Deuxièmement, la combinaison séquentielle de deux agents thérapeutiques permet d'obtenir un profil pharmacocinétique favorable à la guérison. Le premier traitement plus agressif permet de réduire la charge initiale de parasites en circulation et le deuxième traitement, ayant un temps de demi-vie plus long, permet d'éliminer les parasites restants (Bryceson, 2001). Par exemple, l'AmB, hautement efficace contre la LV, est administrée en une seule dose, puis, pour une période de 7 à 14 jours, le patient reçoit un traitement à la MTF qui perdura pendant plusieurs semaines dans le corps (Sundar et al., 2008). La PMM ainsi que la MTF peuvent aussi être combinées, puisque la PMM est moins toxique et est généralement mieux tolérée par le patient. En procédant de la sorte, la durée de la prise de MTF sera réduite. Troisièmement, la combinaison de deux traitements peut être souhaitable si les deux agents utilisés produisent des effets anti-leishmaniaux synergiques (Bryceson, 2001).

Cependant, le fait d'administrer deux traitements en même temps ou de façon séquentielle n'élimine pas le risque de résistance des parasites. Bien que théoriquement plus à l'abri de ce phénomène, plusieurs raisons expliquent qu'avec cette stratégie, des

risques considérables d'émergence de la résistance subsistent. Lors d'une monothérapie, des parasites résistants peuvent être sélectionnés. Alors, lors de la combinaison de ce médicament à un autre agent thérapeutique, les parasites survivront au premier médicament et c'est le deuxième traitement seul qui devra enrayer l'infection parasitaire. Cependant, parce que la combinaison est assumée efficace, les médicaments sont administrés à plus faible dose et pour une période de temps moins importante. Ce sont d'ailleurs des avantages importants de cette stratégie. Néanmoins, les parasites qui ont survécu à la première phase de traitement seront donc exposés à des doses sublétales du deuxième médicament augmentant ainsi le risque de développer de la résistance à ce deuxième agent. En conséquence, dans cette situation, la sélection de la résistance au deuxième agent thérapeutique devient plus probable (Ponte-Sucre et al., 2017). De plus, la résistance croisée a déjà été rapportée avec certains des agents thérapeutiques présentement utilisés notamment entre la MTF et l'AmB (Fernandez-Prada et al., 2016). Finalement, la recommandation de cette stratégie se base principalement sur la sélection de deux ou plusieurs molécules qui ne possèdent pas le même mécanisme d'action (Ponte-Sucre et al., 2017). Pourtant, la plupart des mécanismes de fonctionnement des principaux traitements utilisés ne sont pas encore bien caractérisés présentement : un aspect important à prendre en considération dans les programmes de lutte contre la leishmaniose.

Face aux options de traitements restreintes, le développement de nouvelles molécules et leurs mises en marché sont urgents. Le repositionnement des médicaments, qui consisterait à traiter la leishmaniose à l'aide d'un médicament déjà approuvé pour une tout autre maladie, semble tout indiqué.

### **3.3.2 Repositionnement de médicaments**

Depuis les dernières années, le repositionnement des médicaments est à la hausse totalisant 30% des nouvelles drogues approuvées par la *Food and Drug Administration* (FDA). La recherche à son sujet est soutenue avec environ 30 articles par

mois publiés à ce sujet dans les journaux scientifiques (Andrade-Neto et al., 2018; Nosengo, 2016). Plusieurs avantages rendent cette stratégie plus profitable que le développement complet d'un nouveau médicament. Elle permet de diminuer le délai associé à la recherche et au développement d'un médicament, puisque celui-ci a déjà subi les essais précliniques chez les animaux, la sécurité du produit a auparavant été validée et, parfois, le développement de la formulation aura même déjà été réalisé (Pushpakom et al., 2019). En moyenne, il en prendrait 6,5 ans soit environ la moitié du temps qu'il faut pour développer un nouveau médicament (Nosengo, 2016). Pour les mêmes raisons, cette méthode permet souvent de réduire l'investissement financier (Pushpakom et al., 2019). Le coût de développement d'un nouveau médicament se situerait entre 2 et 3 milliards de dollars US, tandis que l'utilisation d'un ancien médicament pour une nouvelle homologation en coûterait environ 300 millions de dollars US (Nosengo, 2016). En d'autres mots, le repositionnement des médicaments offre une prise de risque faible pour un rendement potentiel élevé (Andrade-Neto et al., 2018).

La recherche du repositionnement des médicaments se base sur deux différentes approches. La première est d'utiliser un traitement qui agit sur une cible déjà décrite pour l'application originale. Par exemple, la fluoroquinolone, un antibiotique de la classe des céphalosporines, cible tant chez les bactéries que chez les protozoaires, les topoisomérases (Romero et al., 2005). La deuxième approche tente de trouver une nouvelle utilisation à un médicament grâce à une cible qui n'avait jusque-là pas encore été décrite lors de son usage précédent. La recherche se fait donc à partir de l'observation d'un phénotype chez le parasite. Par exemple, lorsque mis en contact avec l'imipramine, un antidépresseur qui sert présentement de traitement contre la dépression, les troubles obsessionnels compulsifs et les troubles anxieux, les promastigotes *L. amazonensis* et *L. donovani* meurent. Cependant, le mécanisme d'action ne semble pas être le même pour les deux conditions. À titre d'antidépresseur, l'imipramine inhibe la recapture de certains neurotransmetteurs notamment la sérotonine

(<https://www.drugbank.ca>). Son activité antileishmaniale est multifactorielle et implique autre entre l'altération de la biosynthèse des stéroïdes et l'inhibition de la trypanothione réductase (Andrade-Neto et al., 2018).

Des antifongiques, des antiparasitaires, des antihypertenseurs, des antibiotiques et plusieurs autres ont déjà démontré des activités antileishmaniennes *in vitro*, mais la classe de médicaments qui semble la plus prometteuse à ce jour est celle des antitumoraux. En effet, en phase préclinique, un grand nombre de médicaments de cette classe ont démontré des activités *in vitro* contre le parasite. L'hydroxyurea utilisé pour traiter les mélanomes et les leucémies myéloïdes et le cisplatine utilisé pour combattre les cancers du système reproducteur en sont des exemples (Andrade-Neto et al., 2018). Également, la camptothécine (CPT) et ses dérivés agissent en inhibant l'activité des ADN topoisomérases (TOPs) du parasite, des enzymes qui sont nécessaires à la réplication du matériel génétique (Bodley et Shapiro, 1995). Le Topotecan (TPT), un dérivé semi-synthétique de la CPT, possède une forte activité antileishmaniale *in vitro* et *ex vivo* contre les promastigotes et les amastigotes respectivement (Prada et al., 2013).

## Chapitre IV – ADN topoisomérases et leurs poisons

### 4.1 Agents antitumoraux

Originellement, lorsque la camptothécine (CPT) a été découverte, elle démontrait alors une activité *in vitro* remarquable contre les tumeurs. Expérimentalement, son activité antileishmaniale a aussi été démontrée (Bodley et Shapiro, 1995). Toutefois, la CPT est un alcaloïde hautement cytotoxique aux doses thérapeutiques et est faiblement soluble en milieu aqueux ce qui représente des caractéristiques peu désirables à l'administration de ce médicament (Froelich-Ammon et Osheroff, 1995). Ce n'est que plusieurs années plus tard que des dérivés semi-synthétiques dont le Topotecan (TPT), beaucoup plus sécuritaires, ont fait leur entrée sur le marché.

#### 4.1.1 Topotecan: dérivé semi-synthétique de la camptothécine

Le TPT, un médicament actuellement utilisé comme traitement de deuxième ligne contre les cancers, est beaucoup moins toxique que la CPT en raison de sa plus grande stabilité physicochimique une fois en circulation dans le corps (Hartmann et Lipp, 2006). Effectivement, les effets secondaires du TPT sont variables, mais ne menacent généralement pas la vie du patient. Ils sont les plus communément associés à des signes cliniques gastro-intestinaux (Chemocare, 2020). Ceci représente un avantage majeur en comparaison aux médicaments présentement approuvés dans le combat contre la LV. Aussi, et surtout, le TPT est le seul des dérivés de la CPT à pouvoir être administré par la voie orale, bien qu'il peut aussi être donné par voie intraveineuse (Hartmann et Lipp, 2006). Une caractéristique qui pourrait favoriser significativement l'observance du traitement et ainsi, diminuer les risques d'émergence de la résistance du parasite. Pour ces considérations ainsi qu'en raison de son importante activité leishmaniacide *in vitro* et *ex vivo* (EC<sub>50</sub> de l'ordre du nanomolaire), le TPT pourrait aider à combattre la leishmaniose (Prada et al., 2013).

Médicament	Nom commercial	Indication médicamenteuse
Topotecan	Act Topotecan, Hycamtin	Cancer du col de l'utérus
		Glioblastome
		Cancer des ovaires
		Cancer des poumons

**Tableau 2.** Homologation du TPT en Amérique du Nord aux usages humain et vétérinaire.

Bien que souvent identifié comme un inhibiteur des topoisomérases (TOPs), des enzymes qui se lient à l'ADN et essentielles à la survie cellulaire, le TPT est un poison enzymatique. Effectivement, les inhibiteurs ciblent directement les enzymes et empêchent leurs activités catalytiques, tandis que les poisons stabilisent le complexe qui se forme entre l'ADN et la TOP. En présence du TPT, les TOPs agissent comme des toxines physiologiques (Froelich-Ammon et Osheroff, 1995).

## 4.2 Topoisomérase: la cible du Topotecan

Plusieurs agents thérapeutiques ont pour cible les TOPs, puisqu'elles sont des enzymes essentielles à la fonction cellulaire. Une fois complètement étiré, l'ADN contenu dans une seule cellule eucaryote peut être aussi long que 2 mètres (Alberts et al., 2002). Pour cette raison, la double hélice d'ADN doit donc être extrêmement condensée afin d'être contenue dans le noyau de la cellule. Lors de la réplication et de la transcription, le matériel génétique est enroulé à un tel point que les enzymes et les cofacteurs ne peuvent y avoir accès directement. Pour remédier à cette situation, l'ADN est séparé par l'hélicase et la polymérase peut alors synthétiser le brin complémentaire. Naturellement, ce processus va engendrer des superenroulements en amont et en aval du site de réplication ou de transcription et éventuellement, des nœuds dans le matériel génétique. Rapidement, la structure de l'ADN, encore plus dense de part et d'autre du site, est altérée et empêche éventuellement toute activité génomique. Par exemple, l'ARN polymérase, lors de la transcription, va engendrer en moyenne 7

superenroulements à la seconde. La TOP est une enzyme qui modifie la topologie de l'ADN en relâchant ces superenroulements et en défaisant ces nœuds notamment. Cette enzyme possède une valeur biologique fondamentale tel que démontré par son omniprésence chez la quasi-totalité des organismes vivants: des mammifères aux archées et même chez certains virus (Cinelli, 2018). Il existe deux grandes classes de TOPs (type I et type II). Elles varient selon leur capacité à résoudre différents problèmes topologiques en clivant un ou deux brins d'ADN.

#### **4.2.1 Topoisomérases de type I**

Les TOPs peuvent modifier la topologie du matériel génétique en coupant l'ADN et en s'y liant de façon réversible (Lodish et al., 2000). Les TOPs de type I ne clivent qu'un seul brin de la double hélice d'ADN. Elles ne peuvent donc résoudre qu'un seul type de problème topologique soit les superenroulements, alors que les TOPs de type II peuvent résoudre non seulement les superenroulements, mais également les nœuds et les caténations en clivant deux brins (Redinbo et al., 1999). Les TOPs de type I peuvent être sub-divisées en fonction, entre autres, de leurs mécanismes de réaction.

Les TOPs IA vont rendre le relâchement de l'ADN possible en permettant au brin intact de passer « à travers » l'espace créé par la coupure du brin clivé. Une fois le passage effectué, l'enzyme va réparer le brin qui avait été coupé préalablement. Les TOPs IB, tout comme les TOPs IC, tirent profit de la rotation du brin d'ADN clivé afin de résoudre des problèmes topologiques (Sissi et Palumbo, 2009). En effet, la TOP IB réussit à relâcher l'ADN en réalisant 5 étapes principales: (1) la formation d'un complexe non covalent entre l'enzyme et l'ADN, (2) le clivage de l'ADN et formation d'un complexe covalent entre l'ADN et l'enzyme, (3) la rotation du brin d'ADN libre (4) la religation de l'ADN et (5) l'expulsion de l'enzyme (Soren et al., 2019).

Type	Sous-famille	Nom	Organisme (s)	ATP	Mg <sup>2+</sup>	Lien avec la tyrosine
I	<u>IA</u>	Topo IA	Eubactéries, archées, plantes		x	5'
		<u>Topo III</u>	Eubactéries, archées, eucaryotes		x	5'
		Gyrase inverse	Eubactérie, archées	x	x	5'
	<u>IB</u>	<u>Topo IB</u>	Eucaryotes, virus, plantes			3'
	IC	Topo V	Archées			3'
II	<u>IIA</u>	<u>Topo II</u>	Eucaryotes	x	x	5'
		Gyrase	Eubactéries, archées, plantes	x	x	5'
		Topo IV	Eubactéries	x	x	5'
	IIB	Topo VI	Archées, plantes	x	x	5'

**Tableau 3.** Sous-familles des topoisomérases et leurs conditions d'action.

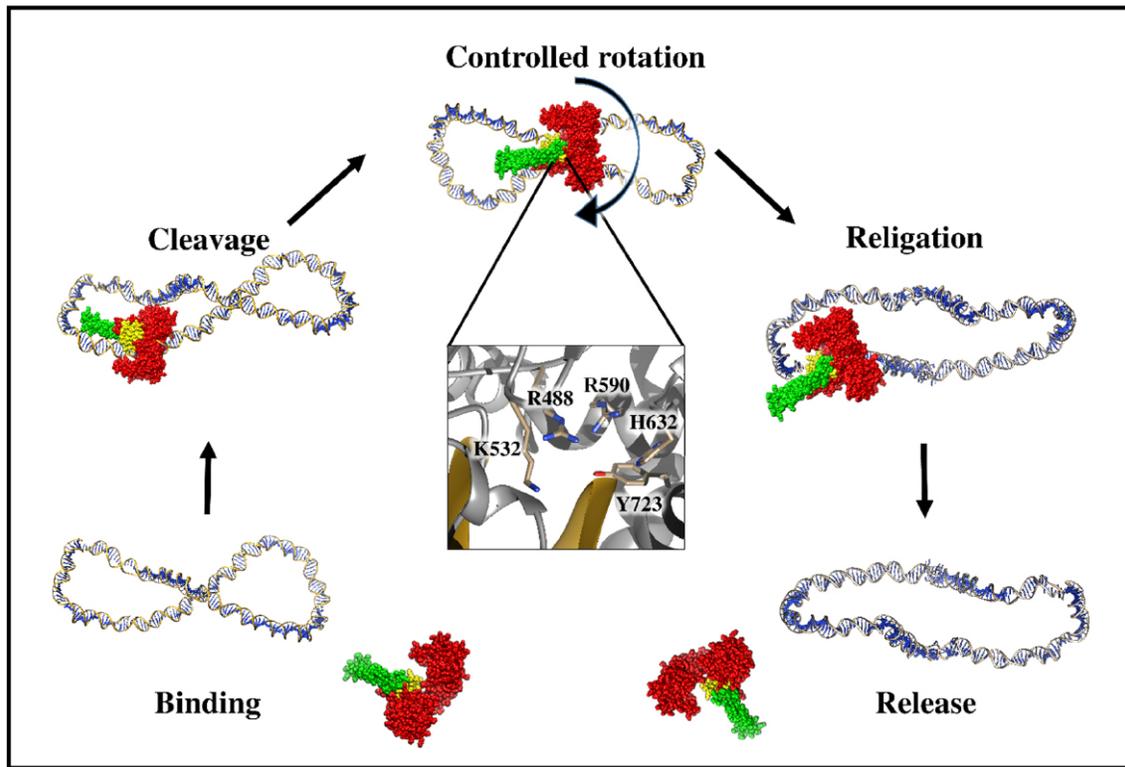
Les conditions d'action des différentes TOPs varient d'une sous-famille à l'autre. Les TOPs surlignées sont celles retrouvées chez *Leishmania*. Tableau adapté de (Sissi et Palumbo, 2009).

#### 4.2.2.1 Mécanisme d'action de la topoisomérase IB au niveau moléculaire

L'attaque nucléophile de l'ADN par le résidu tyrosine hautement réactif du domaine C-terminal de l'enzyme engendre une réaction de transestérification qui permet au groupement hydroxyle (-OH) de la tyrosine de lier de façon covalente le phosphate du groupement phosphodiester de l'extrémité 3' de l'ADN. Cette réaction donne lieu à deux produits: un complexe intermédiaire entre ADN-(groupement 3'-phosphotyrosyl)-enzyme d'une part et un groupement 5'-hydroxyle d'autre part (Krogh et Shuman, 2000; Karimi Goftar et al., 2014). Certaines TOPs, pour être fonctionnelles, nécessitent la participation du cofacteur Mg<sup>2+</sup>, comme stabilisateur électrostatique, durant cette réaction, mais pas la TOP IB (Sissi et Palumbo, 2009). Le clivage du brin

d'ADN par l'attaque nucléophile ne requiert pas d'ATP, car le mécanisme tire avantage de l'énergie emmagasinée dans l'enroulement des brins d'ADN (Sissi et Palumbo, 2009).

Simultanément au clivage, une liaison non covalente entre l'enzyme et le groupement 5'-hydroxyle du brin d'ADN clivé est aussi formé afin de ralentir la vitesse de rotation et ainsi éviter des dommages au matériel génétique (Lodish et al., 2000). En ne coupant qu'un seul brin d'ADN, la TOP de type I permet la rotation du brin 5' libre autour de son propre axe (Staker et al., 2002; Stewart et al., 1998). Une fois la transcription ou la réplication terminée, la religation de l'ADN se fait à l'aide d'une seconde attaque nucléophile. Effectivement, l'extrémité 5'-hydroxyle de l'ADN reforme un lien phosphodiester avec l'extrémité 3' de l'ADN en expulsant le résidu de tyrosine de l'enzyme (Arnò et al., 2013). Le taux de religation est plus rapide que le taux de clivage (Staker et al., 2002).



**Figure 3.** Mécanisme d'action de la topoisomérase IB humaine.

Cinq étapes sont importantes afin de permettre à la topoisomérase IB humaine de relâcher l'ADN: (1) la liaison de l'enzyme à l'ADN, (2) le clivage de l'ADN, (3) la rotation contrôlée du brin d'ADN clivé (4) la religation de l'ADN et (5) l'expulsion de l'enzyme. Le domaine principal est en rouge. Le domaine liant est en vert et le domaine C-terminal, en jaune. Figure tirée de Soren et al., 2020.

#### 4.2.2.2 Topoisomérase IB humaine

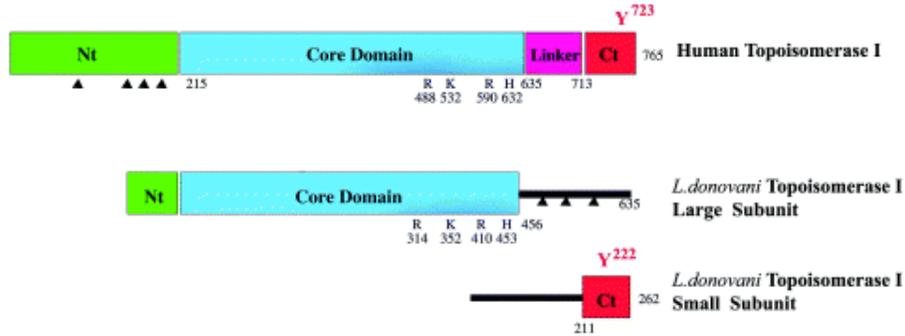
Chez l'humain, il existe deux paralogues de la TOP IB: nucléaire (TOP IB nc) et mitochondriale (TOP IB mt). La TOP IB nc humaine est un monomère de 765 acides aminés (aa) qui peut être subdivisé en 4 domaines (Cretaio et al., 2007): le domaine N-terminal (Met-1 à Gly-214) est responsable des interactions avec les autres protéines (Cretaio et al., 2007); le domaine principal (Ile-215 à Ala-365) contient le site catalytique qui sert à « attraper » et « verrouiller » la double hélice d'ADN (Cretaio et al., 2007); vient ensuite le domaine de liaison (Pro-366 à Lys-712) (Cretaio et al., 2007). C'est grâce

à ce dernier qu'il y a contrôle et ralentissement de la rotation de la chaîne d'ADN grâce aux interactions entre l'ADN chargé négativement et la charge positive du domaine (Stewart et al., 1998, Arnò et al., 2013). Ce domaine est très peu conservé entre la TOP IB des différentes cellules eucaryotes (Fiorani et al., 2009). Finalement, il y a le domaine C-terminal (Gly-713 à Phe-765) qui contient le résidu Tyr-723 qui effectue le clivage du brin d'ADN (Cretaio et al., 2007).

#### **4.2.2.3 Topoisomérase IB leishmaniale**

L'homologie structurelle et fonctionnelle de certains domaines est hautement conservée entre l'enzyme humaine et celle du parasite. Effectivement, tout comme chez la TOP IB humaine, le domaine C-terminal comprend un résidu crucial au clivage de l'ADN (Tyr-722 chez l'humain/Tyr-222 chez le parasite). De plus, le site catalytique (Arg-488, Lys-532, Arg-590, His-632 chez l'humain/Arg-314, Lys-352, Arg-410 et His-453 chez le parasite) est conservé au niveau du domaine principal des deux enzymes (Díaz González et al., 2007). Malgré la forte homologie pour ces domaines, la TOP IB leishmaniale et humaine présentent des différences importantes. Effectivement, les membres de la famille des kinétoplastides, soit les trypanosomes et *Leishmania*, possèdent une version hétérodimère de la TOP IB. Celle-ci est encodée par deux gènes situés sur deux chromosomes différents (Vlachakis, D. et al., 2013). Chez *Leishmania*, le gène de la petite sous-unité (psu TOP IB) est localisé sur le chromosome 4 et code pour une protéine de 262 acides aminés, tandis que le gène de la grande sous-unité (gsu TOP IB) est localisé sur le chromosome 34 et code pour une protéine de 635 acides aminés (TriTrypDB, 2019; Velasquez., A. et al., 2017). Si l'une ou l'autre des sous-unités est manquante ou si les deux sous-unités ne sont pas liées, l'enzyme ne peut pas être active. De plus, il a été démontré que si l'expression d'une des sous-unités est diminuée, une baisse sera aussi notée pour l'autre sous-unité ce qui démontre une co-dépendance mutuelle pour exercer leur activité (Bakshi et Shapiro, 2004). Contrairement au domaine principal, le domaine liant n'est que peu conservé pour les TOPs IB eucaryotes. Bien qu'aucune région de l'enzyme du parasite n'ait été identifiée avec certitude comme

domaine liant, il a été proposé que les acides aminés (aa) 175 et 182 situés sur la ps font minimalement partie du domaine liant (Díaz González et al., 2007).



**Figure 4.** La TOP IB humaine et la TOP IB de *L. donovani*.

La TOP IB humaine est un monomère, tandis que chez *Leishmania*, elle est retrouvée sous forme d'hétérodimère (grande et petite sous-unités). Le domaine N-terminal est en vert. Le domaine principal, dont les acides aminés de la tétrade catalytique sont identifiés, est en bleu. Le domaine liant est en mauve et aucun domaine liant n'a encore été identifié avec certitude chez le parasite. Finalement, le domaine C-terminal est en rouge et contient le résidu tyrosine responsable de l'attaque nucléophile. Figure tirée et adaptée de Das et al., 2006.

### 4.3 Mécanisme d'action du Topotecan

Le TPT cible les TOPs IB que l'on retrouve dans les cellules eucaryotes à l'exception des levures. Grâce à sa structure polycyclique, le médicament mime une paire de bases et se lie au site de clivage de la TOP IB en s'intercalant entre deux paires de bases (Staker et al., 2002). Le TPT ne se lie pas à l'ADN en l'absence de TOP IB et vice-versa. Effectivement, la réaction de transestérification est nécessaire afin de rendre accessible le site de liaison du TPT (Hertzberg et al., 1989). Le TPT prévient la religation des brins d'ADN en stabilisant de façon réversible le complexe formé entre l'ADN et la TOP IB favorisant ainsi le clivage à la religation. La fourche de réplication entre alors en collision avec le complexe tertiaire ADN-TOP IB-TPT formé en aval ce qui engendre des dommages à l'ADN. Éventuellement, puisque le taux de clivage/reliation est augmenté, les mécanismes de réparation de la cellule sont dépassés et la dégradation du matériel génétique mène à l'apoptose (Staker et al., 2002).

### 4.4 Résistance tumorale

Le phénomène de résistance est décrit dans les populations de cellules tumorales incluant celles traitées avec les dérivés de la CPT comme avec le TPT (Klejewski et al., 2017). Par

exemple, le risque de rechute est très élevé chez les patients traités contre le carcinome ovarien dû en grande partie à la résistance au TPT (Pokhriyal et al., 2019). Il existe plusieurs mécanismes de résistance décrits jusqu'à présent pour tenter d'expliquer les rechutes lors de traitement à l'aide de la CPT et ses dérivés.

Tout d'abord, les cellules tumorales ne possèdent pas les pompes glycoprotéines-P qui servent normalement de protection en pompant les xénobiotiques hors de la cellule. Cependant, les cellules tumorales peuvent acquérir le gène *multiple-drug-resistance-1* (MDR-1) qui code pour une glycoprotéine-P et peuvent alors devenir résistant en pompant le TPT dans le milieu extracellulaire. Ce mécanisme de résistance est fréquemment observé dans les populations de cellules cancéreuses (Parchment et Pessina, 1998).

De plus, des mutations ponctuelles engendrant des substitutions d'acides aminés de l'enzyme peuvent entraîner une modification structurale de celle-ci. Ces modifications peuvent diminuer l'activité enzymatique ce qui restreint les opportunités du TPT de se lier au complexe TOP IB-ADN. Expérimentalement, il a été démontré qu'une substitution d'une alanine pour une proline en position 653, du domaine liant, était à elle seule suffisante pour engendrer la résistance à la CPT chez l'humain. En effet, bien que la TOP IB conserve son activité *in vitro*, la cinétique de sa religation est plus rapide et cette rapidité empêche probablement la CPT de se lier à l'ADN (Fiorani et al., 2003). Avec ces substitutions, il est aussi possible que le site de liaison du TPT soit directement déstabilisé diminuant ainsi l'efficacité de liaison du TPT (Staker et al., 2002). Des mécanismes de résistance semblables (par substitutions d'acides aminés) ont d'ailleurs déjà été décrits dans la TOP IA des souches de *Leishmania* résistants à la CPT (Marquis et al., 2005).

## Section 2: Description du projet de maîtrise

### 1. Problématique

La leishmaniose touche principalement les communautés les plus démunies du globe et il est difficile d'en faire une préoccupation importante auprès du reste de la population. Cette maladie n'en constitue pas pour le moins un réel danger. Il existe trois principales formes cliniques soit la leishmaniose cutanée, la leishmaniose muco-cutanée et la leishmaniose viscérale. La presque totalité des gens atteinte de cette dernière forme, mourra quelques mois suite aux premiers signes cliniques. De plus, *Leishmania*, le protozoaire à l'origine de cette maladie, est capable de s'adapter efficacement à la pression médicamenteuse. Par conséquent, l'effet thérapeutique des traitements peut varier de façon significative. L'émergence de la résistance aux antiparasitaires est rapide chez *Leishmania* étant donné son importante plasticité génomique. En effet, des mutations ponctuelles peuvent rapidement se produire ou le nombre de copies d'un gène peut être augmenté en fonction des pressions sélectives du milieu. La résistance aux antiparasitaires constitue le plus grand obstacle à l'éradication de cette maladie qui cause, chaque année, entre 20 000 et 30 000 décès (OSP/OMS, 2017).

Actuellement, le médicament de première ligne tant en médecine humaine que médecine vétérinaire est l'antimoine pentavalent. Puisque la résistance parasitaire à celui-ci est de plus en plus fréquente et qu'il n'existe pas de vaccin contre la leishmaniose, il est urgent de proposer des nouvelles alternatives médicamenteuses. Pour répondre à la demande, le repositionnement des médicaments est tout indiqué. Cette stratégie consisterait à traiter la leishmaniose à l'aide d'un médicament déjà utilisé pour une autre maladie. Ainsi, il serait possible d'obtenir rapidement un nouveau traitement efficace abordable. Le Topotecan (TPT), déjà utilisé contre plusieurs types de cancers, constitue une option de choix, puisqu'il cible les topoisomérases, des enzymes essentielles au fonctionnement cellulaire du parasite. Même si l'activité antileishmaniale du TPT a déjà été prouvée, étant donné la forte propension au parasite à devenir résistant et la résistance clinique tumorale déjà rapportée, il est primordial

d'étudier les effets de ce médicament sur le parasite pour comprendre et prévenir la résistance (Pommier, 2013; Pokhriyal et al., 2019; Prada et al., 2013).

## 2. Hypothèse de recherche

Bien qu'utilisé depuis plusieurs décennies, les mécanismes de résistance à l'antimoine pentavalent, le traitement première ligne contre la leishmaniose tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, ne sont qu'encore peu compris. Dans certaines régions du monde où la résistance de *Leishmania* est hyperendémique, les échecs à ce traitement se multiplient et constituent le plus grand obstacle à l'éradication de la maladie.

En réponse à cette situation urgente, le repositionnement du TPT, un poison des TOPs, contre cette MTN pourrait s'avérer rapide et rentable. Toutefois, afin de préserver l'efficacité de ce traitement potentiel, il est essentiel d'améliorer notre compréhension des mécanismes de résistance moléculaires étant donné la forte propension du parasite à devenir résistant.

C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse qu'en présence du TPT, le parasite deviendra résistant en générant des modifications génomiques mesurables soit des amplifications et des délétions spécifiques à un locus chromosomique, une augmentation du nombre de chromosomes et/ou des polymorphismes d'un seul nucléotide (en anglais *SNPs*) qui pourront être caractérisés au niveau protéique.

## 3. Objectifs spécifiques

Les objectifs suivants nous permettront de vérifier cette hypothèse:

1. Sélectionner des parasites résistants au TPT *in vitro*.
2. Analyser l'impact du TPT sur le génome entier des parasites résistants sélectionnés.
3. Réaliser une validation fonctionnelle des mutations identifiées.
4. Analyser l'impact structurel de ces mutations génomiques au niveau du complexe ADN-enzyme-TPT à l'aide de modèles *in silico*.

## Section 3: Article

En révision

**Three different mutations in the DNA topoisomerase 1B in *Leishmania infantum* contribute to resistance to antitumor drug topotecan**

Chloé Rosa-Teijeiro<sup>1,2</sup>, Victoria Wagner<sup>1,2</sup>, Audrey Corbeil<sup>1,2</sup>, Ilda d'Annessa<sup>3</sup>, Philippe Leprohon<sup>4</sup>, Rubens L. do Monte-Neto<sup>5</sup>, Christopher Fernandez-Prada<sup>1,2,6\*</sup>

<sup>1</sup>Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>The Research Group on Infectious Diseases in Production Animals (GREMIP), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Québec, Canada

<sup>3</sup>Medtronic EMEA, Study & Scientific Solutions, Milan, Italy

<sup>4</sup>Centre de Recherche en Infectiologie du Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Université Laval, Canada

<sup>5</sup>Instituto René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz Minas, Belo Horizonte, Brazil

<sup>6</sup>Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, McGill University, Montréal, Québec, Canada.

**Keywords:** Protozoan parasites, *Leishmania*, DNA topoisomerases, topotecan, drug resistance, SNPs

### Abstract

**Background:** The evolution of drug resistance is one of the biggest challenges in leishmaniasis and has prompted the need for new antileishmanial drugs. Repurposing of approved drugs is a faster and very attractive strategy that is gaining supporters worldwide. Different anticancer topoisomerase 1B (TOP1B) inhibitors have shown strong antileishmanial activity and promising selective indices, supporting the potential repurposing of these drugs. However, cancer cells and *Leishmania* share the ability to become rapidly resistant. The aim of this study was to complete a whole-genome exploration of the effects caused by exposure to topotecan in order to highlight the potential mechanisms deployed by *Leishmania* to favor its survival in the presence of a TOP1B inhibitor.

**Methods:** We used a combination of stepwise drug-resistance selection, whole-genome sequencing, functional validation, and theoretical approaches to explore the propensity of and potential mechanisms deployed by three independent clones of *L. infantum* to resist the action of TOP1B-inhibitor topotecan.

**Results:** We demonstrated that *L. infantum* is capable of becoming resistant to high concentrations of topotecan without impaired growth ability. No gene deletions or amplifications were identified from the next-generation sequencing data in any of the three resistant lines, ruling out the overexpression of efflux pumps as the preferred mechanism of topotecan resistance. We identified three different mutations in the large subunit of the leishmanial TOP1B (Top1B<sup>F187Y</sup>, Top1B<sup>G191A</sup> and Top1B<sup>W232R</sup>). Overexpression of these mutated alleles in the wild-type background led to high levels of resistance to topotecan. Computational molecular dynamics simulations, in both covalent and non-covalent complexes, showed that these mutations have an effect on the arrangement of the catalytic pentad and on the interaction of these residues with surrounding amino acids and DNA. This altered architecture of the binding pocket results in decreased persistence of topotecan in the ternary complex.

**Conclusions:** This work helps elucidate the previously-unclear potential mechanisms of topotecan resistance in *Leishmania* by mutations in the large subunit of TOP1B and provides a valuable clue for the design of improved inhibitors to combat resistance in both leishmaniasis and cancer. Our data highlights the importance of including drug-resistance evaluation in drug-discovery cascades.

### 3.1 Background

Despite 1 million new cases of leishmaniasis being declared every year, there is still no effective vaccine available for humans. Moreover, available treatments for this major neglected tropical disease (NTD) are limited and outdated [1]. Clinical manifestations vary in severity and include cutaneous, mucocutaneous, and visceral leishmaniasis. The latter form, caused by *Leishmania infantum*, is fatal within two years if left untreated [2]. Leishmaniasis is also responsible for a significant health, psychosocial and economic burden around the world [3, 4].

Due to the limited pharmacopeia, most available antileishmanial drugs are used in both humans and dogs. Of note, dogs constitute the main reservoir for the zoonotic life cycle of *Leishmania* [5, 6].

The rapid emergence and spread of resistant parasite strains has prompted the need for new intervention pathways and antileishmanial drugs. In this way, repurposing of approved drugs has become a very attractive strategy to tackle leishmaniasis and is gaining supporters worldwide [1, 7, 8]. DNA topoisomerases (TOP) have garnered attention since their discovery by James Wang in 1971 [9]. TOP are key enzymes for many essential biological functions such as DNA replication, transcription, recombination, DNA repair, and DNA segregation [10]. TOP enzymes are preferential targets against rapid-dividing, highly-proliferative eukaryotic cells, such as those responsible for various types of cancer (*e.g.* ovarian cancer or metastatic carcinoma of the colon) [11, 12]. Type 1B TOP (TOP1B) are ATP-independent enzymes that relax topological tensions in supercoiled DNA during replication and transcription processes mediated by DNA and RNA polymerases. Eukaryotic TOP1B are monomeric enzymes, except in kinetoplastid organisms (*e.g. Leishmania*) that rely on heterodimeric TOP1B enzymes, with coding genes located in different chromosomes, 34 and 4, respectively [13, 14]. The major structural and functional differences between *Homo sapiens* TOP1B (hTOP1B) and *L. infantum* TOP1B (LiTOP1B) [15, 16], coupled with *Leishmania's* rapid proliferation rate, offer great potential for selective chemotherapy [13]. Different anticancer TOP1B inhibitors, including the water-soluble camptothecin derivative topotecan (TPT) currently used to treat ovarian carcinoma [11], have been successfully tested against *Leishmania* parasites in *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* murine models, demonstrating strong antileishmanial activity and promising selective indices, supporting the potential repurposing of these drugs [8, 17, 18]. However, tumor cells and *Leishmania* parasites share an undesirable and important feature in being prone to become resistant to drug treatment. *L. infantum* relies on DNA copy number variations (CNVs) for regulating the expression of drug targets [19, 20]) and drug-resistance genes [20, 21]. In addition to CNVs, single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in drug target genes or in transporters can lead to drug resistance without the need for altering gene content

[22, 23, 24]. Markedly, recent studies point to the need for experimental generation of drug-resistance to promising compounds in order to clinically evaluate and eventually circumvent the phenomenon [25, 26, 27].

The goal of this study was to complete a whole-genome exploration of the effects caused by prolonged exposure to TPT to highlight the different potential drug-resistance mechanisms (changes in ploidy, CNVs, SNPs, etc.) deployed by *L. infantum* to favor its survival in the presence of an FDA-approved TOP1B inhibitor. This information is critical to the fight against drug-resistant *Leishmania* parasites, furthering knowledge of the mechanisms these parasites use to persist in the presence of drugs, as well as serving as a foundation for improved drug-repurposing strategies.

## **3.2 Methods**

### **3.2.1 *Leishmania* cultures**

*Leishmania infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) wild-type (WT) and mutants resistant to > 700  $\mu\text{M}$  TPT (TPT700.1, TPT700.2 and TPT700.3) generated *in vitro* in a stepwise manner were grown in M199 medium at 25 °C supplemented with 10% fetal bovine serum, and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of hemin at pH 7.0 [and](#) 700  $\mu\text{M}$  of TPT (Topotecan hydrochloride hydrate, Sigma-Aldrich) was added to the media for the maintenance of the endpoint mutants. Growth curves were performed in 25  $\text{cm}^2$  cell culture flasks by seeding  $1 \times 10^6$  parasites/mL, and the number of parasites was determined daily – up to 7 days – by manual counting using the Neubauer hemocytometer. Growth assays were performed with at least three biological replicates from independent cultures ( $n = 3$ ).

### **3.2.2 Mutant selection**

Three *L. infantum* WT independent clones, which were obtained by plating the MHOM/MA/67/ITMAP-263 strain onto solid M199, were independently selected in 25  $\text{cm}^2$  flasks containing 5 mL M199 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hemin in the presence of increasing TPT concentrations, as previously

described [23]. Briefly, the stepwise drug selection ranged from 1× the EC<sub>50</sub> of TPT (24 μM) up to 16× the EC<sub>50</sub> of TPT (384 μM), with a 2-fold increase in drug concentration (24, 48, 96, 192, and 384 μM) every three sub-culturing passages. Topotecan hydrochloride hydrate (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was used as the source of TPT.

### 3.2.3 Drug susceptibility assays

Antileishmanial values in promastigotes were determined by monitoring the growth of parasites after 72 h of incubation at 25 °C in the presence of increasing concentrations of TPT, by measuring A<sub>600</sub> using a Cytation 5 multimode reader (BioTek, USA). Drug-efficacy assays were performed with at least three biological replicates from independent cultures (n = 3). EC<sub>50</sub> values were calculated based on dose-response curves analyzed by non-linear regression with GraphPad Prism 8.4.3 software (GraphPad Software, La Jolla California, USA). Statistical analyses were performed using unpaired two-tailed t-tests. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

### 3.2.4 Whole-genome sequencing of TPT-resistant mutants

Comparative whole genome sequencing (WGS) was performed as previously described [23]. Briefly, genomic DNA was prepared from a mid-log phase clonal culture of each TPT-resistant mutant. DNA was quantified fluorometrically, and 50 ng of material was used for library preparation using Nextera™ DNA Sample Preparation Kit (Illumina) according to manufacturer's instructions. The size distribution of Nextera™ libraries was validated using an Agilent 2100 Bioanalyzer and High Sensitivity DNA chips (Agilent Technologies). Sequencing libraries were quantified with the QuantiFluor® dsDNA System and sequenced using an Illumina MiSeq platform with 250-nucleotide paired-ends reads. An average genome coverage of over 50-fold was obtained for the mutants. This approach allowed identification of SNPs when compared with the reference genome sequence of *L. infantum* JPCM5 (TriTrypDB v9.0) [28] and *L. infantum* 263 WT [29]. Sequence reads were aligned to the *L. infantum* JPCM5 genome and *L. infantum* 263 WT using the software bwa-mem [30]. The maximum number of mismatches was 4, the seed length was 32, and 2 mismatches were allowed within the seed. Read duplicates were marked using Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard>), and GATK was applied for

InDel realignment and SNP and InDel discovery in the three TPT mutants. PCR amplification and conventional DNA sequencing verified SNPs of interest detected by WGS. CNVs were derived from read depth coverage by comparing the coverage of uniquely mapped reads between each of the three TPT mutants and the *L. infantum* 263 WT in 5 kb non-overlapping genomic windows for the 36 chromosomes (normalized to the total number of uniquely mapped reads for each strain) [31]. The sequence data for the *L. infantum* TPT-resistant mutants is available at the NCBI BioProject (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/>) under study accession PRJNA647847 and sample accessions SAMN15599759, SAMN15599760, SAMN15599761, corresponding to TPT-resistant clones TPT700.1, TPT700.2 and TPT700.3, respectively.

### 3.2.5 DNA constructs and nucleofection

The WT allele of *LinJ.34.3220* (DNA topoisomerase IB large subunit) and its three mutant variants were amplified from genomic DNA derived from either *L. infantum* or mutants TPT700.1, TPT700.2 and TPT700.3 (mutations T560A; G572C and T724C, respectively) using compatible primer pairs (Fw: 5'-*Xba*I-ATGAAGGTGGAGAA-3'; Rv: 5'-*Hind*III-TACACCCTCAAAGC-3'). PCR fragments were ligated into pGEM T-easy vector (Promega) to confirm the quality of the insert by standard sequencing. PCR fragments were then cloned in the *Leishmania* expression vector pSP72 $\alpha$ *hyg* $\alpha$ , which contains the gene hygromycin phosphotransferase (*hyg*), a selectable marker in *Leishmania* [32]. A total of 20  $\mu$ g of plasmid DNA for episomal expression, either the empty vector (mock) or carrying the genes of interest, were delivered into *L. infantum* WT promastigotes by nucleofection, as previously described [33]. Selection was achieved in the presence of a final concentration of 300  $\mu$ g/mL hygromycin.

### 3.2.6 Computational methods for the *in silico* study of *Leishmania* topoisomerase 1B

The three-dimensional structure of the *L. donovani* TOP1LS complex (PDB ID: 2B9S [34]) contains residues 27–456 and 221–262 of the large and small subunits, respectively. Residues missing in the crystal structure, 427–430 of the large subunit, have been modelled as reported in Roy et al., 2011 [35]. Following this procedure, a non-covalent interaction of the LiTOP1 bi-subunit with a 22 base-pair DNA substrate was modelled using the program UCSF Chimera [36]

by fitting the structure of the protein backbone atoms on the coordinates of the human enzyme trapped in complex with the DNA (PDB ID 1A36). The same procedure was carried out in order to model an LiTOP1-DNA covalent interaction, using the human TOP1-DNA-topotecan ternary complex, extrapolated from the PDB structure 1K4S [37].

Once the two systems (wild-type LiTOP1-DNA covalent and non-covalent complexes) were obtained, the program UCSF Chimera [36] was used to introduce the three point mutations identified in our whole-genome sequencing experiments (F187Y, G191A, and W242R). All systems were subjected to molecular dynamics (MD) simulations aimed at understanding the structural-dynamical effect of the mutations, thus explaining their impact on TPT sensitivity. Briefly, each covalent and non-covalent complex was placed in a triclinic simulative box filled with water molecules TIP3P model [38], and the resulting systems were rendered electroneutral by the addition of sodium counterions; this step, i.e. the topology building, was performed using the amber14 all-atoms force field, highly suitable for simulating nucleic acids [39]. The systems were first subjected to a round of minimization of 10,000 steps of steepest descent followed by 10,000 steps of conjugate gradient. Relaxation of water molecules and thermalization in NPT environment were carried out for 1.2 ns at 1 fs time-step. In particular, 6 runs of 200 ps each were carried out while increasing the temperature by 50 K at each step, ranging from 50 K to 300 K.

The systems were then simulated with a 2 fs time-step for 300 ns in periodic boundary conditions, using a cut-off of 8 Å for the evaluation of short-range non-bonded interactions and the Particle Mesh Ewald method for long-range electrostatic interactions [40]. The temperature was kept constant at 300 K with Langevin dynamics [41], whereas pressure was fixed at 1 Atmosphere through the Langevin piston method [42]. The bond lengths of solute and water molecules were restrained with the SHAKE [43] and SETTLE [44] algorithms, respectively. Atomic positions were saved every 250 steps (i.e. 0.5 ps) for analysis with the Gromacs 4.6 package [45].

## 3.3 Results

### 3.3.1 *In vitro* resistance selection and characterization of the TPT-resistant mutants

Selection for resistance to TPT was performed to evaluate the possible propensity for drug resistance to this anticancer TOP1B inhibitor if repurposed against visceral leishmaniasis. Experimental concentration-response assays with *L. infantum* WT promastigotes revealed a TPT-sensitive phenotype within the low micromolar range (Fig 1A;  $EC_{50} = 25 \mu\text{M}$ ). Selection of independent TPT-resistant mutants began at  $1 \times EC_{50}$  up to  $16 \times EC_{50}$  of the WT parental line. The selection procedure was fast (3 subsequent passages per drug concentration), and cells rapidly adapted to growing concentrations of TPT. All three clones reached the final selection step at  $16 \times EC_{50}$  (passage 3). At this point, clones were re-evaluated in terms of growth ability and sensitivity to TPT (Fig 1A). All three clones were able to survive concentrations higher than  $700 \mu\text{M}$  (ca.  $28 \times EC_{50}$  of the WT), demonstrating very high  $EC_{50}$  values ( $612$ ,  $519$  and  $602 \mu\text{M}$ , for TPT700.1, TPT700.2 and TPT700.3, respectively) compared to the parental WT strain (approximately  $25 \mu\text{M}$ ). Once the final selection step was reached, the growth rate of each TPT mutant was determined in order to verify their fitness compared to the WT parent line. As depicted in Fig. 1B, the TPT-resistant phenotype experimentally induced in promastigotes did not lead to any significant difference in the growth rate of the parasite when compared to the WT cells (Fig. 1B). Resistant phenotypes were stable after growth in media lacking TPT for over 60 passages (Fig. 1C).

### 3.3.2 Comparative WGS

Whole-genome sequencing was performed to compare the three independent TPT-resistant strains to the WT line to pinpoint and further explore potential mechanisms underlying the resistant phenotype. WGS was conducted by Illumina next-generation sequencing on the three independent *L. infantum* TPT700 resistant lines selected at  $16 \times EC_{50}$ , as well as the isogenic *L. infantum* WT counterpart line. For all strains, this produced genome assemblies of 31 Mb with a coverage depth of at least 50-fold.

No significant deletions or amplifications were identified; however, the TPT-resistant lines demonstrated aneuploidy compared to WT parental line. Two cases of reduction in ploidy were observed in the TPT-resistant mutants (Fig. 2A and Dataset S1). These losses affected chromosome 12 in clone TPT700.3 (Fig. 2A and 2B) and chromosome 32 in the three resistant mutants (Fig. 2C). The  $\log_2$  TPT700.3/WT read ratio for chromosome 12 (Fig. 2B) was close to -0.5, which should represent a loss of one allele compared to WT parasites (going from 4 to 3 chromosome copies). In the same way, the  $\log_2$  TPT/WT read ratio (Fig. 2C) for chromosome 32 was close to -1, pinpointing a trisomic-to-disomic shift in all three TPT-resistant mutants (Fig. 2C), which could correlate with reduced TPT sensitivity. No cases of supernumerary chromosomes were observed in the TPT-resistant mutants (Fig. 2A and Dataset S1).

A search for point mutations revealed several homozygous and heterozygous SNPs in the different TPT-resistant mutants (Dataset S2). Nineteen common genes were mutated in the three TPT-resistant mutants (Table 1). In order to find potential SNP candidates, the different clones were examined for SNPs occurring in the same ORF but at different positions (to avoid mutations that are most likely to occur as natural polymorphisms in the parental strain). SNPs fulfilling these characteristics occurred in eight genes, including two coding for hypothetical proteins (*LinJ.19.1680* and *LinJ.19.1690*), three proteophosphoglycan-coding genes (*LinJ.35.0490*, *LinJ.35.0510* and *LinJ.35.0550*) often found mutated in our various sequencing screens, *LinJ.24.1120* (encoding a putative pre-mRNA splicing factor), *LinJ.34.0710* (encoding a putative flagellar attachment zone protein) and the gene coding for the large subunit of the heterodimeric LiTOP1B (*LinJ.34.3220*). The three different mutations identified in the LiTOP1B ORF by next-generation sequencing (NGS) and confirmed by targeted PCR were homozygous mutations *top1B*<sup>F187Y</sup> and *top1B*<sup>W232R</sup> for TPT700.1 and TPT700.3 mutants, respectively, and heterozygous SNP *top1B*<sup>G191A</sup> for TPT700.2.

### 3.3.3 Impact of LiTOP1B mutant variants in *L. infantum* TPT drug resistance

Because *top1B* is an essential gene in *Leishmania*, our preferred method for studying the role of TOP1B mutations was episomal transfection of wild-type and mutated forms of the gene in the WT background (Fig. 3). To this end, the WT copy as well as the three mutated forms of

*top1B* were recovered by PCR, confirmed by Sanger sequencing, and episomally overexpressed in the WT background. Overexpression of the leishmanial *top1B*<sup>WT</sup> allele did not confer TPT resistance in the WT cell line when compared with the mock control. However, as depicted in Fig. 3, overexpression of all three mutated variants of the *top1B* gene resulted in a significant decrease in TPT sensitivity in the WT: *top1B*<sup>F187Y</sup> (2.62-fold;  $p < 0.0001$ ), *top1B*<sup>G191A</sup> (1.96-fold;  $p = 0.0006$ ) and *top1B*<sup>W232R</sup> (2.28-fold;  $p = 0.0001$ ).

### 3.3.4 Structural effect of the SNPs and impact on TPT sensitivity

The mechanism of inhibition exerted by TPT against TOP1B is strictly dependent on the enzyme catalytic cycle. TOP1B is able to relax the DNA substrate in a five-step reaction: i) DNA binding; ii) DNA cleavage and formation of a transient protein-DNA covalent interaction; iii) DNA controlled rotation to release the torsional stress; iv) DNA re-ligation; v) DNA release. Once the DNA cleavage has occurred, TPT is able to intercalate the DNA bases and stabilize the protein-DNA covalent complex, thus blocking the cycle and stalling the enzyme. If one of the catalytic steps is compromised, this can affect TPT sensitivity.

In order to evaluate the impact of the point mutations on the structure of the protein and its interaction with the DNA substrate for a correct progression of the catalytic cycle, we performed a molecular dynamics (MD) simulations of the WT and mutants enzymes (F187Y, W232R and G191A). In particular, we carried out MD simulations both of the WT and mutant non-covalent and covalent TOP1B-DNA complexes (for a total of eight systems), allowing detection of the mutations' effect in any step of the two phases of the catalytic cycle, i.e. cleavage and religation. This gives important insight into the mechanism(s) underlying resistance due to the fact that these mutations are located in close proximity to the catalytic pentad and to the TPT binding site (Fig. 4).

In both groups of simulations (covalent and non-covalent complexes), the mutation of each residue has an effect on the arrangement of the catalytic pentad (R314, K352, R410 and H453 of the large subunit and Y222 of the small subunit) (Fig. 5 and 6) and on the interaction of these residues with the surrounding amino acids and the DNA substrate (Tables 2 and 3). This likely

alters the cleavage/religation equilibrium, which is at the basis of an altered drug sensitivity. Of note, the profile of interaction at the cleavage site (-1/+1 bases) of the protein-DNA in the non-covalent complex is hardly affected in all mutants, making us hypothesise that due to the improper arrangement of the catalytic pentad, the reaction rate is affected. Similarly, the catalytic pentad arrangement is impacted, in particular at the level of residue K352, which is crucial for the religation reaction to proceed and for the stabilization of TPT in the DNA binding pocket

### 3.4 Discussion

Topotecan is a semi-synthetic, water-soluble analogue of camptothecin (CPT), as well as the first FDA-approved oral TOP1B inhibitor for the treatment of several types of cancer. CPT derivatives have been repeatedly suggested as a good source of repurposed drugs for the treatment of a variety of infectious diseases caused by protozoan parasites [1, 13, 46]. With the alarming decrease in effectiveness of first-line drugs in areas where *L. infantum* is endemic, repurposed drugs could represent a faster solution at lower cost [47]. However, the predisposition of *Leishmania* to develop drug resistance should be addressed when repurposing a drug [1, 25, 27]. In this study, we used a combination of stepwise drug-resistance selection, whole-genome sequencing and theoretical approaches to explore the propensity of and potential mechanisms deployed by three independent clones of *L. infantum* to resist the activity of the TOP1B-inhibitor TPT. One of the major strengths of this approach is that both the parent cell line and three directly derived drug-resistant lines are studied together, and thus, any confounding factor derived from strain-related heterogeneity is excluded from the analysis [23, 48].

Firstly, we demonstrated that *L. infantum* is able to become resistant to high concentrations of TPT. While the mechanisms involved in TPT resistance have not been fully elucidated in tumor cells, several studies have shown the implication of different drug transporters, such as multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1/MRP1) or the ABCG2 transporter [49, 50]. Likewise, *Leishmania* parasites rely on the amplification of ABC transporter MRPA (ABCC) and inactivation of the aquaglyceroporin 1 (AQP1) gene to counter the action of antimonial drugs

[21, 23, 51]. As gene expression in *Leishmania* is regulated predominantly by gene dosage [20, 21], we proceeded to search for large-scale copy number variations (deletions and duplications) in chromosomes of the three selected clones for comparison with the unselected parental line. In the past, different ABCG and ABCC efflux-pump gene clusters were identified in *L. infantum* as part of chromosomes 6, 23 and 31 [52]. In addition, overexpression of the ABCG6 transporter is known to be involved in CPT resistance in *Leishmania* parasites [53]. Of note, none of these regions was found amplified in any of the three TPT-resistant clones in our whole-genome comparative analysis, thus indicating a different mechanism of drug resistance when compared with CPT.

The absence of significant amplifications, coupled with the very unusual fact that no prominent changes in ploidy were observed for any of the studied clones [54], led us to suspect the potential implication of SNPs and small nucleotide insertions or deletions (indels) in the TPT-resistant phenotypes. Several SNPs have been shown to contribute to drug resistance (e.g. miltefosine, antimonial drugs, etc.) in *Leishmania* parasites by altering the activity of specific transporters or modifying different detoxification pathways [22, 23, 29, 55, 56]. Here we focused on SNPs and indels present in the three TPT-resistant clones and, at the same time, occurring in the same ORF but at different positions. Among the 8 genes fulfilling these criteria, we identified the ORF coding for the large subunit of the DNA topoisomerase IB, which is the main target of CPT-derivatives once bound to the DNA during cell replication [10, 11]. Clones TPT700.1 and TPT700.3 displayed homozygous mutations in the *top1B* gene, while the SNP identified in TPT700.2 was heterozygous. Although previously observed in diploid *Leishmania* parasites, homozygous mutations are rare because of their 'non-reversible' nature. The homozygous mutations in clones TPT700.1 and TPT700.3 may have originated from loss of heterozygosity, a well described phenomenon in *Leishmania* [57, 58]. Importantly, these results reinforce previous works demonstrating the possibility that, although rare, *Leishmania* can generate SNPs associated with drug resistance without the need for alteration of its genomic architecture and gene expression [59].

Due to the impossibility of generating a null mutant, our preferred way for studying the role of mutated variants of *top1B* consisted of episomal transfection of the mutated forms into a wild-type strain [23]. As expected, since transfected parasites still carry the *top1B*<sup>WT</sup>, we were able to only partly recreate the resistance observed in the TPT700 mutants. However, the relative strength of each mutation followed the same drug-resistance trend in both the original mutants (TPT700.1 > TPT700.3 > TPT700.2) and the episomal transfectants (*top1B*<sup>F187Y</sup> > *top1B*<sup>W232R</sup> > *top1B*<sup>G191A</sup>).

To better understand the potential contribution of these three SNPs to TPT resistance in the mutants, we performed several MD simulations. All three residues identified in the TPT700 mutants (F187, G191 and W232) were conserved between the human and parasitic enzyme and can be structurally aligned (Figure 4). They were located in proximity of the TPT binding site, in close proximity to residues found to be crucial in the human enzyme for the interaction and stabilization of TPT with residues R364 and N722 once intercalated between DNA bases [60], corresponding to leishmanial residues R190 and N221. Thus, we can hypothesize that a change in one of the residues of this cluster may influence the arrangement of the TPT binding site. Although these residues are in proximity of the catalytic pentad [11, 14, 61], the mutations identified in this study are likely affecting the ability of binding of TPT to the DNA-TOP1B complex without altering the global catalytic function of the enzyme, but potentially accelerating the re-ligation step. Indeed, it has been very well established that a malfunction of cleavage/re-ligation reactions will be reflected through altered protein drug sensitivity [11, 60]. Of note, two of the three SNPs identified in the TPT700 mutants (F187Y and G191A) were located within the conserved region corresponding to amino acids 361-365 in the hTOP1B enzyme. These results confirm the findings of Rubin *et al.* (1993) showing that a substitution of residue F361 can induce high levels of resistance against a CPT derivate (*e.g.* 9-nitro-20(S)camptothecin) in human U-937 myeloid leukemia cells [62]. Likewise, Li *et al.* (1997) showed that certain substitutions in the 361-364 region affect DNA cleavage/ligation by the enzyme, as well as contribute to resistance against CPT since they may be included in the CPT-binding domain [63]. These results suggest that these mutations are able to modify the

architecture of the binding site, decreasing the persistence of TPT in the binding pocket, as well indicate that CPT and TPT may share binding sites in the LiTOP1B–DNA complex.

Furthermore, in the covalent complexes, K352 and R410 demonstrate a changed profile of interaction in all three TPT700 mutants. In particular, the hydrogen bond between K352 and D353 is lost. This interaction is crucial for the correct position of K352 (known to be a key player in the re-ligation reaction), and when incorrectly positioned affects the re-ligation rate and thus TPT sensitivity [15, 64]. Moreover, D353 is itself involved in the network of residues and TPT interaction. As such, the lack of the K352-D353 hydrogen bond and side chains orientation may be a main cause for rearrangement of the TPT binding site and lowered stabilization of the drug in the binding pocket, further explaining the observed resistance.

Importantly, the three TPT700 mutants became resistant to TPT without impairing their ability to proliferate *in vitro*. The process of becoming drug resistant can lead to different evolutionary disadvantages ('fitness cost'), such as reduced survival [65]. However, this concept remains controversial in *Leishmania* and is highly dependent on the parasite's genetic and environmental context [48]. Likewise, drug-resistant cancer cell lines exhibit different fitness-cost profiles, including subpopulations with increased fitness when compared to their sensitive counterparts [66]. The absence of fitness cost *in vitro* in the TPT700 mutants could be due in part to the fact that these cells do not use ATP-dependent drug efflux pumps to resist treatment (*e.g.* MRPA in antimony resistance), for which they would have to divert energy away from proliferation towards running of the pumps. Moreover, the absence of a cost in terms of growth would also explain why the TPT700 mutants did not return to sensitivity once the TPT was withdrawn. Mutants of this type have the potential to become a major risk for the spread of drug resistance into an environment devoid of antileishmanial drugs. However, at this point, whether this phenomenon would be stable *in vivo* or in the vector remains to be evaluated.

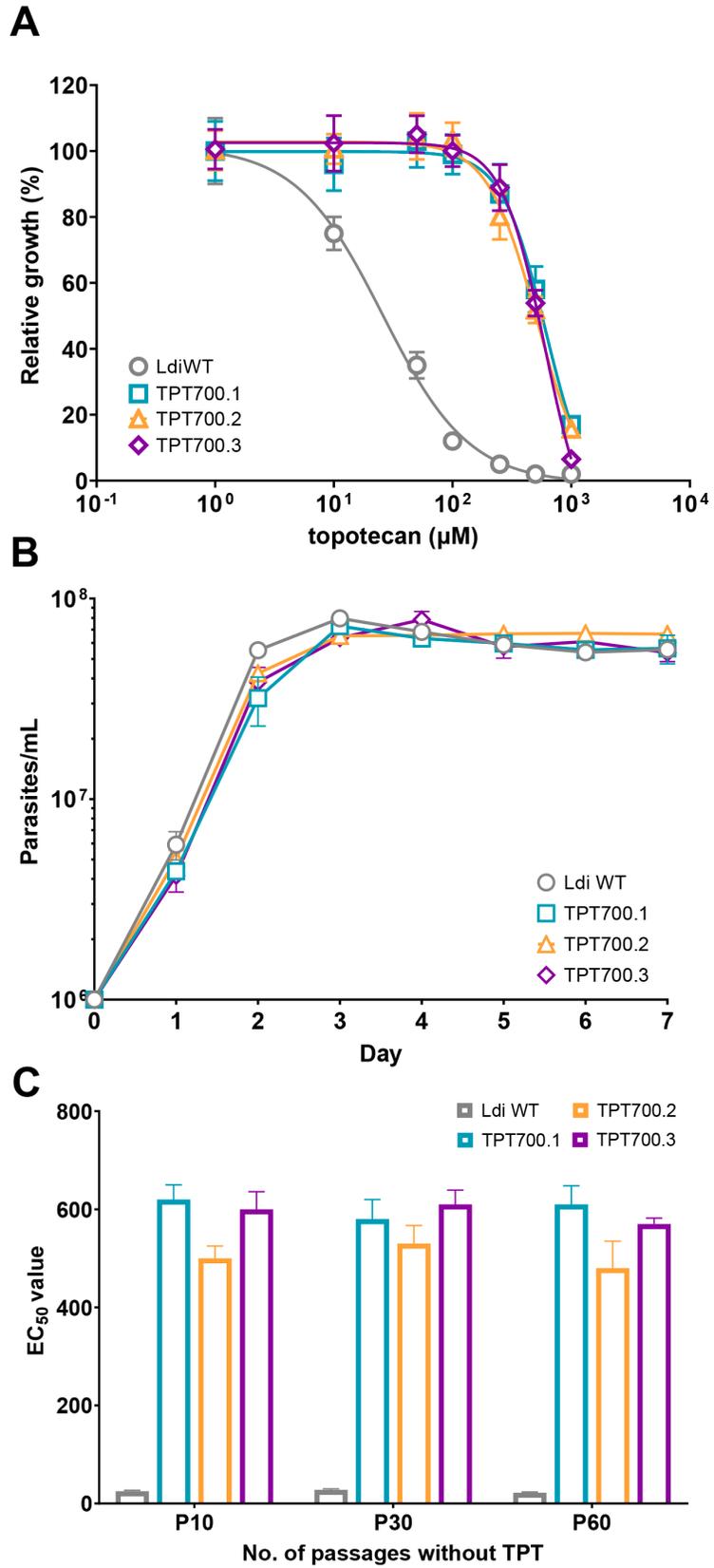
### 3.5 Conclusions

This study represents the first whole-genome characterization of *Leishmania* parasites repeatedly exposed to a TOP1B inhibitor. Unlike current antileishmanial agents, TPT resistance

did not impact leishmanial genomic organization or gene expression, and did not lead to amplification of efflux pumps; a phenomenon previously reported for CPT analogues in cancer cells. Of note, we found that these mutations could decrease the binding of TPT to the DNA-TOP1B binary complex, as well as lower the stabilization of the drug in the binding pocket of the leishmanial heterodimeric enzyme. Altogether, this work helps elucidate the previously-unclear potential mechanisms of TPT resistance in *Leishmania* by mutations in the large subunit of TOP1B, and provides a valuable clue for the design of improved inhibitors to combat drug resistance. Due to the conserved nature of the mutated amino acids, this knowledge could also provide important means of overcoming resistance to TOP1B-specific drugs and developing diagnostic tools to detect TPT-resistant tumor cells. Finally, this study supports and expands the importance of including drug-resistance assessments in drug-discovery and drug-repurposing cascades before proposing a molecule as a potential prototype for treatment of parasitic diseases.

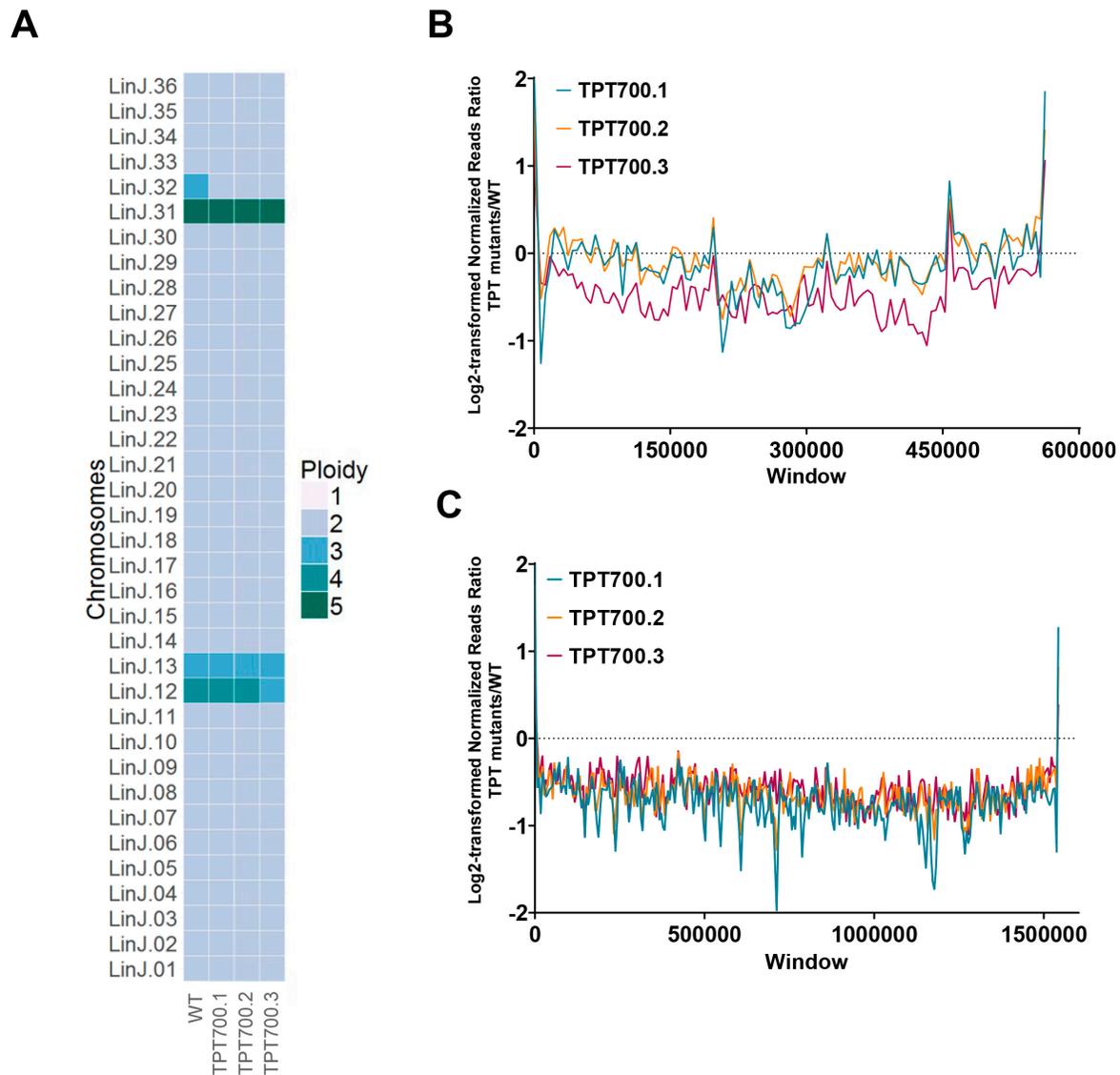
### **3.5.1 Acknowledgements**

We would like to thank to Professor Marc Ouellette for his outstanding support with WGS experiments. We would like also to thank Dr. Aida Minguez-Menendez for her help with the conception and creation of the graphical abstract and figures.



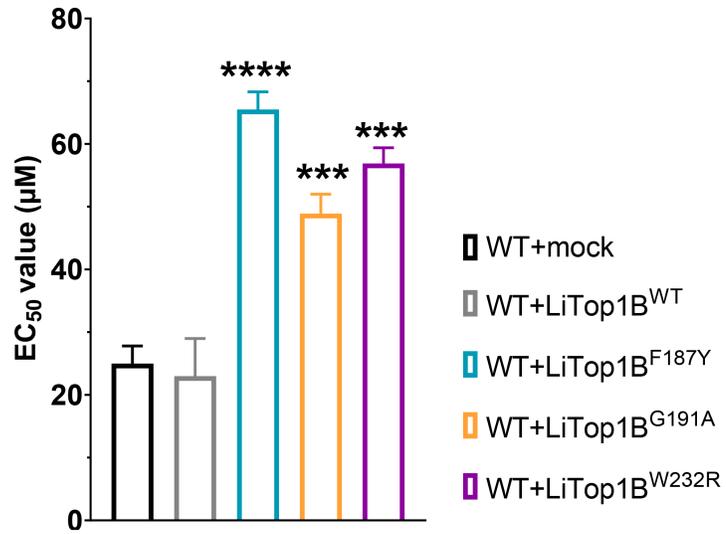
**Figure 5.** Phenotypic characterization of *L. infantum* TPT-resistant mutants selected in vitro.

(A) Concentration-response curves for *L. infantum* WT and TPT-resistant promastigotes in the presence of growing concentrations of TPT. EC50 values were calculated from concentration-response curves performed in triplicate after nonlinear fitting with GraphPad Prism 8.4.3 software: 25, 612, 519 and 602  $\mu\text{M}$  for the WT, TPT700.1, TPT700.2 and TPT700.3, respectively. (B) Growth profiles of *L. infantum* WT and the three TPT-resistant mutants after reaching the last selection step. Parasites were seeded in M199 medium at a final concentration of 106 parasites mL<sup>-1</sup>, and their growth was monitored daily for seven days by manual counting. For A and B, data are the mean  $\pm$  SEM of three biological replicates. Statistical analyses were performed using unpaired two tailed t-tests. (C) EC50 calculation for the three TPT-resistant mutants after 10, 30 and 60 passages without TPT in the cell culture media.



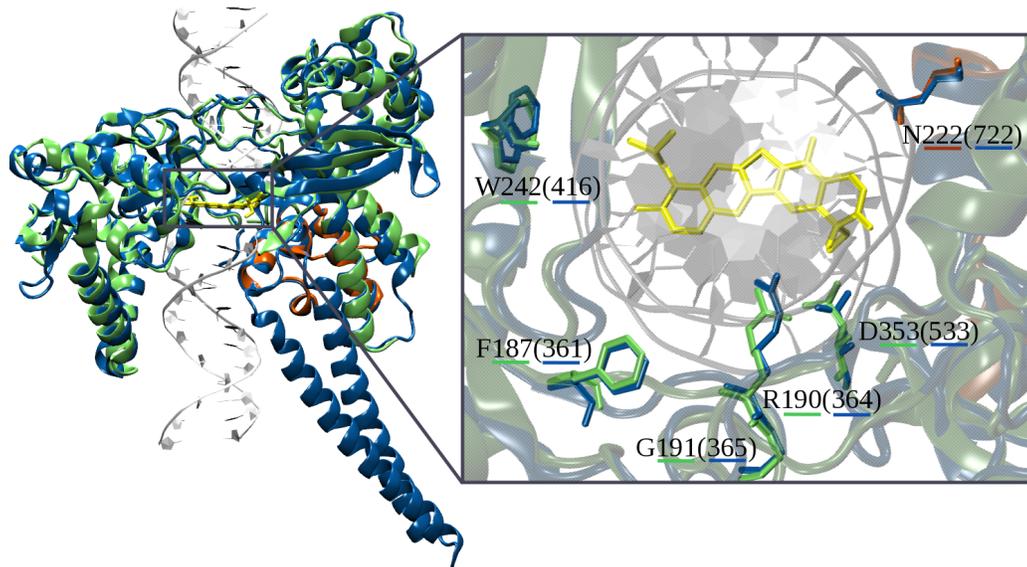
**Figure 6.** Dynamics of aneuploidy of *L. infantum* after in vitro adaptation to TPT.

(A) Heatmap representation of log<sub>2</sub>-transformed normalized TPT-resistant/WT read ratio for all 36 chromosomes in the three independent *L. infantum* TPT-resistant lines selected at 16× EC50. Chromosomes were divided into non-overlapping 5 kb genomic windows and median *L. infantum* TPT-resistant/WT reads ratios for each chromosome was normalized according to the total number of reads followed by log<sub>2</sub>-transformation. (B) Log<sub>2</sub>-transformed 16×TPT-resistant mutants/WT reads ratios for non-overlapping 5 kb genomic windows on chromosome 12. (C) Log<sub>2</sub>-transformed 16×TPT-resistant mutants/WT reads ratios for non-overlapping 5 kb genomic windows on chromosome 32.



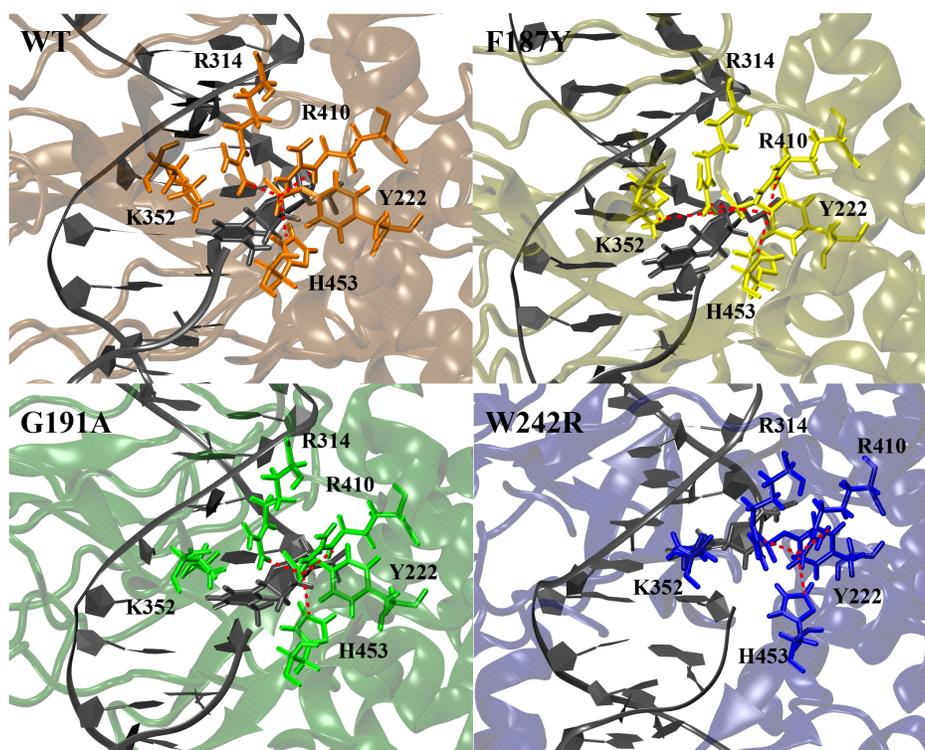
**Figure 7.** Impact of overexpression of the leishmanial top1BWT gene, as well as three mutated versions, on the TPT-sensitivity profile of *L. infantum*.

EC50 values were calculated from concentration-response curves performed in triplicate after nonlinear fitting. Data are the mean  $\pm$  SEM of three biological replicates. Differences were statistically evaluated by unpaired two-tailed t-test (\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ).



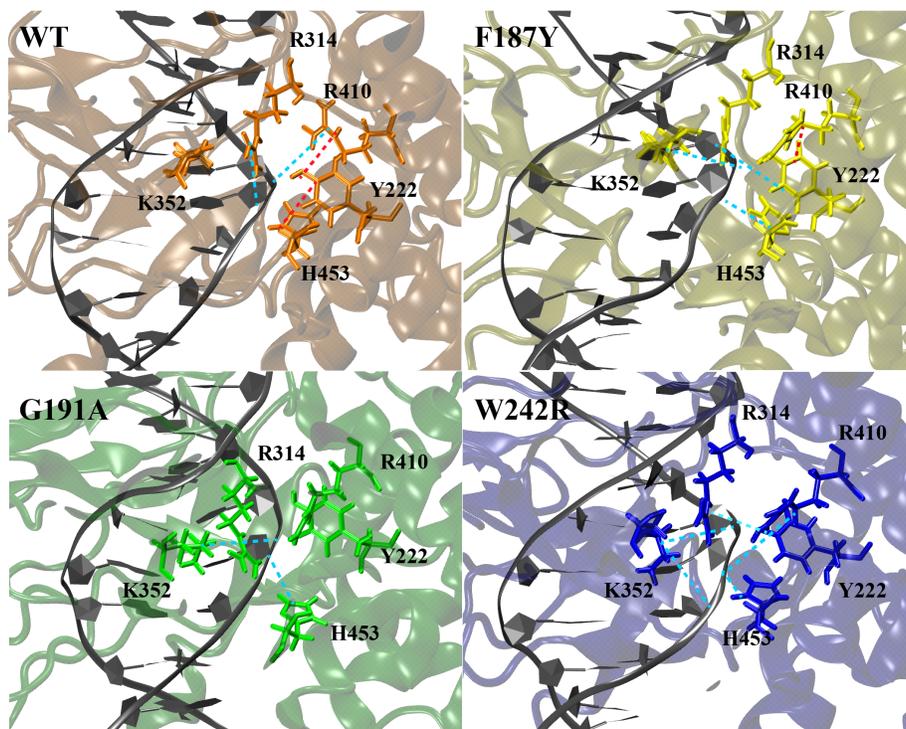
**Figure 8.** Structural alignment between LiTop1B (PDB 2b9s) and hTop1B crystallized in covalent complex with DNA and in the presence of the inhibitor topotecan (PDB 1k4t).

The large and small subunits from the dimeric structure of LiTOP1B are shown in green and orange, respectively, while hTop1B is reported in light blue and topotecan is shown in yellow. The insert panel shows topotecan together with the structural alignment of residues forming the binding pocket (hR364, hD533 and hN722) and the residues of LiTOP1B that, if mutated, lead to drug resistance (LiF187, LiG191 and LiW242).



**Figure 9.** Covalent simulations reporting the three-dimensional arrangement of the catalytic pentad in the four systems and its intra-pentad and pentad-DNA hydrogen bonds.

WT: top-left panel; F187Y: top-right panel; G191A: bottom-left panel; and W242R: bottom-right panel. The residue-residue interactions are highlighted by a red line, while those occurring with the DNA are shown with a light blue line.



**Figure 10.** Non-covalent simulations, reporting the three-dimensional arrangement of the catalytic pentad in the four systems and its intra-pentad and pentad-DNA hydrogen bonds.

WT: top-left panel; F187Y: top-right panel; G191A: bottom-left panel; and W242R: bottom-right panel. The residue-residue interactions are highlighted by a red line, while those occurring with the DNA are shown with a light blue line.

**Table 4.** Overview of the common mutated genes in the three TPT-resistant mutants. The information depicting all Reference/Mutant nucleotide changes is contained in Dataset S2. (Het: heterozygous; Hom: homozygous; na: not applicable due to frameshift).

Mutant	Gene ID	Mutation Position	Allel frequency	Ref/Mut AA	Gene function
TPT700.1	<i>LinJ.01.0420</i>	1073	Het.	A/E	Hypothetical protein conserved
TPT700.2		1073	Het.	A/E	
TPT700.3		1073	Het.	A/E	
TPT700.1	<i>LinJ.09.0680</i>	1388	Hom.	na	Hypothetical protein conserved
TPT700.2		1388	Hom.	na	
TPT700.3		1388	Hom.	na	
TPT700.1	<i>LinJ.09.0950</i>	17	Hom.	na	Polyubiquitin
TPT700.2		17	Hom.	na	
TPT700.3		17	Hom.	na	
TPT700.1	<i>LinJ.12.0662</i>	425	Het.	S/T	Surface antigen protein putative
TPT700.2		425	Het.	S/T	
TPT700.3		425	Het.	S/T	
TPT700.1	<i>LinJ.19.1680</i>	3792	Het.	na	Hypothetical protein
TPT700.2		3665	Het.	V/A	
TPT700.3		2940	Hom.	E/D	
TPT700.1	<i>LinJ.19.1690</i>	3956	Het.	S/N	Hypothetical protein
TPT700.2		3389	Het.	G/A	
TPT700.3		3956	Het.	S/N	
TPT700.1	<i>LinJ.24.1120</i>	771	Het.	S/R	pre-mRNA splicing factor putative
TPT700.2		776	Het.	S/F	
TPT700.3		771	Het.	S/R	
TPT700.1	<i>LinJ.27.0870</i>	2572	Het.	R/G	Hypothetical protein conserved
TPT700.2		2572	Het.	R/G	
TPT700.3		2572	Het.	R/G	
TPT700.1	<i>LinJ.28.2320</i>	856	Hom.	N/Y	Hypothetical protein conserved
TPT700.2		856	Hom.	N/Y	
TPT700.3		856	Hom.	N/Y	
TPT700.1	<i>LinJ.28.2390</i>	1321	Hom.	na	Cyclin-dependent kinase-binding protein putative
TPT700.2		1321	Hom.	na	
TPT700.3		1321	Hom.	na	
TPT700.1	<i>LinJ.28.2450</i>	3758	Hom.	na	DNA topoisomerase ii
TPT700.2		3758	Hom.	na	
TPT700.3		3758	Hom.	na	
TPT700.1	<i>LinJ.29.1450</i>	242	Hom.	A/V	Amastin-like protein
TPT700.2		242	Het.	A/V	
TPT700.3		242	Hom.	A/V	
TPT700.1	<i>LinJ.29.2240</i>	1267	Hom.	L/F	Hypothetical protein conserved
TPT700.2		1267	Hom.	L/F	
TPT700.3		1267	Hom.	L/F	

TPT700.1		1088	Hom.	na	Hypothetical protein unknown function
TPT700.2	<i>LinJ.31.1470</i>	1088	Hom.	na	
TPT700.3		1109	Het.	na	
TPT700.1		2129	Het.	G/D	Flagellar attachment zone protein putative
TPT700.2	<i>LinJ.34.0710</i>	76	Het.	A/P	
TPT700.3		2843	Het.	D/G	
TPT700.1		560	Hom.	F/Y	DNA topoisomerase IB large subunit
TPT700.2	<i>LinJ.34.3220</i>	572	Het.	G/A	
TPT700.3		724	Hom.	W/R	
TPT700.1		16451	Hom.	R/H	Proteophosphoglycan ppg4
TPT700.2	<i>LinJ.35.0490</i>	1992	Het.	na	
TPT700.3		16285	Hom.	V/I	
TPT700.1		7549	Het.	A/T	Proteophosphoglycan ppg4
TPT700.2	<i>LinJ.35.0510</i>	5278	Het.	V/L	
TPT700.3		2437	Het.	G/S	
TPT700.1		1699	Het.	A/T	Proteophosphoglycan ppg1
TPT700.2	<i>LinJ.35.0550</i>	2471	Het.	na	
TPT700.3		2471	Hom.	na	

**Table 5.** Analysis of the hydrogen-bond network in covalent complex simulations. (PTR stands for phosphotyrosine while “s” following the residue number indicates that residue belongs to the small subunit).

	WT	F187Y	G191A	W232R
<b>Active site pentad and surrounding residues</b>				
ARG314:PTR222s	97.78	98.26	97.97	98.82
CYS329:ARG314	98.46	98.33	98.38	98.12
LYS352:ASP353	60.41			
ILE355:LYS352	78.65	77.83	78.79	86.33
ARG410:ALA406	44.55			
ARG410:PTR222s	99.72	99.79	99.67	99.55
ARG410:ALA312	85.33	97.66	91.83	97.50
ARG410:CYS451		41.72		48.01
ALA414:ARG410	90.37	90.21	85.86	89.70
HIS453:ALA202s	85.22	82.20	82.39	80.23
HIS453:PTR222s	97.64	90.28	96.79	90.86
SER214s:HIS453	93.57	93.87	87.36	92.65
PTR222s:SER218s	76.09	65.74	66.94	67.68
<b>Residues of point mutations and surrounding residues</b>				
PHE(Y)187:LYS198	99.05	99.37	99.40	99.53
GLY189:PHE(Y)187		80.85	69.95	64.26
GLY197:PHE187	93.63	99.31	99.53	99.56
HIS193:GLY(A)191		65.35		65.47
TRP(R)242:LYS225	96.20	84.25	98.36	95.50

**Table 6.** Analysis of the hydrogen-bond network in non-covalent complex simulations. (“s” following the residue number indicates that residue belongs to the small subunit).

	WT	F187Y	G191A	W232R
<b>Active site pentad and surrounding residues and DNA bases</b>				
ARG314:ASN452			69.42	
CYS329: ARG314	98.76	97.96	98.37	97.98
LYS352:ASP353	70.96	68.41	88.26	
ILE355:LYS352	57.14	73.93	96.42	75.04
ARG410:ALA406	44.32	61.96	97.86	
ARG410:ALA312	90.58	98.60	75.04	90.59
ARG410:TYR222s	59.80	83.62		
ARG410:CYS451		45.97		
ALA414:ARG410	89.56	89.25	96.27	90.98
HIS453:ALA202s	79.59	85.58	90.06	86.04
SER214s:HIS453	85.85	93.02	76.47	88.41
TYR222s:SER218s	68.45	73.21	78.77	64.46
ARG314:THY +1	87.60	98.50	73.82	88.02
LYS352::THY -1		52.21	68.58	53.88
LYS352:THY +1				74.12
ARG410:THY +1	75.18	86.34		
HIS453:THY +1	94.79	96.96	55.49	87.59
TYR222s:THY -1	65.22	80.60		43.97
TYR222s:THY +1	55.33			70.77
<b>Residues of point mutations and surrounding residues</b>				
PHE(Y)187:LYS198	99.25	99.14	99.33	99.48
GLY189:PHE(Y)187				44.74
GLY197:PHE187	92.48	99.16	99.29	99.52
HIS193:GLY(A)191			46.89	61.69
TRP(R)242:LYS225	98.45	98.33	98.03	94.67
TRP(R)242:LYS182				73.40

### **3.6 Abbreviations**

A600: absorbance at 600 nm

ABC: ATP Binding Cassette

AQP1: aquaglyceroporin 1

CNVs: DNA copy number variations

CPT: camptothecin

dsDNA: double-stranded DNA

EC50: half maximal effective concentration

FDA: US Food and Drug Administration

hyg: hygromycin phosphotransferase gene

hTOP1B: Homo sapiens DNA topoisomerase 1B

InDel: insertion-deletion

LiTOP1B: Leishmania donovani infantum DNA topoisomerase 1B

MD: Molecular dynamics

MRP: Multidrug Resistance-Associated Protein

NGS: next-generation sequencing

NTD: Neglected Tropical Disease

ORF: open reading frame

SNP: single nucleotide polymorphism

TOP: DNA topoisomerase

TOP1B: Type 1B DNA topoisomerase

TPT: topotecan

WGS: whole-genome sequencing

WT: wild-type

### 3.7 References

1. Fernández-Prada C, Douanne N, Minguez-Menendez A, Pena J, Tunes LG, Pires DEV, et al. Chapter 5 - Repurposed Molecules: A New Hope in Tackling Neglected Infectious Diseases. In: Roy K, editor. *In Silico Drug Design*: Academic Press; 2019. p. 119-60.
2. Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, Pearson R, Lopez-Velez R, Weina P, et al. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Am J Trop Med Hyg*. 2017;96 1:24-45; doi: 10.4269/ajtmh.16-84256. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27927991>.
3. Bennis I, De Brouwere V, Belrhiti Z, Sahibi H, Boelaert M. Psychosocial burden of localised cutaneous Leishmaniasis: a scoping review. *BMC Public Health*. 2018;18 1:358; doi: 10.1186/s12889-018-5260-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29544463>.
4. Heydarpour F, Sari AA, Mohebbali M, Shirzadi M, Bokaie S. Incidence and Disability-Adjusted Life Years (Dalys) Attributable to Leishmaniasis In Iran, 2013. *Ethiop J Health Sci*. 2016;26 4:381-8; doi: 10.4314/ejhs.v26i4.10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27587936>.
5. Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasit Vectors*. 2009;2 Suppl 1:S1; doi: 10.1186/1756-3305-2-S1-S1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426440>.
6. Dostalova A, Volf P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors*. 2012;5:276; doi: 10.1186/1756-3305-5-276. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23206339>.
7. Souza Silva JA, Tunes LG, Coimbra RS, Ascher DB, Pires DEV, Monte-Neto RL. Unveiling six potent and highly selective antileishmanial agents via the open source compound collection 'Pathogen Box' against antimony-sensitive and -resistant *Leishmania braziliensis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;133:111049; doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111049>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332220312415>.
8. Prada CF, Álvarez-Velilla R, Balaña-Fouce R, Prieto C, Calvo-Álvarez E, Escudero-Martínez JM, et al. Gimitecan and other camptothecin derivatives poison *Leishmania* DNA-topoisomerase IB leading to a strong leishmanicidal effect. *Biochemical Pharmacology*. 2013;85 10:1433-40; doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.024>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295213001470>.

9. Wang JC. Interaction between DNA and an Escherichia coli protein  $\omega$ . *Journal of Molecular Biology*. 1971;55 3:523-536; doi: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(71\)90334-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(71)90334-2).  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283671903342>.
10. Pommier Y, Sun Y, Huang SN, Nitiss JL. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17 11:703-21; doi: 10.1038/nrm.2016.111. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27649880>.
11. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2006;6 10:789-802; doi: 10.1038/nrc1977.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990856>.
12. Ubhi T, Brown GW. Exploiting DNA Replication Stress for Cancer Treatment. *Cancer Res*. 2019;79 8:1730-9; doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3631.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30967400>.
13. Balaña-Fouce R, Álvarez-Velilla R, Fernández-Prada C, García-Estrada C, Reguera RM. Trypanosomatids topoisomerase re-visited. New structural findings and role in drug discovery. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2014;4 3:326-37; doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.07.006>.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211320714000190>.
14. Villa H, Otero Marcos AR, Reguera RM, Balana-Fouce R, Garcia-Estrada C, Perez-Pertejo Y, et al. A novel active DNA topoisomerase I in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*. 2003;278 6:3521-6; doi: 10.1074/jbc.M203991200.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12444094>.
15. Prada CF, Álvarez-Velilla R, Diaz-González R, Prieto C, Pérez-Pertejo Y, Balaña-Fouce R, et al. A pentapeptide signature motif plays a pivotal role in *Leishmania* DNA topoisomerase IB activity and camptothecin sensitivity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2012;1820 12:2062-71; doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.005>.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416512002607>.
16. Prada CF, Alvarez-Velilla R, Diaz-Gozalez R, Perez-Pertejo Y, Balana-Fouce R, Reguera RM. Identification and characterization of the regions involved in the nuclear translocation of the heterodimeric leishmanial DNA topoisomerase IB. *PLoS One*. 2013;8 9:e73565; doi: 10.1371/journal.pone.0073565.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24023887>.
17. Balana-Fouce R, Prada CF, Requena JM, Cushman M, Pommier Y, Alvarez-Velilla R, et al. Indotecan (LMP400) and AM13-55: two novel indenoisoquinolines show potential for treating visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56 10:5264-70; doi: 10.1128/AAC.00499-12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22850521>.

18. D'Annessa I, Castelli S, Desideri A. Topoisomerase 1B as a target against leishmaniasis. *Mini Rev Med Chem*. 2015;15 3:203-10; doi: 10.2174/138955751503150312120912. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25769969>.
19. Kundig C, Leblanc E, Papadopoulou B, Ouellette M. Role of the locus and of the resistance gene on gene amplification frequency in methotrexate resistant *Leishmania tarentolae*. *Nucleic Acids Res*. 1999;27 18:3653-9; doi: 10.1093/nar/27.18.3653. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471733>.
20. Gazanion E, Fernandez-Prada C, Papadopoulou B, Leprohon P, Ouellette M. Cos-Seq for high-throughput identification of drug target and resistance mechanisms in the protozoan parasite *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113 21:E3012-21; doi: 10.1073/pnas.1520693113. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27162331>.
21. El Fadili K, Messier N, Leprohon P, Roy G, Guimond C, Trudel N, et al. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49 5:1988-93; doi: 10.1128/AAC.49.5.1988-1993.2005. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855523>.
22. Perez-Victoria FJ, Gamarro F, Ouellette M, Castanys S. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem*. 2003;278 50:49965-71; doi: 10.1074/jbc.M308352200. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14514670>.
23. Douanne N, Wagner V, Roy G, Leprohon P, Ouellette M, Fernandez-Prada C. MRPA-independent mechanisms of antimony resistance in *Leishmania infantum*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2020;13:28-37; doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.03.003>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211320720300051>.
24. Fernandez-Prada C, Vincent IM, Brotherton MC, Roberts M, Roy G, Rivas L, et al. Different Mutations in a P-type ATPase Transporter in *Leishmania* Parasites are Associated with Cross-resistance to Two Leading Drugs by Distinct Mechanisms. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10 12:e0005171; doi: 10.1371/journal.pntd.0005171. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27911896>.
25. Hefnawy A, Berg M, Dujardin JC, De Muylder G. Exploiting Knowledge on *Leishmania* Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs. *Trends Parasitol*. 2017;33 3:162-74; doi: 10.1016/j.pt.2016.11.003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27993477>.
26. Van den Kerkhof M, Mabile D, Hendrickx S, Leprohon P, Mowbray CE, Braillard S, et al. Antileishmanial Aminopyrazoles: Studies into Mechanisms and Stability of Experimental Drug Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64 9; doi: 10.1128/AAC.00152-20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32601168>.

27. Bhattacharya A, Corbeil A, do Monte-Neto RL, Fernandez-Prada C. Of Drugs and Trypanosomatids: New Tools and Knowledge to Reduce Bottlenecks in Drug Discovery. *Genes (Basel)*. 2020;11 7; doi: 10.3390/genes11070722. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32610603>.
28. Aslett M, Aurrecochea C, Berriman M, Brestelli J, Brunk BP, Carrington M, et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res*. 2010;38 Database issue:D457-62; doi: 10.1093/nar/gkp851. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19843604>.
29. Ritt JF, Raymond F, Leprohon P, Legare D, Corbeil J, Ouellette M. Gene amplification and point mutations in pyrimidine metabolic genes in 5-fluorouracil resistant *Leishmania infantum*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7 11:e2564; doi: 10.1371/journal.pntd.0002564. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24278495>.
30. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25 14:1754-60; doi: 10.1093/bioinformatics/btp324. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19451168>.
31. Chiang DY, Getz G, Jaffe DB, O'Kelly MJ, Zhao X, Carter SL, et al. High-resolution mapping of copy-number alterations with massively parallel sequencing. *Nat Methods*. 2009;6 1:99-103; doi: 10.1038/nmeth.1276. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19043412>.
32. Papadopoulou B, Roy G, Ouellette M. A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of *Leishmania*. *EMBO J*. 1992;11 10:3601-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1396560>.
33. Fernandez-Prada C, Sharma M, Plourde M, Bresson E, Roy G, Leprohon P, et al. High-throughput Cos-Seq screen with intracellular *Leishmania infantum* for the discovery of novel drug-resistance mechanisms. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2018;8 2:165-73; doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.03.004>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211320718300071>.
34. Davies DR, Mushtaq A, Interthal H, Champoux JJ, Hol WG. The structure of the transition state of the heterodimeric topoisomerase I of *Leishmania donovani* as a vanadate complex with nicked DNA. *J Mol Biol*. 2006;357 4:1202-10; doi: 10.1016/j.jmb.2006.01.022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16487540>.
35. Roy A, Chowdhury S, Sengupta S, Mandal M, Jaisankar P, D'Annessa I, et al. Development of derivatives of 3, 3'-diindolylmethane as potent *Leishmania donovani* bi-subunit topoisomerase IB poisons. *PLoS One*. 2011;6 12:e28493; doi: 10.1371/journal.pone.0028493. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22174820>.

36. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25 13:1605-12; doi: 10.1002/jcc.20084.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15264254>.
37. Staker BL, Hjerrild K, Feese MD, Behnke CA, Burgin AB, Jr., Stewart L. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99 24:15387-92; doi: 10.1073/pnas.242259599.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12426403>.
38. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys.* 1983;79:926; doi: <http://dx.doi.org/10.1063/1.445869>.
39. Maier JA, Martinez C, Kasavajhala K, Wickstrom L, Hauser KE, Simmerling C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput.* 2015;11 8:3696-713; doi: 10.1021/acs.jctc.5b00255.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26574453>.
40. Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys.* 1993;98:10089; doi: <https://doi.org/10.1063/1.464397>.
41. Ceriotti M, Bussi G, Parrinello M. Langevin equation with colored noise for constant-temperature molecular dynamics simulations. *Phys Rev Lett.* 2009;102 2:020601; doi: 10.1103/PhysRevLett.102.020601. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19257259>.
42. Feller SE, Zhang Y, Pastor RW. Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. *J Chem Phys.* 1995;103:4613; doi: <https://doi.org/10.1063/1.470648>.
43. Ryckaert J-P, Ciccotti G, Berendsen HJC. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics.* 1977;23 3:327-41; doi: [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5).  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021999177900985>.
44. Miyamoto S, Kollman PA. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. 1992;13 8:952-62; doi: <https://doi.org/10.1002/jcc.540130805>.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.540130805>.
45. Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J Chem Theory Comput.*

- 2008;4 3:435-47; doi: 10.1021/ct700301q.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26620784>.
46. Garcia-Estrada C, Prada CF, Fernandez-Rubio C, Rojo-Vazquez F, Balana-Fouce R. DNA topoisomerases in apicomplexan parasites: promising targets for drug discovery. *Proc Biol Sci*. 2010;277 1689:1777-87; doi: 10.1098/rspb.2009.2176.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20200034>.
  47. Chong CR, Sullivan DJ, Jr. New uses for old drugs. *Nature*. 2007;448 7154:645-6; doi: 10.1038/448645a. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17687303>.
  48. Hendrickx S, Guerin PJ, Caljon G, Croft SL, Maes L. Evaluating drug resistance in visceral leishmaniasis: the challenges. *Parasitology*. 2018;145 4:453-63; doi: 10.1017/S0031182016002031. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27866478>.
  49. Tian Q, Zhang J, Chan SY, Tan TM, Duan W, Huang M, et al. Topotecan is a substrate for multidrug resistance associated protein 4. *Curr Drug Metab*. 2006;7 1:105-18; doi: 10.2174/138920006774832550. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16454695>.
  50. Allen JD, Brinkhuis RF, Wijnholds J, Schinkel AH. The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res*. 1999;59 17:4237-41.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10485464>.
  51. Legare D, Cayer S, Singh AK, Richard D, Papadopoulou B, Ouellette M. ABC proteins of Leishmania. *J Bioenerg Biomembr*. 2001;33 6:469-74; doi: 10.1023/a:1012870904097.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11804188>.
  52. Leprohon P, Legare D, Girard I, Papadopoulou B, Ouellette M. Modulation of Leishmania ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot Cell*. 2006;5 10:1713-25; doi: 10.1128/EC.00152-06.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17030997>.
  53. BoseDasgupta S, Ganguly A, Roy A, Mukherjee T, Majumder HK. A novel ATP-binding cassette transporter, ABCG6 is involved in chemoresistance of Leishmania. *Mol Biochem Parasitol*. 2008;158 2:176-88; doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.12.007.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18243364>.
  54. Laffitte MN, Leprohon P, Papadopoulou B, Ouellette M. Plasticity of the Leishmania genome leading to gene copy number variations and drug resistance. *F1000Res*. 2016;5:2350; doi: 10.12688/f1000research.9218.1.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27703673>.

55. Vasudevan G, Ullman B, Landfear SM. Point mutations in a nucleoside transporter gene from *Leishmania donovani* confer drug resistance and alter substrate selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98 11:6092-7; doi: 10.1073/pnas.101537298. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11353834>.
56. Monte-Neto R, Laffitte MC, Leprohon P, Reis P, Frezard F, Ouellette M. Intrachromosomal amplification, locus deletion and point mutation in the aquaglyceroporin AQP1 gene in antimony resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9 2:e0003476; doi: 10.1371/journal.pntd.0003476. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25679388>.
57. Gueiros-Filho FJ, Beverley SM. Selection against the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) locus as a probe of genetic alterations in *Leishmania major*. *Mol Cell Biol*. 1996;16 10:5655-63; doi: 10.1128/mcb.16.10.5655. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8816478>.
58. Bhattacharya A, Leprohon P, Bigot S, Padmanabhan PK, Mukherjee A, Roy G, et al. Coupling chemical mutagenesis to next generation sequencing for the identification of drug resistance mutations in *Leishmania*. *Nat Commun*. 2019;10 1:5627; doi: 10.1038/s41467-019-13344-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31819054>.
59. Patino LH, Imamura H, Cruz-Saavedra L, Pavia P, Muskus C, Mendez C, et al. Major changes in chromosomal copy, gene expression and gene dosage driven by Sb(III) in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis*. *Sci Rep*. 2019;9 1:9485; doi: 10.1038/s41598-019-45538-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31263131>.
60. Marchand C, Antony S, Kohn KW, Cushman M, Ioanoviciu A, Staker BL, et al. A novel norindenoisoquinoline structure reveals a common interfacial inhibitor paradigm for ternary trapping of the topoisomerase I-DNA covalent complex. *Mol Cancer Ther*. 2006;5 2:287-95; doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0456. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16505102>.
61. Diaz-Gonzalez R, Perez-Pertejo Y, Pommier Y, Balana-Fouce R, Reguera RM. Mutational study of the "catalytic tetrad" of DNA topoisomerase IB from the hemoflagellate *Leishmania donovani*: Role of Asp-353 and Asn-221 in camptothecin resistance. *Biochem Pharmacol*. 2008;76 5:608-19; doi: 10.1016/j.bcp.2008.06.019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18655776>.
62. Rubin E, Pantazis P, Bharti A, Toppmeyer D, Giovanella B, Kufe D. Identification of a mutant human topoisomerase I with intact catalytic activity and resistance to 9-nitro-camptothecin. *J Biol Chem*. 1994;269 4:2433-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8300570>.

63. Li XG, Haluska P, Jr., Hsiang YH, Bharti AK, Kufe DW, Liu LF, et al. Involvement of amino acids 361 to 364 of human topoisomerase I in camptothecin resistance and enzyme catalysis. *Biochem Pharmacol.* 1997;53 7:1019-27; doi: 10.1016/s0006-2952(96)00899-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9174116>.
64. Seol Y, Zhang H, Pommier Y, Neuman KC. A kinetic clutch governs religation by type IB topoisomerases and determines camptothecin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109 40:16125-30; doi: 10.1073/pnas.1206480109. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22991469>.
65. Orr HA. Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nat Rev Genet.* 2009;10 8:531-9; doi: 10.1038/nrg2603. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19546856>.
66. Jensen NF, Stenvang J, Beck MK, Hanakova B, Belling KC, Do KN, et al. Establishment and characterization of models of chemotherapy resistance in colorectal cancer: Towards a predictive signature of chemoresistance. *Mol Oncol.* 2015;9 6:1169-85; doi: 10.1016/j.molonc.2015.02.008. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25759163>.

## Section 4: Discussion

En dépit de ses propriétés antitumorales, la CPT, un alcaloïde pentacyclique isolé de l'arbre *Camptotheca acuminata*, ne peut être utilisée compte tenu de sa forte toxicité aux doses thérapeutiques. Pour cette raison, plusieurs dérivés de la CPT présentant un plus grand index thérapeutique ont été synthétisés depuis les dernières années. Parmi ceux-ci, le TPT (Hycamtin®), un poison des TOP I, est homologué comme traitement contre les cancers des ovaires et des poumons, mais possède aussi une activité antileishmaniale (Prada et al., 2013). Le pouvoir antiparasitaire de ce médicament pourrait s'expliquer par le fait que les acides aminés (aa) du site actif de la TOP IB humaine et leishmaniale sont hautement conservés (Davies et al., 2006).

Toutefois, la résistance des cellules tumorales au TPT demeure un obstacle majeur à la réussite chimiothérapeutique (Klejewski et al., 2017). La raison de cette résistance pourrait s'expliquer en termes de mécanismes cellulaires provoquant l'efflux du médicament actif et/ou en termes de modification au niveau moléculaire de la cible médicamenteuse (Januchowski et al., 2013; Lei et al., 2020; Klejewski et al., 2017; Pan et al., 2013). Le cycle actif de l'enzyme est composé de trois étapes principales: (1) la liaison non covalente de la TOP IB à l'ADN; (2) le clivage de l'ADN et la formation d'un complexe protéine-ADN covalent; (3) la religation de l'ADN. C'est à la deuxième étape, lors de la formation d'une liaison covalente entre l'ADN et la TOP IB, que le TPT s'intercalant entre les bases d'ADN, prévient la religation et mène ainsi à l'apoptose (Kollmannsberger et al., 1999). Des modifications moléculaires à la TOP IB peuvent, d'une part, réduire la possibilité pour le TPT de se lier et former un complexe stable avec l'ADN et la protéine ou peuvent rendre l'enzyme moins performante et donc mener à une diminution de la sensibilité du TPT.

Considérant les difficultés présentes dans le traitement des tumeurs avec ce médicament et la propension du parasite à devenir rapidement résistant, nous avons d'abord développé une approche *in vitro* permettant d'étudier les impacts phénotypiques et génotypiques d'une exposition au TPT chez *L. infantum*. Nous avons utilisé un protocole d'augmentation progressive

de la concentration médicamenteuse fréquemment utilisé pour sélectionner des parasites résistants (Coderre et al., 1983 ; do Monte-Neto et al., 2011). Grâce à cette sélection, nous avons démontré que *Leishmania* peut développer graduellement une résistance à de fortes concentrations de TPT soit 16 x EC<sub>50</sub>. La plasticité du génome de *Leishmania* lui permet de répondre rapidement aux agressions environnementales par des modifications génomiques (aneuploïdie, polyploïdie, VNCs, SNPs), mais cet avantage biologique complique l'étude de leur résistance. C'est aux fins d'étudier la régulation génomique que nous avons séquencé les génomes complets des trois mutants résistants (TPT700.1, TPT700.2, TPT700.3).

En comparant les séquences de nos mutants résistants avec la souche sauvage, nous avons identifié plusieurs SNPs dans le gène de la gs TOP IB (LinJ.34.3220), hétérozygote pour TPT700.2<sup>G191A</sup> et homozygote pour TPT700.1<sup>F187Y</sup> et TPT700.3<sup>W242R</sup>. Nous savons que des SNPs non synonymes ont déjà été à l'origine d'une baisse de sensibilité à l'antimoine chez *Leishmania* (Douanne et al., 2020; Monte-Neto et al., 2015). Il est à noter qu'un unique SNP non synonyme est suffisant pour engendrer la résistance. À titre d'exemple, un changement Ala-533-Gly chez la TOP IB hu est suffisant pour rendre résistantes des cellules de leucémie lymphoblastique à la CPT (Tamura et al., 1991).

Afin de pouvoir caractériser l'effet possible de ces mutations sur la résistance, des approches simulatrices de dynamique moléculaire ont été réalisées. Présentement, il n'existe pas de modèle cristallographique de la TOP IB leishmaniale. Afin de palier à cet obstacle et étant donnée la forte homologie de certains domaines entre la TOP IB hu et la TOP IB Li, un modèle tridimensionnel de la protéine de *L. infantum* basé sur la TOP IB hu a été préparé. Chez l'humain, un seul gène code la TOP IB, tandis que chez le kinétoplastide, la TOP IB est, en fait, un hétérodimère, c'est-à-dire que deux gènes différents codent deux protéines différentes qui doivent s'assembler pour que la TOP IB soit fonctionnelle (Broccoli et al., 1999; Villa et al., 2002). De par cette différence, le site catalytique est divisé en deux chez *Leishmania*: une tétrade peptidique localisée au niveau de la grande sous-unité (Arg-314, Lys-352, Arg-410 et

His-453) et un résidu tyrosine, sur la petite sous-unité. L'intégrité du site catalytique est essentielle à l'activité enzymatique de la TOP IB.

Chez *Leishmania*, plusieurs mécanismes de résistance différents peuvent expliquer la résistance à un même médicament. De la même façon, plusieurs mécanismes de résistance peuvent aussi expliquer la résistance chez un même mutant (Coelho et al., 2012). Certains mécanismes moléculaires permettent d'atteindre un niveau plus haut de résistance. De plus, les combinaisons de différents mécanismes moléculaires, qui n'ont pas été tous caractérisés dans cette étude, impliqués pourraient possiblement avoir des effets synergiques/additifs sur la résistance totale de chacun des mutants. Ceci pourrait expliquer les différents niveaux de sensibilité observée par ordre décroissant: Sauvage > Phe-187-Tyr > Trp-232-Arg > Gly-191-Ala. Ces résultats ont été retrouvés chez les mutants sélectionnés avec pression médicamenteuse et validés *in vitro* avec les parasites surexprimant les allèles mutés de la TOP IB et *in silico* avec les simulations computationnelles.

### **Résistance par la diminution de l'activité enzymatique**

Un niveau d'activité enzymatique réduit de la TOP IB rend les parasites résistants au TPT (Marquis, Hardy et Olivier, 2005). Sachant que ce médicament ne se lie que faiblement à l'ADN seul et qu'il ne peut se lier à la TOP IB sans l'ADN, une diminution de l'affinité entre l'ADN et protéine engendrerait donc une baisse du nombre de duplex ADN- TOP IB ce qui réduirait les opportunités pour le TPT de s'y lier.

Chez TPT700.1, TPT700.2 et TPT700.3, des substitutions d'aa ont été identifiées au niveau du domaine principal de la grande sous-unité, une région peptidique essentielle aux fonctions minimales de clivage et de relaxation de l'ADN chez *L. donovani* (Bosedasgupta et al., 2008). Plus précisément, les substitutions d'aa chez les trois mutants, Phe-187-Tyr, Gly-191-Ala et Trp-242-Arg, ont toutes eu lieu près du site actif de l'enzyme. Sans l'intégrité de ce dernier, la liaison de l'ADN par l'enzyme est impossible. D'ailleurs, des résultats similaires ont déjà été

rapportés chez la TOP IA de *L. donovani* et chez la TOP IB de cellules humaines résistantes à la CPT (Marquis, Hardy et Olivier, 2005; Fiorani et al., 2009).

Chez le mutant TPT700.1, la substitution Phe-187 par une tyrosine pourrait empêcher indirectement le TPT de former un complexe tertiaire stable avec la protéine et l'ADN. Effectivement, Li et collaborateurs (1997) ont démontré qu'une substitution par une sérine de la Phe-361 humaine, correspondant à la Phe-187 chez TPT700.1, causerait la résistance à la CPT en engendrant une diminution significative du clivage de l'ADN (Li et al., 1997). Il a aussi été démontré qu'une substitution Gly-365-Ser chez la TOP IB hu, correspondant à Gly-191 chez TPT700.2, engendre la résistance à la CPT par une baisse du clivage de l'ADN (Arakawa, 2013). Des substitutions d'aa différentes chez TPT700.1 et TPT700.2, pourraient mener au même résultat soit la résistance au TPT par diminution de l'activité de la cible.

Il est aussi important de souligner que, chez les trois mutants, Lys-352 et Arg-410 perdent des liaisons hydrogènes dans le modèle *in silico*. Ces aa font partie de la tétrade catalytique de la gs TOP IB et sont responsables du relais d'un proton entre l'enzyme et l'extrémité 5' libre de l'ADN, crucial dans les étapes de clivage et religation de l'ADN (Diaz-González et al., 2008). Ces changements contribuent probablement aussi à la résistance, car les aa n'occupent plus la position qu'ils devraient occuper pour réussir le clivage de l'ADN (Ganguly et al., 2009).

### **Résistance par l'instabilité du site de liaison du TPT**

Le phénomène de résistance pourrait aussi être expliqué, en tout ou en partie, par le fait qu'une fois le duplex ADN-TOP IB formé, le site de liaison du TPT soit déstabilisé rendant la formation du complexe tertiaire ADN-TOP IB –TPT impossible.

Chez l'humain, Phe-361, correspondant à Phe-187 chez TPT700.1, ne forme pas de lien direct avec le TPT, mais permet de stabiliser le site de liaison du médicament. En effet, cet aa permet la rotation du groupement phosphodiester du brin d'ADN intact ce qui rend ainsi possible l'intercalation du TPT entre deux bases pour former un complexe tertiaire stable avec l'enzyme

et l'ADN (Staket et al., 2002). Phe-187-Tyr pourrait donc aussi rendre inaccessible le site de liaison du TPT.

Chez la TOP IB hu, la Gly-365 se trouve près de l'aa Arg-364 qui coordonne la position de l'Asp-533 grâce à son groupement  $\epsilon$ -nitrogène, une interaction essentielle pour la fixation du TPT au complexe ADN-TOP IB. En effet, l'Asp-533 crée l'unique pont hydrogène stabilisant avec le groupe 20(S)-hydroxyle des dérivés de la CPT (Staker et al., 2002). Il est donc probable qu'une substitution de la Gly-191 chez TPT700.2, l'aa équivalent à Gly-365 chez l'humain, induise un certain niveau de résistance par l'intermédiaire d'une interaction avec des aa qui permettent la liaison directe du TPT. Cependant, cette substitution chez TPT700.2 n'est probablement pas l'unique raison de la perte du pouvoir de liaison avec le TPT. En effet, nous avons également observé une perte du pont hydrogène entre Asp-353 et Lys-352 et ce, chez les trois mutants. Puisque Asp-353 est l'équivalent de l'Asp-533 chez l'humain, cette perte de H<sup>+</sup> modifie probablement l'affinité du TPT au site de liaison.

Aucune revue de littérature n'est disponible en ce qui concerne la substitution qui a eu lieu chez TPT700.3. Cependant, étant donné que le tryptophane est un aa unique en termes de chimie et de taille, nous savons qu'une substitution de celui-ci par n'importe quel autre acide aminé peut engendrer des conséquences importantes sur la structure/fonction de la protéine (Betts et Russel, 2003).

Aucun chromosome surnuméraire n'a été détecté, mais une perte de copie pour le chromosome 12 chez TPT700.3 a été identifiée. Aussi, chez TPT700.1, TPT700.2 et TPT700.3, le chromosome 32 est passé de trisomique à disomique. Peu de changement au niveau du nombre de chromosomes est un résultat inattendu, puisque le parasite utilise préférentiellement ce type de régulation génique pour devenir résistant à un médicament (do Monte-Neto et al., 2011). Une perte de chromosome pourrait diminuer l'expression d'un canal qui permet l'entrée du médicament à l'intérieur du parasite, comme c'est le cas avec le canal

AQP1 (chromosome 31) dans la résistance au Sb(V) (Monte-Neto et al., 2015). Mais, aucune littérature ne rapporte la présence d'un tel canal sur les chromosomes 12 et 32.

Les résultats présentés dans ce papier fournissent des informations sur les mécanismes de résistance *in vitro* déployés par les promastigotes *L. infantum* afin de survivre au TPT. Les connaissances acquises lors de nos recherches sur les mécanismes de résistance de ce parasite pourraient permettre d'améliorer le design moléculaire des futurs inhibiteurs des TOPs. En incluant des études de développement de la résistance *in vitro* dans les premiers stades de recherche d'un nouveau médicament, il serait possible de retarder l'émergence de la résistance (Gamo et al., 2010). Concrètement, la TOP IB du parasite ne fait qu'un seul lien avec le TPT. Il pourrait être donc souhaitable d'augmenter le nombre de liens que fait le médicament avec l'enzyme. Ainsi, le site de liaison du médicament serait plus stable et il en coûterait probablement plus au parasite pour engendrer des hauts niveaux de résistance. Aussi, de nouveaux composés pourraient être synthétisés et cibleraient les protéines mutantes résistantes du TPT afin d'offrir une thérapie alternative en cas de résistance à celui-ci. Dans la même optique, plusieurs protéines qui sont impliquées dans une même voie métabolique pourraient être ciblées (Ferreira et Andricopulo, 2014). Les résultats de notre étude pourraient aussi améliorer les techniques diagnostiques en ajoutant des marqueurs de résistance. Ainsi, il serait possible de déterminer le profil de susceptibilité aux médicaments des parasites et ainsi de mettre en place un plan thérapeutique approprié (Hefnawy et al., 2017). Cette étude souligne aussi l'importance du choix de la méthodologie. Effectivement, c'est avec le séquençage du génome complet du parasite qu'il a été possible de mettre en évidence le seul SNP dans la cible du TPT qui, comme préalablement mentionné, est à lui seul capable d'engendrer des hauts niveaux de résistance.

Cependant, notre étude présente certaines limites qui réduisent l'étendue de la généralisation des résultats obtenus. Premièrement, le microenvironnement des populations parasitaires en culture diffère grandement de celui retrouvé dans les corps des hôtes ce qui affecte notamment la biodisponibilité et le métabolisme du médicament. De sorte que, pour une

même dose, la concentration de TPT dans laquelle baignent les parasites en culture est probablement plus forte que celle qui entoure les parasites dans le corps d'un humain ou d'un chien, puisque le médicament y est assujéti à des variations physiologiques telles que des changements de pH ou de température. Bien que nos résultats aient démontré qu'avec un faible coût d'adaptation, *Leishmania* peut devenir résistant au TPT, il est possible qu'en présence d'une concentration plus faible du médicament, les mécanismes de réparation déjà présents chez le parasite suffisent à la survie de celui-ci. Par exemple, il a été démontré qu'une augmentation de la production de la tripanothione, un puissant antioxydant constitutif retrouvé uniquement chez les Trypanosomatidae permettant de neutraliser les dérivés réactifs de l'oxygène produit par les macrophages, diminue la susceptibilité du parasite à l'arsenic, un métal lourd dont la structure est très proche de celle de l'antimoine (Mukhopadhyay et al., 1996). Le coût d'adaptation y est encore plus bas, puisque l'intégrité du génome est préservée.

Deuxièmement, puisque notre étude se concentre sur des promastigotes maintenus en laboratoire et il serait aussi intéressant de réaliser la sélection médicamenteuse du TPT avec des souches d'isolats cliniques. Cependant, il est difficile de déterminer avec exactitude la proportion des échecs au traitement qui est due à la résistance de *Leishmania* aux médicaments. Plusieurs facteurs, au-delà de la résistance, peuvent expliquer les non-guérisons et les rechutes au traitement : l'observance du patient, une co-infection avec le virus de l'immunodéficience humaine, la qualité inadéquate des ingrédients actifs de la thérapie, etc. D'ailleurs, une étude a démontré que les jeunes de sexe masculin atteints de leishmaniose viscérale étaient plus à risque de développer des rechutes aux traitements à la miltéfosine suggérant des différences dans la réponse immunitaire (Ostyn et al., 2014). Il se peut donc qu'un de ces facteurs entraîne l'échec au traitement, et ce, même en présence de parasites sensibles au médicament. Ces parasites peuvent parfois être considérés à tort comme résistants. Le contraire est aussi vrai : des parasites résistants considérés susceptibles, puisque la technique diagnostique pour caractériser la résistance sur le terrain n'est pas standardisée (Ponte-Sucre et al., 2017). Effectivement, une fois récoltés à partir d'un échantillon du patient, les parasites sont mis en culture sous forme de promastigotes le plus souvent. Ainsi, les

parasites de l'hôte sont soumis brusquement à un nouvel environnement ce qui peut faire varier l'aneuploïdie de ceux-ci (Mannaert et al., 2012). Pour cette raison, les gènes de résistance, auparavant enrichis, peuvent être perdus une fois l'isolation *in vitro* effectuée. Idéalement, l'ADN du parasite devrait être séquencé directement à partir du patient, sans culture préalable, ce qui n'est pas sans obstacle technique, puisque la quantité d'ADN parasitaire est de beaucoup inférieure à l'ADN humain (Ponte-Sucre et al., 2017).

Troisièmement, les résultats ne peuvent être généralisés aux amastigotes, la forme intracellulaire du parasite que l'on retrouve dans l'hôte vertébré. Effectivement, les amastigotes semblent plus sensibles aux poisons des TOPs IB que les promastigotes prévenant possiblement le développement de la résistance (Prada et al., 2013). Cependant, si les amastigotes sont en mesure de développer la résistance au TPT, le coût d'adaptation pourrait être plus important en raison de leur plus grande sensibilité à ce médicament. D'ailleurs, la prochaine étape du projet serait de réaliser la sélection médicamenteuse *ex vivo* à l'aide du TPT sur des amastigotes dans des macrophages.

Étant donné que le TPT serait proposé comme médicament de deuxième ligne, c'est-à-dire en cas d'échec au traitement usuel, il serait aussi intéressant de refaire une sélection de parasites résistants au TPT en utilisant des souches déjà résistantes à l'antimoine pentavalent, la miltéfosine, l'amphotéricine B, la pentamidine et/ou la paromomycine. Ces manipulations supplémentaires permettraient peut-être d'obtenir des parasites multirésistants et pourraient possiblement mettre en évidence un mécanisme de résistance croisée. Effectivement, dans cette étude, un SNP homozygote a été identifié chez les trois mutants résistants (TPT700.1, TPT700.2 et TPT700.3) dans le gène de la TOP II (LinJ.28.2450), une enzyme qui semblerait être une des cibles de la pentamidine (Cortazar et al., 2007).

## Section 5: Conclusion

L'absence d'amplification et délétion ainsi que des variations mineures du nombre de chromosomes pourrait signifier qu'une mutation ponctuelle dans le gène de la TOP IB serait le mécanisme de résistance le plus puissant, mais aussi suffisant, pour permettre aux parasites de survivre. Bien que le TPT possède un fort pouvoir antileishmaniale, étant donné les résultats de cette étude, celui-ci constituerait un modèle d'étude des mécanismes de résistance de *Leishmania* plutôt qu'une option thérapeutique de choix. Cependant, les mécanismes de résistance *in vitro* ne se traduisent pas toujours en résistance clinique. Des études cliniques sont donc essentielles afin de comprendre l'implication des mutations génomiques caractérisées sur le terrain. Présentement, le TPT n'est pas homologué contre la leishmaniose, il est donc impossible d'en étudier directement les impacts cliniques. Pour y pallier, en partie, il serait intéressant de vérifier nos résultats en utilisant un modèle animal. Une combinaison d'études sur plusieurs différentes espèces animales (rongeurs, chiens et primates non humains) serait souhaitable étant donné qu'aucun d'entre eux n'arrive à recréer parfaitement la maladie observée chez l'humain (Loría-Cervera et Andrade-Narváez, 2014). Dans un autre ordre d'idée, le TPT pourrait aussi être utilisé en combinaison avec un autre médicament actuellement utilisé pour traiter la leishmaniose. Effectivement, les probabilités qu'un parasite survive à deux médicaments ayant des mécanismes d'action différents sont plus faibles, puisqu'il est moins probable que le parasite possède un mécanisme de résistance commun aux deux agents thérapeutiques. Toutefois, cette proposition assume que les mécanismes d'action sont connus et caractérisés pour chacun des médicaments, ce qui n'est pas le cas. Cependant, étant donné l'urgence de la situation, ce type d'étude pourrait retarder la mise en marché de nouveaux médicaments. Pour cette raison, il serait préférable d'étudier les mécanismes d'action des médicaments à repositionner en parallèle aux essais cliniques sur les animaux. Finalement, il n'est souvent pas possible d'augmenter la dose du médicament ou d'augmenter la fréquence d'administration en cas de résistance, car ceux actuellement utilisés présentent un index thérapeutique très faible aux doses usuelles (Sundar et Chakravarty, 2010). Proposer de nouvelles options thérapeutiques est donc essentiel afin de contrôler la leishmaniose.

## Bibliographie

- Aflatoonian, M. R., Sharifi, I., Aflatoonian, B., Bamorovat, M., Heshmatkhah, A., Babaei, Z., Almani Nejad, P. G., Mohammadi, M. A., Salarkia, E., Afshar, A. A., Sharifi, H., Sharifi, F., Khatami, M., Arefinia, N., Fekri, A., Farajzadeh, S., Khamesipour, A., Mohebali, M., Gouya, M. M., ...Varma, R. S. (2019). Associated-risk determinants for anthroponotic cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate: A cohort study in Iran. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *13*(6), e0007423. <https://doi:10.1371/journal.pntd.0007423>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. (4<sup>e</sup> éd.). Garland Science.
- Alonso, F., Vasilatis, D., Veluvolu, S., Willcox, J., Scorza, B., Petersen, C., Kol, Amir. (2020). Canine leishmaniasis in Northern California-A case report. *Veterinary Clinical Pathology*, *50*, 71-75. doi: [org/10.1111/vcp.12956](https://doi.org/10.1111/vcp.12956)
- Al-Salem, W. S., Pigott, D. M., Subramaniam, K., Haines, L., Kelly-Hope, L., Molyneux, D. H., Hay, I. S. et Acosta-Serrano, A. (2016). Cutaneous Leishmaniasis and Conflict in Syria. *Emerging Infectious Diseases*, *22*(5), 931-933. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2205.160042>.
- Amato, V. S., Tuon, F. F., Bacha, H. A., Neto, V. A. et Nicodemo, A. C. (2008). Mucosal leishmaniasis. *Acta Tropica*, *105*(1), 1–9. doi:10.1016/j.actatropica.2007.08.003
- Andrade-Neto, V. V., Ferreira Cunha-Junior, E., dos Santos Faioes, V., Pereira Martins, T., Lopes Silva, R., Laura Leon, L. et Caio Torres-Santos, E. (2018). Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. *Frontiers in Bioscience*, *23*, 967-996. doi : 10.2741/4629
- Arnò, B., D'Annessa, I., Tesauro, C., Zuccaro, L., Ottaviani, A., Knudsen, B., Fiorani, P. et Desideri, A. (2013). Replacement of the Human Topoisomerase Linker Domain with the Plasmodial Counterpart Renders the Enzyme Camptothecin Resistant. *PLoS ONE*, *8*(7), e68404. doi:10.1371/journal.pone.0068404
- Arakawa, Y., Ozaki, K., Okawa, Y., & Yamada, H. (2013). Three missense mutations of DNA topoisomerase I in highly camptothecin-resistant colon cancer cell sublines. *Oncology Reports*, *30*, 1053-1058. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2594>
- Aronson, N., Herwaldt, B. L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., Carvalho, E., Ephros, M., Jeronimo, S., & Magill, A. (2017). Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the

- American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 96(1), 24–45. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-84256>
- Badaro, R., Jones, T. C., Carvalho, E. M., Sampaio, D., Reed, S. G., A., Barral, A., Teixeira, R. et Johnson, W. D. (1986). New Perspectives on a Subclinical Form of Visceral Leishmaniasis, *The Journal of Infectious Diseases*, 154 (6), 1003–1011. doi : 10.1093/infdis/154.6.1003
- Bhandari, V., Sundar, S., Dujardin, J. C., & Salotra, P. (2014). Elucidation of Cellular Mechanisms Involved in Experimental Paromomycin Resistance in *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(5), 2580–2585. doi:10.1128/aac.01574-13
- Bailey, H. et Bishop, J.W. (1959). Leishman-Donovan bodies and donovaniasis. *The British Journal of Venereal Diseases*, (35)8, 8-9.
- Bailey, F., Mondragon-Shem, K., Haines, L. R., Olabi, A., Alorfi, A., Ruiz-Postigo, J. A., Alvar, J., Hotez, P., R. Adams, E., Vélez, D. I., Al-Salem, W., Eaton, J., Acosta-Serrano, A. et Molyneux, D. H. (2019). Cutaneous leishmaniasis and co-morbid major depressive disorder: A systematic review with burden estimates. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(2), e0007092. doi:10.1371/journal.pntd.0007092
- Balaña-Fouce, R., Álvarez-Velilla, R., Fernández-Prada, C., García-Estrada, C. et Reguera, R. M. (2014). Trypanosomatids topoisomerase re-visited. New structural findings and role in drug discovery. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(3), 326-337. doi:10.1016/j.ijpddr.2014.07.006
- Baker, N., Glover, L., Munday, J. C., Aguinaga Andrés, D., Barrett, M. P., de Koning, H. P., & Horn, D. (2012). Aquaglyceroporin 2 controls susceptibility to melarsoprol and pentamidine in African trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(27), 10996–11001. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202885109>
- Bakshi, R. P. et Shapiro, T. A. (2004). RNA interference of *Trypanosoma brucei* topoisomerase IB: both subunits are essential. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 136(2), 249–255. doi:10.1016/j.molbiopara.2004.04.006
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P. et Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, 24(7), 324–330. doi:10.1016/j.pt.2008.04.001
- Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1097–1106. doi:10.1016/j.ijpara.2007.04.003

- Bates, P. A. (2018). Revising *Leishmania's* life cycle. *Nature Microbiology*, 3(5), 529–530. doi:10.1038/s41564-018-0154-2
- Bates, P. A. et Dwyer, D. M. (1987). Biosynthesis and secretion of acid phosphatase by *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 26(3), 289–296. doi:10.1016/0166-6851(87)90081-8
- Betts and Russell. (2003). Chapter 14 : Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions, *Bioinformatics for Geneticists*, I.C. Gray eds.
- Beverley S. M. (1991). Gene amplification in *Leishmania*. *Annual review of microbiology*, 45, 417–444. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.45.100191.002221>
- Bispo, A. J. B., Almeida, M. L. D., de Almeida, R.P., Bispo Neto, J., de Oliveira Brito et A.V., França, C. M. (2020) Pulmonary involvement in human visceral leishmaniasis: Clinical and tomographic evaluation. *PLoS ONE* 15(1): e0228176. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228176>
- Bodley, A. L. et Shapiro, T. A. (1995). Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on trypanosomes and *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(9), 3726–3730. doi:10.1073/pnas.92.9.3726 Bogitsh,
- Bosedasgupta, S., Das, B. B., Sengupta, S., Ganguly, A., Roy, A., Tripathi, G., & Majumder, H. K. (2008). Amino acids 39–456 of the large subunit and 210–262 of the small subunit constitute the minimal functionally interacting fragments of the unusual heterodimeric topoisomerase IB of *Leishmania*. *Biochemical Journal*, 409(2), 481–489. doi:10.1042/bj20071358
- Bosedasgupta, S. Ganguly, A., Das, B. B., A. Roy, A., Khalkho, N. V. M. et Majumder, H. K. (2008). The Large Subunit of *Leishmania* Topoisomerase I Functions as the 'Molecular Steer' in Type IB Topoisomerase. *Mol. Microbiol.*, 67(31). doi: 10.1111/j.13652958.2007.06002.x.
- Boyd, J. (1966). The Leishman Centenary Oration delivered at the Royal Army Medical College. *Journal of the royal army medical corps*, 10, 4-16.
- British Veterinary Association. (2018). *Dog rescuers risk harming UK dogs and owners by importing dangerous exotic diseases into the country, vets warn*. Repéré à <https://www.bva.co.uk/news-campaigns-and-policy/newsroom/news-releases/dog-rescuers-risk-harming-uk-dogs-and-owners-byimporting-dangerous-exotic-diseases-into-the-country,-vets-warn/>
- Brochu, C., Haimeur, A. et Ouellette, M. (2004). The heat shock protein HSP70 and heat

shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite *leishmania*. *Cell stress & chaperones*, 9(3), 294–303.  
<https://doi.org/10.1379/csc-15r1.1>

- Broccoli, S., Marquis, J.-F., Papadopoulou, B., Olivier, M., & Drolet, M. (1999). Characterization of a *Leishmania donovani* gene encoding a protein that closely resembles a type IB topoisomerase. *Nucleic Acids Research*, 27(13), 2745–2752. doi:10.1093/nar/27.13.2745
- Bryceson, A. (2001). A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Tropical Medicine and International Health*, 6(11), 928–934. doi:10.1046/j.1365-3156.2001.00795.x
- Burza, S., Croft, S. L. et Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *The Lancet*, 392(10151), 951–970. doi:10.1016/s01406736(18)31204-2
- Campos, J. H., & Costa, F. A. (2014). Participation of ticks in the infectious cycle of canine visceral leishmaniasis, in Teresina, Piauí, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 56(4), 297–300. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652014000400005>
- Carvalho, K.S.S., da Silva Júnior, W.J., da Silveira Ragueira Neto, M. et al. Application of next generation sequencing (NGS) for descriptive analysis of 30 genomes of *Leishmania infantum* isolates in Middle-North Brazil. *Sci Rep* 10, 12321 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68953-9>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020). *Parasites- Leishmania Resources for Health Professionals*. Repéré à [https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health\\_professionals/index.html](https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html)
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021). Resources for Health Professionals. Repéré à [https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health\\_professionals/index.html](https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html)
- Ceva. (2021). *LEISH-TEC*. Repéré à <https://www.ceva.com.br/Produtos/Lista-de-Produtos/LEISH-TEC>
- Chakravarty, J. et Sundar, S. (2010). Drug resistance in leishmaniasis. *Journal of global infectious diseases*, 2(2), 167–176. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62887>
- Chemocare. (2020). *Topotecan*. Repéré à [http://chemocare.com/chemotherapy/drug\\_info/Topotecan.aspx](http://chemocare.com/chemotherapy/drug_info/Topotecan.aspx)
- Clarke, C., Bradley, K., Wright, J. et Glowicz, J. (2013). Emergence of Autochthonous

- Cutaneous Leishmaniasis in Northeastern Texas and Southeastern Oklahoma. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(1): 157–161. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0717
- Clayton, C. (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *The Embo Journal*, 21(8), 1881–1888. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.8.1881>
- Clayton, C., & Shapira, M. (2007). Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Molecular and biochemical parasitology*, 156(2), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.07.007>
- Coderre, J. A., Beverley, S. M., Schimke, R. T., & Santi, D. V. (1983). Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(8), 2132–2136. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.8.2132>
- Coelho, A. C., Beverley, S. M. et Cotrim, P. C. (2003). Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 130(2), 83–90. doi:10.1016/s0166-6851(03)00162-2
- Coelho, A. C., Yamashiro-Kanashiro, E. H., Bastos, S. F., Mortara, R. A., & Cotrim, P. C. (2006). Intracellular location of the ABC transporter PRP1 related to pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 150(2), 378–383. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.08.013
- Coelho, A. C., Boisvert, S., Mukherjee, A., Leprohon, P., Corbeil, J., & Ouellette, M. (2012). Multiple Mutations in Heterogeneous Miltefosine-Resistant *Leishmania major* Population as Determined by Whole Genome Sequencing. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2), e1512. doi:10.1371/journal.pntd.0001512
- Cojean, S., Houzé, S., Haouchine, D., Huteau, F., Lariven, S., Hubert, V., Michard, F., Bories, C., Pratlong, F., Le Bras, J., Loiseau, P. M., & Matheron, S. (2012). *Leishmania* resistance to miltefosine associated with genetic marker. *Emerging infectious diseases*, 18(4), 704–706. <https://doi.org/10.3201/eid1804.110841>
- Colombo, F. A., Odorizzi, R. M. F. N., Laurenti, M. D., Galati, E. A. B., Canavez, F. et Pereira Chioccola, V. L. (2011). Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitology Research*, 109(2), 267–274. doi:10.1007/s00436-010-2247-6
- Cortazar, T.M., Coombs, G.H., et Walker, J. (2007). *Leishmania panamensis*: Comparative

- inhibition of nuclear DNA topoisomerase II enzymes from promastigotes and human macrophages reveals anti-parasite selectivity of fluoroquinolones, flavonoids and pentamidine. *Exp. Parasitol.* 116, 475–482.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.02.018>
- Coutinho, M. T. Z. et Linardi, P. M. (2007). Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Veterinary Parasitology*, 147(34), 320–325. doi:10.1016/j.vetpar.2007.04.008
- Cretaiio, E., Pattarello, L., Fontebasso, Y., Benedetti, P. et Losasso, C. (2007). Human DNA topoisomerase IB: Structure and functions. *The Italian journal of biochemistry* 56(2), 91102.
- Croft, S. L., Sundar, S. et Fairlamb, A. H. (2006). Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 111–126. doi:10.1128/cmr.19.1.111-126.2006
- Cruz, A. K. et Freitas-Castro, F. (2019). Genome and transcriptome analyses of *Leishmania spp.*: opening Pandora’s box. *Current Opinion in Microbiology*, 52, 64–69. doi:10.1016/j.mib.2019.05.004
- Cinelli, M. A. (2018). Topoisomerase 1B poisons: Over a half-century of drug leads, clinical candidates, and serendipitous discoveries. *Medicinal Research Reviews*, 39(4), 1294-1337. <https://doi.org/10.1002/med.21546>
- Dantas-Torres, F. (2011). Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends in Parasitology*, 27(4), 155-159. doi : <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.12.006>
- Das, B. B., Sengupta, T., Ganguly, A. et Majumder, H. K. (2006). Topoisomerases of kinetoplastid parasites: why so fascinating? *Molecular Microbiology*, 62(4), 917–927. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05428.x
- Davidson, R. N., den Boer, M. et Ritmeijer, K. (2009). Paromomycin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(7), 653–660. doi:10.1016/j.trstmh.2008.09.008
- David, C. V. et Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic therapy*, 22(6), 491–502. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x>
- Davies, D. R., Mushtaq, A., Interthal, H., Champoux, J. J. et Hol, W. G. (2006). The Structure of the Transition State of the Heterodimeric Topoisomerase I of *Leishmania donovani* as a Vanadate Complex with Nicked DNA. Repéré à <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283606000519>

- De Meeûs, T., McCoy, K. D., Prugnolle, F., Chevillon, C., Durand, P., Hurtrez-Boussès, S., & Renaud, F. (2007). Population genetics and molecular epidemiology or how to “débusquer la bête.” *Infection, Genetics and Evolution*, 7(2), 308–332. doi:10.1016/j.meegid.2006.07.003
- Díaz González, R., Pérez Pertejo, Y., Redondo, C. M., Pommier, Y., Balaña-Fouce, R. et Reguera, R. M. (2007). Structural insights on the small subunit of DNA topoisomerase I from the unicellular parasite *Leishmania donovani*. *Biochimie*, 89(12), 1517–1527. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.07.015>
- Díaz González, R., Pérez Pertejo, Y., Ordóñez, D., Balaña-Fouce, R. et Reguera, R. M. (2007). Deletion study of DNA topoisomerase IB from *Leishmania donovani*: searching for a minimal functional heterodimer. *PloS one*, 2(11), e1177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001177>
- Díaz-González, R., Pérez-Pertejo, Y., Pommier, Y., Balaña-Fouce, R. et Reguera, R. M. (2008). Mutational study of the “catalytic tetrad” of DNA topoisomerase IB from the hemoflagellate *Leishmania donovani*: Role of Asp-353 and Asn-221 in camptothecin resistance. *Biochemical Pharmacology*, 76(5), 608–619. doi:10.1016/j.bcp.2008.06.019
- Do Monte-Neto, R. L., Coelho, A. C., Raymond, F., Légaré, D., Corbeil, J., Melo, M. N., Frézard, F. et Ouellette, M. (2011). Gene expression profiling and molecular characterization of antimony resistance in *Leishmania amazonensis*. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(5), e1167. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001167>
- Do Monte-Neto, R., Laffitte, M. C., Leprohon, P., Reis, P., Frézard, F. et Ouellette, M. (2015). Intrachromosomal amplification, locus deletion and point mutation in the aquaglyceroporin AQP1 gene in antimony resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis*. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(2), e0003476. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003476>
- Douanne, N., Wagner, V., Roy, G., Leprohon, P., Ouellette, M. et Fernandez-Prada, C. (2020). MRPA-independent mechanisms of antimony resistance in *Leishmania infantum*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. doi:10.1016/j.ijpddr.2020.03.003
- Dougall, A. M., Alexander, B., Holt, D. C., Harris, T., Sultan, A. H., Bates, P. A., Rose, K. et Walton, S. F. (2011). Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *International Journal for Parasitology*, 41(5), 571–579. doi:10.1016/j.ijpara.2010.12.008
- Dos Santos, P. L., de Oliveira, F. A., Santos, M. L., Cunha, L. C., Lino, M. T., de Oliveira, M. F., Bomfim, M. O., Silva, A. M., de Moura, T. R., de Jesus, A. R., Duthie, M. S., Reed, S. G. et de Almeida, R. P. (2016). The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with

Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(1), e0004375. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004375>

Dostálová, A. et Volf, P. (2012). *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites and Vectors*, 5(1), 276. doi:10.1186/1756-3305-5-276

Douvoyiannis, M., Khromachou, T., Byers, N., Hargreaves, J., W. Murray, H. (2014). Cutaneous Leishmaniasis in North Dakota. *Clinical Infectious Diseases*, 59(5), 73-75. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu386>

Downing, T., Imamura, H., Decuypere, S., Clark, T. G., Coombs, G. H., Cotton, J. A., Hilley, J. D., de Doncker, S., Maes, I., Mottram, J. C., Quail, M. A., Rijal, S., Sanders, M., Schönian, G., Stark, O., Sundar, S., Vanaerschot, M., Hertz-Fowler, C., Dujardin, J. C. et Berriman, M. (2011). Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome research*, 21(12), 2143–2156. <https://doi.org/10.1101/gr.123430.111>

Downing, T., Stark, O., Vanaerschot, M., Imamura, H., Sanders, M., Decuypere, S., de Doncker, S., Maes, I., Rijal, S., Sundar, S., Dujardin, J. C., Berriman, M. et Schönian, G. (2012). Genome-wide SNP and microsatellite variation illuminate population-level epidemiology in the *Leishmania donovani* species complex. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 12(1), 149-159. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.11.005>

Ellis, J. et Crampton, J. (1988). Characterisation of a simple, highly repetitive DNA sequence from the parasite *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 29(1), 9–17. doi:10.1016/0166-6851(88)90114-4

Caroline R. Espada, Andreia Albuquerque-Wendt, Valentín Hornillos, Eva Gluenz, Adriano C. Coelho, Silvia R. B. Uliana. (2021). Ros3 (Lem3p/CDC50) Gene Dosage Is Implicated in Miltefosine Susceptibility in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Clinical Isolates and in *Leishmania (Leishmania) major*. *ACS Infectious Diseases*, 7 (4), 849-858. DOI: 10.1021/acsinfecdis.0c00857

European Centre for Disease Prevention and Control. (2020). *Phlebotomine sand flies - Factsheet for experts*. Repéré à <https://www.ecdc.europa.eu/en/diseasevectors/facts/phlebotomine-sand-flies>

European Medicines Agency. (2020). *Canileish*. Repéré à <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/letifend>

European Medicines Agency. (2020). *Letifend*. Repéré à <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/letifend>

- Ferreira, M. G. P. A., Fattori, K. R., Souza, F. et Lima, V. M. F. (2009). Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania spp.* *Veterinary Parasitology*, 165(1-2), 150–154. doi:10.1016/j.vetpar.2009.06.026
- Ferreira, R. S., & Andricopulo, A. D. (2014). Structure-based drug design to overcome drug resistance: challenges and opportunities. *Current pharmaceutical design*, 20(5), 687–693. <https://doi.org/10.2174/138161282005140214161949>
- Fernandez-Prada, C., Vincent, I. M., Brotherton, M. C., Roberts, M., Roy, G., Rivas, L., Leprohon, P., Smith, T. K. et Ouellette, M. (2016). Different Mutations in a P-type ATPase Transporter in *Leishmania* Parasites are Associated with Cross-resistance to Two Leading Drugs by Distinct Mechanisms. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(12), e0005171. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005171>
- Ferro, C., Cárdenas, E., Corredor, D., Morales, A. et Munstermann, L. E. (1998). Life Cycle and Fecundity Analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae). *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(2), 195–199. doi:10.1590/s0074-02761998000200011
- Fiorani, P., Bruselles, A., Falconi, M., Chillemi, G., Desideri, A. et Benedetti, P. (2003). Single mutation in the linker domain confers protein flexibility and camptothecin resistance to human topoisomerase I. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 43268-43275. doi:10.1074/jbc.M303899200
- Fiorani, P., Tesauro, C., Mancini, G., Chillemi, G., D'Annessa, I., Graziani, G., Tentori, L., Muzi, A. et Desideri, A. (2009) Evidence of the crucial role of the linker domain on the catalytic activity of human topoisomerase I by experimental and simulative characterization of the Lys681Ala mutant. *Nucleic Acids Research*, 37(2), 6849-6858. doi:10.1093/nar/gkp669.
- Froelich-Ammon, S. J. et Osheroff, N. (1995). Topoisomerase Poisons: Harnessing the Dark Side of Enzyme Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 270(37), 21429–21432. doi:10.1074/jbc.270.37.21429
- Gama, M. E. A., Costa, J. M. L., Gomes, Castro, C. M. et Corbett, C. E. P. (2004). Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(8), 889-893. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000800018>
- Gamo, F. J., Sanz, L. M., Vidal, J., de Cozar, C., Alvarez, E., Lavandera, J. L., Vanderwall, D. E., Green, D. V., Kumar, V., Hasan, S., Brown, J. R., Peishoff, C. E., Cardon, L. R. et Garcia-Bustos, J. F. (2010). Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature*, 465(7296), 305–310. <https://doi.org/10.1038/nature09107>
- Garapati, P., Pal, B., Siddiqui, N. A., Bimal, S., Das, P., Murti, K. et Pandey, K. (2018).

- Knowledge, stigma, health seeking behaviour and its determinants among patients with post kala-azar dermal leishmaniasis, Bihar, India. *PLOS ONE*, 13(9), e0203407. doi:10.1371/journal.pone.0203407
- Ganguly, A., Sengupta, S., BoseDasgupta, S., Roy, A., & Majumder, H. K. (2009). Mutational studies reveal lysine 352 on the large subunit is indispensable for catalytic activity of bi-subunit topoisomerase I from *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 165(1), 57–66. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.01.002
- Gossage, S. M., Rogers, M. E. et Bates, P. A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology*, 33(10), 1027–1034. doi:10.1016/s00207519(03)00142-5
- Gourbal, B., Sonuc, N., Bhattacharjee, H., Legare, D., Sundar, S., Ouellette, M., Rosen, B. et Mukhopadhyay, R. (2004). Drug Uptake and Modulation of Drug Resistance in *Leishmania* by an Aquaglyceroporin. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31010–31017. doi:10.1074/jbc.m403959200
- Haldar, A.K., Sen, P. et Roy, S. (2011). Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. *Molecular Biology International*. Doi : <https://doi.org/10.4061/2011/571242>
- Haile, S. et Papadopoulou, B. (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Current Opinion in Microbiology*, 10(6), 569–577. doi:10.1016/j.mib.2007.10.001
- Handler, M. Z., Patel, P. A., Kapila, R., Al-Qubati, Y., & Schwartz, R. A. (2015). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73(6), 897–910. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.08.051>
- Hartmann, J. T. et Lipp, H.-P. (2006). Camptothecin and podophyllotoxin derivatives: inhibitors of topoisomerase I and II - mechanisms of action, pharmacokinetics and toxicity profile. *Drug Safety*, 29(3), 209-30. doi: 10.2165/00002018-200629030-00005.
- Hashiguchi, Y., Gomez, E. L., Kato, H., Martini, L. R., Velez, L. N. et Uezato, H. (2016). Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Tropical Medicine and Health*, 44(1). doi:10.1186/s41182-016-0002-0
- Hassan, M. M., Osman, O. F., El-Raba'a, F. M., Schallig, H. D. et Elnaiem, D.-E. A. (2009). Role of the domestic dog as a reservoir host of *Leishmania donovani* in eastern Sudan. *Parasites and Vectors*, 2(1), 26. doi:10.1186/1756-3305-2-26

- Hefnawy A, Berg M, Dujardin JC, De Muylder G. Exploiting Knowledge on *Leishmania* Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs. *Trends Parasitol.* 2017;33 3:162-74;doi:10.1016/j.pt.2016.11.003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27993477>.
- Hertzberg, R. P., Caranfa, M. J. et Hecht, S. M. (1989). On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry*, 28(11), 4629–4638. <https://doi.org/10.1021/bi00437a018>
- Hendry, K. A. K. et Vickerman, K. (1988). The requirement for epimastigote attachment during division and metacyclogenesis in *Trypanosoma congolense*. *Parasitology Research*, 74(5),403–408. doi:10.1007/bf00535138
- Hommel, M. (1999). Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. *Journal of Infection*, 39(2), 101–111. doi:10.1016/s0163-4453(99)90000-2
- Institut national de santé publique du Québec. (2012). *Les années de vie corrigées de l'incapacité : un indicateur pour évaluer le fardeau de la maladie au Québec.* [https://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/1474\\_AnneesVieCorrigeesIncapacite\\_IndiceIFardeauMal.pdf](https://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/1474_AnneesVieCorrigeesIncapacite_IndiceIFardeauMal.pdf)
- Januchowski, R., Wojtowicz, K., Sujka-Kordowska, P., Andrzejewska, M., & Zabel, M. (2013). MDR gene expression analysis of six drug-resistant ovarian cancer cell lines. *BioMed research international*, 2013, 241763. <https://doi.org/10.1155/2013/241763>
- Jhingran, A., Chawla, B., Saxena, S., Barrett, M. P. et Madhubala, R. (2009). Paromomycin: Uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 164(2),111–117. doi:10.1016/j.molbiopara.2008.12.007
- Karimi Goftar, M., Alizadeh Rayeni, N., Rasouli, S. (2014). Topoisomerase Inhibitors and Types of Them. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(8), 2431-2436.
- Karkamo, V., Kaistinen, A., Näreaho, A., Dillard, K., Katri, Vidgrén, G., Tuoresmäki, N. et Anttila, M. (2014). The first report of autochthonous non-vector-borne transmission of canine leishmaniosis in the Nordic countries. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56(84).
- Karunaweera, N. D. et Ferreira, M. U. (2018). Leishmaniasis: current challenges and prospects for elimination with special focus on the South Asian region. *Parasitology*, 145(4), 425-429. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000471>
- Kazémie, B. (2011). Genomic Organization of *Leishmania* Species. *Iranian Journal of Parasitology*. 6(3), 1–18.
- Kedzierski L. (2010). Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today?. *Journal of global*

*infectious diseases*, 2(2), 177–185. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62881>

- Klejewski, A., Świerczewska, M., Zaorska, K., Brażert, M., Nowicki, M., Zabel, M., & Januchowski, R. (2017). New and Old Genes Associated with Topotecan Resistance Development in Ovarian Cancer Cell Lines. Repéré à <https://ar.iijournals.org/content/37/4/1625.long#ref-12>
- Kravetz, R. E. (2000). Fleam (phlebotome). *The American Journal of Gastroenterology*, 95(12), 3633–3633. doi:10.1111/j.1572-0241.2000.03382.x
- Kollmannsberger, C., Mross, K., Jakob, A., Kanz, L., & Bokemeyer, C. (1999). Topotecan – A Novel Topoisomerase I Inhibitor: Pharmacology and Clinical Experience. *Oncology*, 56(1), 1–12. doi:10.1159/000011923
- Krogh, B. O. et Shuman, S. (2000). Catalytic Mechanism of DNA Topoisomerase IB. *Molecular Cell*, 5(6), 1035–1041. doi:10.1016/s1097-2765(00)80268-3
- Kuhls K, Cupolillo E, Silva SO, Schweynoch C, Côrtes Boité M, Mello MN, et al. (2013) Population Structure and Evidence for Both Clonality and Recombination among Brazilian Strains of the Subgenus *Leishmania* (*Viannia*). *PLoS Negl Trop Dis*, 7(10): e2490. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002490>
- Lachaud, L., Bourgeois, N., Kuk, N., Morelle, C., Crobu, L., Merlin, G., Bastien, P., Pagès, M. et Sterkers, Y. (2014). Constitutive mosaic aneuploidy is a unique genetic feature widespread in the *Leishmania* genus. *Microbes and Infection*, 16(1), 61–66. doi:10.1016/j.micinf.2013.09.005
- Laffitte, M. N., Leprohon, P., Papadopoulou, B., & Ouellette, M. (2016). Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. *F1000Research*, 5, 2350. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9218.1>
- Laffitte, M.-C. N., Genois, M.-M., Mukherjee, A., Légaré, D., Masson, J.-Y., & Ouellette, M. (2014). Formation of Linear Amplicons with Inverted Duplications in *Leishmania* Requires the MRE11 Nuclease. *PLoS Genetics*, 10(12), e1004805. doi:10.1371/journal.pgen.1004805
- Lainson, R., Shaw, J. J., (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In: W Peters, R Killick-Kendrick, editors. *The Leishmaniases in Biology and Medicine*, Academic Press, London, p. 1–120.
- Légaré, D., Richard, D., Mukhopadhyay, R., Stierhof, Y. D., Rosen, B. P., Haimeur, A.,

- Papadopoulou, B., & Ouellette, M. (2001). The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *The Journal of biological chemistry*, 276(28), 26301–26307. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102351200>
- Lei, Z. N., Teng, Q. X., Zhang, W., Fan, Y. F., Wang, J. Q., Cai, C. Y., Lu, K. W., Yang, D. H., Wurpel, J. et Chen, Z. S. (2020). Establishment and Characterization of a Topotecan Resistant Non-small Cell Lung Cancer NCI-H460/TPT10 Cell Line. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 607275. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.607275>
- Lemke, A., Kiderlen, A. F. et Kayser, O. (2005). Amphotericin B. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(2), 151–162. doi:10.1007/s00253-005-1955-9
- Li, X. G., Haluska, P., Jr, Hsiang, Y. H., Bharti, A. K., Kufe, D. W., Liu, L. F., & Rubin, E. H. (1997). Involvement of amino acids 361 to 364 of human topoisomerase I in camptothecin resistance and enzyme catalysis. *Biochemical pharmacology*, 53(7), 1019–1027. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(96\)00899-4](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(96)00899-4)
- Litt, E., Baker, M. C. et Molyneux, D. (2012). Neglected tropical diseases and mental health: a perspective on comorbidity. *Trends in Parasitology*, 28(5), 195–201. doi:10.1016/j.pt.2012.03.001
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. et Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology* (4<sup>e</sup> éd.). The Role of Topoisomerases in DNA Replication. W. H. Freeman
- Loker, E. et Hofkin, B. (2015). *Parasitology : A Conceptual Approach*. Garland Science.
- Louradour, I., Ferreira, T. R., Ghosh, K., Shaik, J., & Sacks, D. (2020). *In Vitro* Generation of *Leishmania* Hybrids. *Cell Reports*, 31(2), 107507. doi:10.1016/j.celrep.2020.03.071
- Loría-Cervera, E. N. et Andrade-Narváez, F. J. (2014). Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 56(1), 1–11. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000100001>
- Mahdy, M. A., Al-Mekhlafi, A. M., Abdul-Ghani, R., Saif-Ali, R., Al-Mekhlafi, H. M., Al-Eryani, S.M., Lim, Y. A. et Mahmud, R. (2016). First Molecular Characterization of *Leishmania* Species Causing Visceral Leishmaniasis among Children in Yemen. *PloS one*, 11(3), e0151265. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151265>
- Marquis, J.-F., Hardy, I., & Olivier, M. (2005). Topoisomerase I Amino Acid Substitutions, Gly185Arg and Asp325Glu, Confer Camptothecin Resistance in *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4), 1441–1446. doi:10.1128/aac.49.4.14411446.2005

- Mannaert, A., Downing, T., Imamura, H., et Dujardin, J.-C. (2012). Adaptive mechanisms in pathogens: universal aneuploidy in *Leishmania*. *Trends in Parasitology*, 28(9), 370–376. doi:10.1016/j.pt.2012.06.003
- Markle, W.H., Makhoul, K. (2004). Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *Am Fam Physician*, 69(6), 1455-60. PMID: 15053410.
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N. et Gradoni, L. (2012). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), 123–147. doi:10.1111/j.1365 2915.2012.01034.x
- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G. et Figueroa-Angulo, E. E. (2010). Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1–15. doi:10.1155/2010/525241
- Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H. O., Bishop, J. R., Falcone, F. H., Gavrilescu, C., Montgomery, J. L., Santori, M. I., Stern, L. S., Wang, Z. Ullu, E. et Tschudi, C. (2000) A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA*, 6(2), 163-169. doi: 10.1017/s135583820099229x
- Mauël, J. (1990). Macrophage-Parasite Interactions in *Leishmania* Infections. *Journal of Leukocyte Biology*, 47(2), 187–193. doi:10.1002/jlb.47.2.187
- Matthews, K.R., Tschudi, C. et Ullu, E. (1994) A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes and Development*, 8(4), 491–501. doi: 10.1101/gad.8.4.491
- Médecins Sans Frontière. (2013). *Kala azar*. Repéré à <https://www.doctorswithoutborders.ca/kala-azar>
- Médecins Sans Frontière. (2020). *Kala azar (visceral leishmaniasis)*. <https://www.msf.org.uk/issues/kala-azar-visceral-leishmaniasis>
- Mescouto-Borges, M. R. M., Maués, É., Costa, D. L., Pranchevicius, M. C. da S. et Romero, G. A. S. (2013). Congenitally transmitted visceral leishmaniasis: report of two Brazilian human cases. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 17(2), 263-266. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.10.017>
- Moore, E. M. et Lockwood, D. N. (2010). Treatment of visceral leishmaniasis. *Journal of global infectious diseases*, 2(2), 151–158. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62883>
- Moreira, D. S., Monte Neto, R. L., Andrade, J. M., Santi, A. M., Reis, P. G., Frézard, F. et

- Murta, S.M. (2013). Molecular characterization of the MRPA transporter and antimony uptake in four New World *Leishmania spp.* susceptible and resistant to antimony. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*, 3, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2013.08.001>
- Mukhopadhyay, R., Dey, S., Xu, N., Gage, D., Lightbody, J., Ouellette, M. et Rosen, B. P. (1996). Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(19), 10383–10387. doi:10.1073/pnas.93.19.10383
- Mukhopadhyay, A. K., Saxena, N. B., & Narasimham, M. V. (1990). Susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* to DDT in some kala-azar endemic areas of Bihar (India). *The Indian journal of medical research*, 91, 458–460.
- Mukherjee, A., Padmanabhan, P. K., Sahani, M. H., Barrett, M. P. et Madhubala, R. (2006). Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 145(1), 1–10. doi:10.1016/j.molbiopara.2005.08.016
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (1988). *Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information*. [1988]. Repéré à <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nosengo, N. (2016). Can you teach old drugs new tricks? *Nature*, 534(7607), 314–316. doi:10.1038/534314a
- Ouellette M., O.M., Sato S, Papadopoulou B. 2003. Le parasite *Leishmania* à l'ère de la post-génomique. *M/S: médecine sciences*. 19:900-909.
- Organisation mondiale de la santé. (2010). *Maladies tropicales négligées: questions fréquentes*. Repéré à [https://www.who.int/topics/tropical\\_diseases/qa/faq/fr/](https://www.who.int/topics/tropical_diseases/qa/faq/fr/)
- Organisation mondiale de la santé. (2012). *Pourquoi qualifie-t-on de "négligées" certaines maladies tropicales?* Repéré à <https://www.who.int/features/qa/58/fr/>
- Organisation mondiale de la santé. (2019). *Leishmaniose*. Repéré à <https://www.who.int/fr/newsroom/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Organisation mondiale de la santé. (2021). *The global health observatory*. Repéré à <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/topic-details/GHO/leishmaniasis>
- Organisation mondiale de la santé. (2019). *The vector*. Repéré à <https://www.who.int/leishmaniasis/disease/vector/en/>

- Organisation mondiale de la santé. (2020). *Disease Watch Focus*. Repéré à [https://www.who.int/tdr/publications/disease\\_watch/leish/en/](https://www.who.int/tdr/publications/disease_watch/leish/en/)
- Organisation panaméricaine de la santé/Organisation mondiale de la santé. (2017). *Neglected infectious disease – Leishmaniasis*. Repéré à <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-cha-leishmaniasis-factsheet-work.pdf>
- Ostyn, B., Hasker, E., Dorlo, T. P. C., Rijal, S., Sundar, S., Dujardin, J.-C. et Boelaert, M. (2014). Failure of Miltefosine Treatment for Visceral Leishmaniasis in Children and Men in South-East Asia. *PLoS ONE*, 9(6), e100220. doi:10.1371/journal.pone.0100220
- Pan American Health Organization. (2012). *Visceral Leishmaniasis*. Repéré à [https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6420:2012-leishmaniasis-visceral&Itemid=39347&lang=en](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420:2012-leishmaniasis-visceral&Itemid=39347&lang=en)
- Pace, D. (2014). Leishmaniasis. *Journal of Infection*, 69 (1), S10–S18. doi:10.1016/j.jinf.2014.07.016
- Palumbo, E. (2010). Treatment strategies for mucocutaneous leishmaniasis. *Journal of global infectious diseases*, 2(2), 147–150. Repéré à <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62879>
- Pan, P., Li, Y., Yu, H., Sun, H., & Hou, T. (2013). Molecular principle of topotecan resistance by topoisomerase I mutations through molecular modeling approaches. *Journal of chemical information and modeling*, 53(4), 997–1006. <https://doi.org/10.1021/ci400066x>
- Patino, L. H., Muñoz, M., Muskus, C., Méndez, C. et Ramírez, J. D. (2020). Intraspecific Genomic Divergence and Minor Structural Variations in *Leishmania (Viannia) panamensis*. *Genes*, 11(3), 252. <https://doi.org/10.3390/genes11030252>
- Parchment, R. E. et Pessina, A. (1998). Topoisomerase I inhibitors and drug resistance. *Cytotechnology*. 27(1-3): 149–164. doi: 10.1023/A:1008008719699
- Peacock, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., Quail, M. A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M. A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., ... Berriman, M. (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature genetics*, 39(7), 839–847. <https://doi.org/10.1038/ng2053>
- Petersen, C. A., & Barr, S. C. (2009). Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized?. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 39(6), 1065–vi. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.06.008>

- Podinovskaia, M. et Descoteaux, A. (2015). *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiology*, 10(1), 111–129. doi:10.2217/fmb.14.103
- Pérez-Victoria, F. J., Gamarro, F., Ouellette, M. et Castanys, S. (2003). Functional Cloning of the Miltefosine Transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 49965–49971. doi:10.1074/jbc.m308352200
- Pérez-Victoria, F. J., Sánchez-Cañete, M. P., Castanys, S. et Gamarro, F. (2006). Phospholipid Translocation and Miltefosine Potency Require Both *L. donovani* Miltefosine Transporter and the New Protein LdRos3 in *Leishmania* Parasites. *Journal of Biological Chemistry*, 281(33), 23766–23775. doi:10.1074/jbc.m605214200
- Perry, M. R., Wyllie, S., Raab, A., Feldmann, J. et Fairlamb, A. H. (2013). Chronic exposure to arsenic in drinking water can lead to resistance to antimonial drugs in a mouse model of visceral leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(49), 19932–19937. doi:10.1073/pnas.1311535110
- Perry, M. R., Prajapati, V. K., Menten, J., Raab, A., Feldmann, J., Chakraborti, D., Sundar, S., Fairlamb, H. A. Boelaert, M. et Picado, A. (2015). Arsenic Exposure and Outcomes of Antimonial Treatment in Visceral Leishmaniasis Patients in Bihar, India: A Retrospective Cohort Study. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(3), e0003518. doi:10.1371/journal.pntd.0003518
- Pokhriyal, R., Hariprasad, R., Kumar, L. et Hariprasad, G. (2019). Chemotherapy Resistance in Advanced Ovarian Cancer Patients. *Biomarkers in cancer*, 11. <https://doi.org/10.1177/1179299X19860815>
- Pommier, Y. (2013). Drugging Topoisomerases: Lessons and Challenges. *ACS Chemical Biology*, 8(1), 82-95. doi : 10.1021/cb300648v.
- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J.-C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., Pountain, W. A., Mwenechanya, R. et Papadopoulou, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), e0006052. doi:10.1371/journal.pntd.0006052
- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J.-C., Barrett, M., Vélez-Lopez, R., García-Hernández, R., W. Pountain, A., Mwenechanya, R. et Papadopoulou, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLOS: Neglected tropical disease* 11(12), e0006052. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>

- Pountain, A. W., Weidt, S. K., Regnault, C., Bates, P. A., Donachie, A. M., Dickens, N. J., & Barrett, M. P. (2019). Genomic instability at the locus of sterol C24-methyltransferase promotes amphotericin B resistance in *Leishmania* parasites. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(2), e0007052. doi:10.1371/journal.pntd.0007052
- Prada, C. F., Álvarez-Velilla, R., Balaña-Fouce, R., Prieto, C., Calvo-Álvarez, E., Escudero Martínez, J. M., Requenac, J M., Ordóñez, C., Desiderid, A., Pérez-Perte, Y. et M.Reguera, R. (2013). Gimitecan and other camptothecin derivatives poison *Leishmania* DNA-topoisomerase IB leading to a strong leishmanicidal effect. *Biochemical Pharmacology*, 85(10), 1433-1440. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.024>
- Purkait, B., Kumar, A., Nandi, N., Sardar, A. H., Das, S., Kumar, S., Pandey, K., Ravidas, V., Kumar, M., De, T., Singh, D. et Das, P. (2012). Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(2), 1031–1041. <https://doi.org/10.1128/AAC.00030-11>
- Pushpakom, S., Iorio F., A. Evers, P., Escott, K., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Williams, T., Latimer, J., McNamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D. et Pirmohamed, M. (2019). Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature*, 18(1), 4158. doi : 10.1038/nrd.2018.168
- Rai, S., Bhaskar, Goel, S. K., Nath Dwivedi, U., Sundar, S., & Goyal, N. (2013). Role of efflux pumps and intracellular thiols in natural antimony resistant isolates of *Leishmania donovani*. *PloS one*, 8(9), e74862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074862>
- Redinbo, M. R., Champoux, J. J. et Hol, W. G. (1999). Structural insights into the function of type IB topoisomerases. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(1), 29–36. doi:10.1016/s0959-440x(99)80005-0
- Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B. et Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(9), 581–596. doi:10.1016/s1473-3099(07)70209-8
- Roberts S. C. (2011). The genetic toolbox for *Leishmania* parasites. *Bioengineered bugs*, 2(6), 320–326. <https://doi.org/10.4161/bbug.2.6.18205>
- Rogers, M. E., Chance, M. L. et Bates, P. A. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, 124(5). doi:10.1017/s0031182002001439
- Romero, C., I., Saravia, N. G. et Walker, J. (2005). Selective action of fluoroquinolones against intracellular amastigotes of *Leishmania (Vianna) panamensis* in vitro. *Journal of Parasitology* 91(6), 1474-1479. <https://doi.org/10.1645/GE-3489.1>

- Roque, A. L. R. et Jansen, A. M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(3), 251-262. doi:10.1016/j.ijppaw.2014.08.004
- Rougeron, V., De Meeûs, T., Hide, M., Waleckx, E., Bermudez, H., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Dujardin, J. C., De Doncker, S., Le Ray, D., Ayala, F. J., & Bañuls, A. L. (2009). Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(25), 10224–10229. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904420106>
- Rougeron, V., De Meeûs, T., & Bañuls, A.-L. (2017). Reproduction in *Leishmania* : A focus on genetic exchange. *Infection, Genetics and Evolution*, 50, 128–132. doi:10.1016/j.meegid.2016.10.013
- Schlein, Y. (1993). *Leishmania* and Sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. *Parasitology Today*, 9(7), 255–258. doi:10.1016/0169-4758(93)90070-v
- Scorza, B. M., Carvalho, E. M. et Wilson, M. E. (2017). Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1296. <https://doi.org/10.3390/ijms18061296>
- Serafim, T. D., Coutinho-Abreu, I. V., Oliveira, F., Meneses, C., Kamhawi, S. et Valenzuela, J. G. (2018). Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nature Microbiology*, 3(5), 548–555. doi:10.1038/s41564-018-0125-7
- Sevá, A. P., Ovallos, F. G., Amaku, M., Carrillo, E., Moreno, J., Galati, E. A. B., ... Ferreira, F. (2016). Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLOS ONE*, 11(7), e0160058. doi:10.1371/journal.pone.0160058
- Solano-Gallego, L., Rossi, L., Scroccaro, A.M. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. *Parasites Vectors*, 5, 98 (2012). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-98>
- Soren BC, Dasari JB, Ottaviani A, Iacovelli F, Fiorani P. (2020). Topoisomerase IB: a relaxing enzyme for stressed DNA. *Cancer Drug Resist*, 3:18-25. <http://dx.doi.org/10.20517/cdr.2019.106>
- Srivastava, P., Prajapati, V. K., Rai, M. et Sundar, S. (2011). Unusual case of resistance to amphotericin B in visceral leishmaniasis in a region in India where leishmaniasis is not endemic. *Journal of clinical microbiology*, 49(8), 3088–3091. <https://doi.org/10.1128/JCM.00173-11>

- Srivastava, S., Mishra, J., Gupta, A. K., Singh, A., Shankar, P., & Singh, S. (2017). Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. *Parasites & vectors*, *10*(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-1969-z>
- Shapiro, T. et Englund, P. (1995). The Structure and Replication of Kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiology*, *49*, 117-143. doi : 10.1146/annurev.mi.49.100195.001001
- Silveira, Fernando T, Lainson, Ralph et Corbett, Carlos EP. (2004). Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *99*(3), 239-251. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000300001>
- Sissi, C. et Palumbo, M. (2009). Effects of magnesium and related divalent metal ions in topoisomerase structure and function. *Nucleic Acids Research*, *37*(3), 702–711. doi:10.1093/nar/gkp024
- Srivastava, P., Dayama, A., Mehrotra, S., & Sundar, S. (2011). Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *105*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.09.006>
- Sundar S. (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, *6*(11), 849–854. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00778.x>
- Sundar S. (2015). Visceral leishmaniasis. *Tropical parasitology*, *5*(2), 83–85. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.162487>
- Sundar, S., & Chakravarty, J. (2010). Antimony toxicity. *International journal of environmental research and public health*, *7*(12), 4267–4277. <https://doi.org/10.3390/ijerph7124267>
- Sundar, S., Rai, M., Chakravarty, J., Agarwal, D., Agrawal, N., Vaillant, M., Olliaro, P. et Murray, H. W. (2008). New Treatment Approach in Indian Visceral Leishmaniasis: Single-Dose Liposomal Amphotericin B Followed by Short-Course Oral Miltefosine. *Clinical Infectious Diseases*, *47*(8), 1000–1006. doi:10.1086/591972
- Sunter, J. et Gull, K. (2017). Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology*, *7*(9), 170165. doi:10.1098/rsob.170165
- Staker, B. L., Hjerrild, K., Feese, M. D., Behnke, C. A., Burgin, A. B., Jr et Stewart, L. (2002). The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(24), 15387–15392. <https://doi.org/10.1073/pnas.242259599>

- Stewart, L., Redinbo, M.R., Qiu, X., Hol, W.G. et Champoux, J.J. (1998). A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science*, 279(5356), 1534-1541. doi:10.1126/science.279.5356.1534.
- Tamura, H., Kohchi, C., Yamada, R., Ikeda, T., Koiwai, O., Patterson, E., Keene, J. D., Okada, K., Kjeldsen, E., & Nishikawa, K. (1991). Molecular cloning of a cDNA of a camptothecin-resistant human DNA topoisomerase I and identification of mutation sites. *Nucleic acids research*, 19(1), 69–75. <https://doi.org/10.1093/nar/19.1.69>
- Thakur C. P. (2007). A new strategy for elimination of kala-azar from rural Bihar. *The Indian journal of medical research*, 126(5), 447–451.
- The Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. (2015). *The Process Behind New Medicines*. Repéré à [http://phrmadocs.phrma.org/sites/default/files/pdf/rd\\_brochure\\_022307.pdf](http://phrmadocs.phrma.org/sites/default/files/pdf/rd_brochure_022307.pdf)
- Théodoridès, J. (1997). Note historique sur la découverte de la transmission de la leishmaniose cutanée par les phlébotomes. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 90(3), 177-178.
- Tibayrenc, M., & Ayala, F. J. (2013). How clonal are Trypanosoma and *Leishmania*? *Trends in Parasitology*, 29(6), 264–269. doi:10.1016/j.pt.2013.03.007
- Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J. et Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6, 750. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>
- TriTrypDB. (2019). *My strategies*. Repéré à <https://tritrypdb.org/tritrypdb/showApplication.do>
- Ubeda, J. M., Légaré, D., Raymond, F., Ouameur, A. A., Boisvert, S., Rigault, P., Corbeil, J., Tremblay, M. J., Olivier, M., Papadopoulou, B., & Ouellette, M. (2008). Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. *Genome biology*, 9(7), R115. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-7-r115>
- Ubeda, J.-M., Raymond, F., Mukherjee, A., Plourde, M., Gingras, H., Roy, G., ... Ouellette, M. (2014). Genome-Wide Stochastic Adaptive DNA Amplification at Direct and Inverted DNA Repeats in the Parasite *Leishmania*. *PLoS Biology*, 12(5), e1001868. doi:10.1371/journal.pbio.1001868
- Van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W. et

- Laskay, T. (2004). Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. *The Journal of Immunology*, 173(11), 6521–6525. doi:10.4049/jimmunol.173.11.6521
- Villa, H., Otero Marcos, A. R., Reguera, R. M., Balaña-Fouce, R., García-Estrada, C., Pérez-Pertejo, Y., ... Ordóñez, D. (2002). A Novel Active DNA Topoisomerase I in *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(6), 3521–3526. doi:10.1074/jbc.m203991200
- Vlachakis, D., Pavlopoulou, A., Roubelakis, M. G., Feidakis, C., Anagnou, N. P. et Kossida, S. (2013). 3D molecular modeling and evolutionary study of the *Trypanosoma brucei* DNA Topoisomerase IB, as a new emerging pharmacological target. *Genomics*, 103(1), 107-113.
- Velásquez, A. M. A., Ribeiro, W. C., Venn, V., Castelli, S., Camargo, M. S. de, de Assis, R. P., de Souza, R. A., Rimoldi Ribeiro, A., Passalacqua, T. G., da Rosa, J. A., Baviera, A. M., Mauro, A. E., Desideri, A., Almeida-Amaral, E. E. et Graminha, M. A. S. (2017). Efficacy of a Binuclear Cyclopalladated Compound Therapy for Cutaneous Leishmaniasis in the Murine Model of Infection with *Leishmania amazonensis* and Its Inhibitory Effect on Topoisomerase 1B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(8), e00688-17. doi:10.1128/aac.00688-17
- Volfova, V., Hostomska, J., Cerny, M., Votypka, J. et Volf, P. (2008). Hyaluronidase of Bloodsucking Insects and Its Enhancing Effect on *Leishmania* Infection in Mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(9), e294. doi:10.1371/journal.pntd.0000294
- Wagner, V., Douanne, N. et Fernandez-Prada, C. (2020). *Leishmania infantum* infection in a dog imported from Morocco. *The Canadian veterinary journal*, 61, 963-965.
- Wagner, V., Minguez-Menendez, A., Pena, J. et Fernandez-Prada, C. (2019). Innovative Solutions for the Control of Leishmaniasis: Nanoscale Drug Delivery Systems. *Current Pharmaceutical Design*, 25(14), 1582-1592(11). <https://doi.org/10.2174/1381612825666190621154552>
- Watt, P. M. et Hickson, I. D. (1994). Structure and function of type II DNA topoisomerases. *The Biochemical journal*, 303 (3), 681–695. <https://doi.org/10.1042/bj3030681>
- Wyllie, S., Cunningham, M. L. et Fairlamb, A. H. (2004). Dual Action of Antimonial Drugs on Thiol Redox Metabolism in the Human Pathogen *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 39925–39932. doi:10.1074/jbc.m40