

Université de Montréal

Étude des vésicules extracellulaires du parasite *Leishmania* et de leur rôle dans le phénomène de la résistance aux antimicrobiens

*Par*

Noélie Douanne

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)  
en sciences vétérinaires, option microbiologie

Février 2023

© Noélie Douanne, 2023

Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

---

*Cette thèse intitulée*

**Étude des vésicules extracellulaires du parasite *Leishmania* et de leur rôle dans le phénomène de la résistance aux antimicrobiens**

*Présentée par*

**Noélie Douanne**

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

**Nahuel Fittipaldi**

Président-rapporteur

**Christopher Fernandez-Prada**

Directeur de recherche

**Martin Olivier**

Codirecteur

**Julie Brind'Amour**

Membre du jury

**Maritza Jaramillo**

Examinatrice externe



## Fr Résumé

Bien que l'évolution de la résistance aux médicaments soit l'un des plus grands défis dans la lutte contre les maladies infectieuses, beaucoup de phénomènes restent inexplicables. Dans le cas de la leishmaniose, la résistance est un problème majeur depuis plusieurs années. Cette maladie zoonotique négligée est causée par le parasite protozoaire *Leishmania*, transmis par des phlébotomes lors du repas sanguin. Chez l'humain, elle se décline en trois formes principales : viscérale, cutanée et muco-cutanée. La leishmaniose peut aussi se développer chez les chiens infectés, qui constituent un réservoir majeur de transmission. Sans vaccin efficace, le contrôle de la maladie repose principalement sur la chimiothérapie, mais peu de molécules homologuées sont disponibles. En outre, les mêmes produits sont utilisés chez les chiens et les humains, ce qui favorise l'émergence et la propagation de souches résistantes aux médicaments. *Leishmania* est en effet connu pour détenir d'incroyables particularités génomiques (telles que la formation d'amplicons circulaires contenant des gènes de résistance) qui lui permettent de survivre dans des conditions de stress, telles que la pression médicamenteuse.

Par ailleurs, *Leishmania* est un eucaryote qui a conservé la capacité de produire des vésicules extracellulaires (EVs) au cours de l'évolution. Ces particules de taille nanométrique sont produites naturellement par la majorité des cellules biologiques et ont un contenu riche en protéines, lipides et acides nucléiques. Bien que des caractéristiques clés des EVs du protozoaire aient été découvertes, aucune étude n'a encore été réalisée sur les EVs de souches résistantes. Ainsi, cet aspect constitue le cœur de mon projet de recherche de doctorat : l'étude des EVs de *Leishmania* et leur rôle dans le phénomène de la résistance aux médicaments.

Nos travaux sont les premiers à démontrer que les mécanismes de résistance aux médicaments peuvent induire des changements dans la morphologie, la taille et la distribution des EVs de *Leishmania*. Nous avons identifié le protéome de base des EVs du parasite et nous avons mis en évidence des protéines enrichies dans les EVs libérées par des parasites résistants à l'antimoine, à la milféfosine et à l'amphotéricine B. Nous avons également étudié le contenu en ADN des EVs de parasites résistants et confirmé l'enrichissement des amplicons porteurs de gènes de résistance aux médicaments, associés aux EVs. En complément, nos tests de transferts d'EVs ont prouvé que ces vésicules permettent le transfert horizontal de gènes de résistance : un mécanisme alternatif de résistance aux médicaments. Finalement, nous avons montré que les EVs des parasites résistants améliorent la croissance des promastigotes et réduisent l'accumulation de ROS, ce qui favorise la survie et la propagation des populations résistantes aux médicaments.

En conclusion, ces découvertes permettront le développement de nouveaux tests diagnostiques et de nouvelles approches thérapeutiques pour certaines maladies infectieuses zoonotiques, basés sur les profils des EVs. De plus, elles ont une importance majeure dans la compréhension de la résistance médicamenteuse et prouvent que les EVs fonctionnent comme des médiateurs efficaces dans le transfert horizontal de gène. Ce nouveau mécanisme facilite ainsi la transmission des gènes de résistance aux médicaments entre les parasites et favorise leur survie lorsqu'ils sont confrontés à des environnements stressants.

**Mots clés** : Résistance aux médicaments, amplicons circulaires, gènes de résistance, transfert horizontal de gènes, protéomique, croissance cellulaire, espèces réactives de l'oxygène, vésicules extracellulaires, *Leishmania*, protozoaires

## En Abstract

Although the evolution of drug resistance is one of the greatest challenges in the fight against infectious diseases, many phenomena remain unexplained. In the case of leishmaniasis, resistance has been a major problem for several years. This neglected zoonotic disease is caused by the protozoan parasite *Leishmania*, transmitted by sandflies during the blood meal. In humans, it comes in three main forms: visceral, cutaneous, and mucocutaneous. Leishmaniasis can also develop in infected dogs, which constitute a major reservoir of transmission. Without an effective vaccine, the control of the disease relies mainly on chemotherapy, but few approved molecules are available. Furthermore, the same products are used in dogs and humans, which promotes the emergence and spread of drug-resistant strains. *Leishmania* is indeed known to possess incredible genomic peculiarities (such as the formation of circular amplicons containing resistance genes) which allow it to survive under stressful conditions, such as drug pressure.

Furthermore, *Leishmania* is a eukaryote that has retained the ability to produce extracellular vesicles (EVs) during evolution. These nano-sized particles are produced naturally by most biological cells and have a rich content of proteins, lipids, and nucleic acids. Although key characteristics of the protozoan EVs have been discovered, no studies have yet been performed on the EVs of resistant strains. Thus, this aspect constitutes the heart of my doctoral research project: the study of *Leishmania* EVs and their role in the phenomenon of drug resistance.

Our work is the first to demonstrate that drug resistance mechanisms can induce changes in the morphology, size, and distribution of *Leishmania* EVs. We have identified the basic proteome of parasite EVs, and we have demonstrated enriched proteins in EVs released by parasites resistant to antimony, miltefosine and amphotericin B. We also studied the DNA content of EVs from resistant parasites and confirmed the enrichment of amplicons carrying drug resistance genes associated with EVs. In addition, our EV transfer tests have proven that these vesicles allow the horizontal transfer of resistance genes: an alternative mechanism of drug resistance. Finally, we showed that EVs from resistant parasites enhance promastigote growth and reduce ROS accumulation, which promotes the survival and spread of drug-resistant populations.

In conclusion, these discoveries will allow the development of new diagnostic tests and new therapeutic approaches for certain zoonotic infectious diseases, based on the profiles of EVs. Moreover, these findings are of major importance in the understanding of drug resistance and prove that EVs function as effective mediators in horizontal gene transfer. This new mechanism thus facilitates the transmission of drug resistance genes between parasites and promotes their survival when confronted with stressful environments.

**Key words:** Drug resistance, circular amplicons, resistance genes, horizontal gene transfer, proteomics, cell growth, reactive oxygen species, extracellular vesicles, *Leishmania*, protozoa

## Table des matières

 <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>13</b>
 <b>Liste des figures</b> .....	<b>14</b>
 <b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	<b>16</b>
 <b>Remerciements</b> .....	<b>23</b>
 <b>Partie 1 - [Revue de la littérature]</b> .....	<b>24</b>
 <b>Chapitre 1. La leishmaniose : généralités</b> .....	<b>25</b>
<b>1.1. Aperçu historique de la leishmaniose</b> .....	<b>26</b>
<b>1.2. Transmission de la maladie</b> .....	<b>27</b>
1.2.1. Modes de transmission .....	27
1.2.2. Les phlébotomes vecteurs .....	28
1.2.2.1. Classification des phlébotomes .....	28
1.2.2.2. Les phlébotomes : d'importants vecteurs de la leishmaniose.....	28
1.2.3. Hôtes et réservoirs.....	29
<b>1.3. Distribution géographique de la leishmaniose</b> .....	<b>29</b>
<b>1.4. Manifestations cliniques de la leishmaniose</b> .....	<b>30</b>
1.4.1. Chez l'humain .....	30
1.4.1.1. Leishmaniose viscérale .....	30

## Table des matières

1.4.1.2. Leishmaniose cutanée.....	31
1.4.1.3. Leishmaniose muco-cutanée.....	31
1.4.1.4. Leishmaniose dermique post-kala-azar.....	32
1.4.2. Chez les animaux.....	32
1.4.2.1. Leishmaniose Canine.....	32
1.4.2.2. Leishmaniose féline.....	33
1.4.2.3. Autres animaux.....	33
<b>1.5. Diagnostic de la maladie.....</b>	<b>34</b>



## **Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*.....35**

<b>2.1. Classification du parasite.....</b>	<b>36</b>
2.1.1. Le genre <i>Leishmania</i> .....	36
2.1.2. Les différentes espèces de <i>Leishmania</i> .....	36
<b>2.2. Cycle de vie de <i>Leishmania</i>.....</b>	<b>37</b>
2.2.1. Stade extracellulaire (développement au sein du vecteur).....	37
2.2.1.1. Repas sanguin du phlébotome non-infecté   « <i>Aspiration !</i> ».....	37
2.2.1.2. Promastigotes procycliques   « <i>Déploiement</i> ».....	39
2.2.1.3. Promastigotes nectomonades   « <i>L'adhérence ou la mort</i> ».....	39
2.2.1.4. Promastigotes leptomonades   « <i>Renflouer les troupes</i> ».....	40
2.2.1.5. Promastigotes métacycliques infectieux   « <i>Dans la cour des grands</i> ».....	40
2.2.1.6. Promastigotes retroleptomonades   « <i>Machine arrière</i> ».....	40
2.2.1.7. Promastigotes haptomonades   « <i>Les oubliés</i> ».....	41
2.2.1.8. Métabolisme énergétique des promastigotes   « <i>La bonne " bouffe "</i> ».....	41
2.2.2. Stade intracellulaire (développement au sein de l'hôte).....	41
2.2.2.1. Repas sanguin du phlébotome infecté   « <i>En avant toute !</i> ».....	41
2.2.2.2. Le système du complément   « <i>Premier obstacle</i> ».....	43
2.2.2.3. Les neutrophiles   « <i>Camouflage temporaire</i> ».....	43
2.2.2.4. La vacuole parasitophore   « <i>L'habitat</i> ».....	44
2.2.2.5. Détournement des fonctions des macrophages   « <i>Place à la stratégie !</i> ».....	45
2.2.2.6. Cellule Présentatrice d'Antigène (CPA)   « <i>La passerelle entre l'inné et l'adaptatif</i> ».....	47
2.2.2.7. Les lymphocytes T (LT)   « <i>Les sentinelles</i> ».....	47
2.2.2.8. Métabolisme énergétique des amastigotes   « <i>Régime particulier</i> ».....	49
2.2.2.8.1. Les différentes voies utilisées par <i>Leishmania</i> .....	49
2.2.2.8.2. Course à l'arginine.....	49



## Table des matières

2.2.2.8.3. Fer et hème .....	50
<b>2.3. Particularités génomiques de <i>Leishmania</i> .....</b>	<b>50</b>
2.3.1. <i>Leishmania</i> , un parasite à deux génomes .....	51
2.3.1.1. Le kinétoplaste .....	51
2.3.1.2. Le génome nucléaire .....	51
2.3.2. Nucléotides et chromatine .....	52
2.3.2.1. La base J.....	52
2.3.2.2. Remodelage de la chromatine.....	53
2.3.3. Plasticité génomique.....	53
2.3.3.1. Aneuploïdie en mosaïque.....	53
2.3.3.2. Amplifications géniques.....	55
2.3.3.3. SNPs et délétions.....	56
2.3.4. Expression génique.....	57
2.3.4.1. Absence de promoteur chez <i>Leishmania</i> .....	57
2.3.4.2. Transcription polycistronique.....	57
2.3.4.3. Régulation post-transcriptionnelle .....	58
<b> Chapitre 3. Prévention et traitements contre la leishmaniose .....</b>	<b>60</b>
<b>3.1. Prévention de la leishmaniose.....</b>	<b>61</b>
3.1.1. La lutte antivectorielle .....	61
3.1.1.1. Premières tentatives de lutte contre les phlébotomes .....	61
3.1.1.2. Le succès de la pulvérisation chimique à base de DDT .....	62
3.1.1.3. Autres formulations d'insecticides .....	62
3.1.1.4. L'émergence de vecteurs résistants .....	63
3.1.1.5. Modification génétique et paratransgenèse.....	63
3.1.2. La vaccination.....	64
3.1.2.1. Bref historique de la vaccination.....	64
3.1.2.2. Histoire de la vaccination chez <i>Leishmania</i> .....	65
<b>3.2. Traitements médicamenteux contre la leishmaniose .....</b>	<b>66</b>
3.2.1. Quelques repères historiques sur le traitement de la leishmaniose .....	67
3.2.2. Caractéristiques générales des principaux antileishmaniens actuels .....	70
3.2.3. Principaux mécanismes d'action des antileishmaniens actuels .....	72
3.2.3.1. Les antimonies pentavalents (Sb <sup>V</sup> )   .....	72
3.2.3.1.1. Les Sb <sup>V</sup> en tant que prodrogues.....	72

## Table des matières

3.2.3.1.2. Les Sb <sup>v</sup> en tant que formes actives.....	73
3.2.3.2. La pentamidine (PTD)  .....	73
3.2.3.3. L'amphotéricine B (AmB)  .....	73
3.2.3.4. La paromomycine (PMM)  .....	74
3.2.3.5. L'allopurinol (ALP)  .....	74
3.2.3.6. La miltefosine (MF)  .....	74
3.2.3.7. La dompéridone (DPD)  .....	75



## Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez *Leishmania* ..... 76

<b>4.1. Les approches « -omiques » utilisées dans l'étude de la résistance .....</b>	<b>77</b>
4.1.1. Génomique .....	78
4.1.2. Transcriptomique .....	78
4.1.3. Protéomique .....	79
4.1.4. Métabolomique .....	80
<b>4.2. Un processus automatisé pour l'étude de la résistance ? .....</b>	<b>80</b>
<b>4.3. Facteurs impliqués dans l'émergence de la résistance.....</b>	<b>81</b>
4.3.1. Facteurs propres à la biologie de <i>Leishmania</i> .....	81
4.3.1.1. Les amplicons extrachromosomiques .....	81
4.3.1.2. Les mutations génétiques.....	82
4.3.1.3. Les transporteurs ABC .....	82
4.3.1.4. Autres molécules intracellulaires clés de la biologie de <i>Leishmania</i> .....	82
4.3.2. Facteurs liés au médicament .....	83
4.3.3. Facteurs environnementaux .....	83
4.3.4. « Émergence de la résistance » <i>versus</i> « échec thérapeutique ».....	84
<b>4.4. Principaux mécanismes de résistance aux médicaments.....</b>	<b>86</b>
4.4.1. Résistance à l'antimoine (Sb) .....	86
4.4.1.1. AQP1   Diminution de l'entrée du médicament.....	86
4.4.1.2. <i>mrpA</i>   Séquestration et efflux du médicament.....	86
4.4.1.3. Inhibition de l'activation du médicament.....	87
4.4.1.4. Niveau élevé de thiols intracellulaires et protection contre les ROS.....	87
4.4.1.5. Modulation des niveaux intracellulaires de NAD <sup>+</sup> .....	88
4.4.1.6. Modulation de la régulation des protéines intracellulaires .....	88
4.4.1.7. Mutations génétiques dans le gène codant pour la protéine CDPK1 .....	88



## Table des matières

4.4.1.8. Modulation du cycle de vie .....	88
4.4.1.9. Modulation de la composition des métabolites .....	89
4.4.2. Résistance à la pentamidine (PTD) .....	89
4.4.2.1. Faible accumulation du médicament .....	89
4.4.2.2. Séquestration du médicament .....	89
4.4.2.3. Changement dans la séquence d'ADNk .....	89
4.4.3. Résistance à l'amphotéricine B (AmB) .....	90
4.4.3.1. Diminution de la teneur et/ou perte de l'ergostérol .....	90
4.4.3.2. Défense oxydative .....	91
4.4.3.3. Efflux du médicament .....	91
4.4.4. Résistance à la paromomycine (PMM) .....	91
4.4.4.1. Absorption réduite du médicament .....	91
4.4.4.2. Séquestration du médicament .....	91
4.4.4.3. Augmentation de la glycolyse .....	92
4.4.4.4. Défense contre l'apoptose .....	92
4.4.4.5. Régulation à la hausse de certaines protéines .....	92
4.4.5. Résistance à l'allopurinol (ALP) .....	92
4.4.6. Résistance à la miltefosine (MF) .....	93
4.4.6.1. Faible accumulation du médicament .....	93
4.4.6.2. Modifications lipidiques de la membrane plasmique .....	94
4.4.6.3. Modulation de l'expression de certains gènes .....	94
4.4.6.4. Défense oxydative .....	94
4.4.6.5. Augmentation des quantités de glucides et d'enzymes .....	94
4.4.7. Résistance à la dompéridone (DPD) .....	95
4.4.8. Résistance croisée .....	95
4.4.9. « L'évolution » dans la résistance aux médicaments .....	95
4.4.9.1. Notion de « Fitness » .....	95
4.4.9.2. Notion de « Coût » .....	96
4.4.9.3. Transfert horizontal de gènes .....	96



## Chapitre 5. Quels nouveaux traitements contre la résistance ?.....98

### 5.1. Cibles médicamenteuses .....

5.1.1. Importance des études <i>in silico</i> .....	99
5.1.2. Nouvelles cibles médicamenteuses chez <i>Leishmania</i> .....	100

## Table des matières

5.1.2.1. Les polyamines.....	100
5.1.2.2. La L-Asparaginase .....	100
5.1.2.3. L'ergostérol.....	101
5.1.2.4. Les métacaspases.....	101
5.1.2.5. DHFR et PTR1 .....	101
5.1.2.6. Les transporteurs ABC .....	101
5.1.2.7. La Trypanothione Réductase (TR) .....	102
5.1.2.8. Les topoisomérases .....	102
<b>5.2. La « Pathogen Box ».....</b>	<b>102</b>
<b>5.3. Composés synthétiques .....</b>	<b>103</b>
5.3.1. Inhibition de l'activité des transporteurs ABC.....	103
5.3.2. Amélioration de l'administration des médicaments .....	103
<b>5.4. Composés d'origine végétale et plantes médicinales .....</b>	<b>105</b>
<b>5.5. Peptides antimicrobiens (PAMs) .....</b>	<b>106</b>
5.5.1. Peptides uniques .....	106
5.5.2. Combinaisons peptide-médicament.....	107
<b>5.6. Traitements combinés.....</b>	<b>108</b>
<b>5.7. Repositionnement des médicaments.....</b>	<b>109</b>
 <b>Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires : généralités .....</b>	<b>110</b>
6.1. Découverte et évolution des connaissances des EVs .....	111
6.2. Biogénèse et nomenclature des différents types d'EVs.....	113
6.2.1. Principales catégories d'EVs .....	114
6.2.1.1. Les exosomes (EXOs).....	114
6.2.1.2. Les microvésicules (MVs).....	116
6.2.1.3. Les corps apoptotiques (ApoBDs).....	118
6.2.2. Autres vésicules et particules extracellulaires.....	118
6.2.3. Nomenclature .....	119
<b>6.3. Composition des EVs .....</b>	<b>120</b>
6.3.1. Les protéines .....	121
6.3.2. Les acides nucléiques.....	122
6.3.2.1. L'acide ribonucléique (ARN).....	122



## Table des matières

6.3.2.2. L'acide désoxyribonucléique (ADN).....	123
6.3.3. Les lipides.....	124
6.3.4. Bases de données.....	124
<b>6.4. Tris régulés des cargaisons d'EVs.....</b>	<b>125</b>
6.4.1. Tri des cargaisons exosomales.....	125
6.4.2. Tri des cargaisons microvésiculaires.....	127
<b>6.5. Interactions EVs-cellules réceptrices.....</b>	<b>128</b>
<b>6.6. Principales fonctions des EVs.....</b>	<b>130</b>
 <b>Chapitre 7. Utilisation médicale des EVs et méthodes d'étude.....</b>	<b>133</b>
7.1. Potentiel diagnostique des EVs.....	134
7.2. Potentiel thérapeutique des EVs.....	135
7.2.1. Avantages thérapeutiques « innés » des EVs.....	135
7.2.2. Potentiel des EVs en tant que cible thérapeutique.....	136
7.2.3. Potentiel des EVs en tant que « nanoporteurs ».....	137
7.2.4. Les EVs en tant que vaccins.....	138
<b>7.3. Principales méthodes utilisées pour l'étude des EVs.....</b>	<b>139</b>
7.3.1. Isolement des EVs.....	139
7.3.2. Caractérisation des EVs.....	142
7.3.2.1. Analyses physiques des EVs.....	142
7.3.2.2. Analyses biochimiques des EVs.....	143
7.3.2.2.1. Cargaison en protéines.....	143
7.3.2.2.2. Cargaison en acides nucléiques.....	144
7.3.3. Défis encore non résolus.....	144
 <b>Partie 2 - [Présentation du projet de recherche de doctorat].....</b>	<b>146</b>
1. Problématique.....	147
2. Mise en contexte et orientation du projet de recherche.....	148
3. Hypothèses de recherche.....	150
4. Objectifs de recherche.....	151
 <b>Partie 3 - [Articles scientifiques].....</b>	<b>153</b>

	<b>Unravelling the proteomic signature of extracellular vesicles released by drug-resistant <i>Leishmania infantum</i> parasites.....</b>	<b>154</b>
	<b><i>Leishmania</i> parasites exchange drug-resistance genes through extracellular vesicles .....</b>	<b>193</b>
	<b>Partie 4 - [Discussion].....</b>	<b>226</b>
	<b>Partie 5 - [Conclusion] .....</b>	<b>235</b>
	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>236</b>
	<b>Annexes.....</b>	<b>299</b>
	Annexe 1. Aperçu historique de la découverte de <i>Leishmania</i> .....	300
	Annexe 2. Classification des phlébotomes .....	302
	Annexe 3. Histoire de la taxonomie des phlébotomes .....	303
	Annexe 4. Classification des espèces de <i>Leishmania</i> .....	305
	Annexe 5. Espèces de <i>Leishmania</i> les plus étudiées .....	306
	Annexe 6. Protéines ABC impliquées dans la résistance de <i>Leishmania</i> .....	307
	Annexe 7. Méthodes <i>in silico</i> pour la découverte de nouveaux médicaments .....	308
	Annexe 8. Exemples de traitements combinés contre la leishmaniose.....	309
	Annexe 9. Proposition de biogénèse des exosomes de <i>Giardia</i> .....	310
	Annexe 10. Chargement « endogène » des vésicules extracellulaires.....	311
	Annexe 11. Chargement « exogène » des vésicules extracellulaires .....	312

## Liste des tableaux

### DANS LA PARTIE 1 - [REVUE DE LA LITTÉRATURE] (+ Annexes)

<b>Tableau 1.</b>	Informations clés sur les principaux antileishmaniens actuels. ....	71
<b>Tableau 2.</b>	Exemple de mécanismes de résistance croisée chez <i>Leishmania</i> . ....	95
<b>Tableau 3.</b>	(Annexe 6) Exemples de protéines ABC impliquées dans la résistance de <i>Leishmania</i> . ....	307
<b>Tableau 4.</b>	(Annexe 7) Principales méthodes <i>in silico</i> pour la recherche de nouveaux traitements. ....	308
<b>Tableau 5.</b>	(Annexe 8) Exemples de traitements combinés contre la leishmaniose. ....	309

### DANS LA PARTIE 3 - [ARTICLES SCIENTIFIQUES]

#### Article 1 PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

<b>Table 1.</b>	Differential enrichment of the common proteins identified in EVs released by <i>L. infantum</i> WT and the three mutant strains. ....	178
<b>Table 2.</b>	Unique proteins identified in EVs isolated from WT <i>L. infantum</i> strain. ....	179
<b>Table 3.</b>	Unique proteins identified in EVs isolated from Sb2000.1 <i>L. infantum</i> strain. ....	180
<b>Table 4.</b>	Unique proteins identified in EVs isolated from MF200.5 <i>L. infantum</i> strain. ....	181
<b>Table 5.</b>	Unique proteins identified in EVs isolated from AmB1000.1 <i>L. infantum</i> strain. ....	185

#### Article 2 CellPress

Key resources table. ....	206
---------------------------	-----



## Liste des figures

### DANS LA PARTIE 1 - [REVUE DE LA LITTÉRATURE] (+ Annexes)

<b>Figure 1.</b>	Répartition géographique de la LV et de la LC dans le monde (OMS 2021). .....	30
<b>Figure 2.</b>	Développement de <i>Leishmania</i> dans le phlébotome vecteur [11] .....	38
<b>Figure 3.</b>	Développement de <i>Leishmania</i> dans l'hôte mammifère (adapté de [119]).....	42
<b>Figure 4.</b>	Aperçu de l'immunité contre <i>Leishmania</i> (revu par [192]) .....	48
<b>Figure 5.</b>	Aneuploïdie chez différentes souches de <i>Leishmania</i> [251].....	54
<b>Figure 6.</b>	Model des mécanismes potentiels d'amplifications géniques chez <i>Leishmania</i> [258] .....	56
<b>Figure 7.</b>	Déroulement de l'expression génique chez <i>Leishmania</i> [282].....	58
<b>Figure 8.</b>	Stratégies omiques utilisées dans l'étude de la résistance aux médicaments [482].....	77
<b>Figure 9.</b>	Distinction entre « résistance aux médicaments » et « échec thérapeutique » [538] .....	84
<b>Figure 10.</b>	Exemples de nanoformulations d'administration de médicaments [515].....	104
<b>Figure 11.</b>	Aperçu général des peptides antileishmaniens actuels [699].....	107
<b>Figure 12.</b>	Articles et revues sur les EVs publiés dans PubMed, de 1946 à 2021 [753].....	112
<b>Figure 13.</b>	Représentation des différentes vésicules extracellulaires [764].....	113
<b>Figure 14.</b>	Biogénèse des exosomes (créée à partir de [771, 776])......	115
<b>Figure 15.</b>	Biogénèse des microvésicules (ectosomes) [792].....	117
<b>Figure 16.</b>	Aperçu de la composition générale des vésicules extracellulaire [819] .....	120
<b>Figure 17.</b>	Mécanismes par lesquels les EVs interagissent avec les cellules [921] .....	128
<b>Figure 18.</b>	Principaux "mystères non résolus" (revu par [1099])......	145
<b>Figure 19.</b>	Présentation du projet de recherche de doctorat. ....	146
<b>Figure 20.</b>	Biogénèse des EXOs chez <i>Leishmania</i> (revu par [1105]).....	148
<b>Figure 21.</b>	Triangle R <sup>3</sup> (Résistance-Richesse-Rôle) de <i>Leishmania</i> .....	234
<b>Figure 22.</b>	(Annexe 2) Classification des phlébotomes. ....	302
<b>Figure 23.</b>	(Annexe 4) Classification des espèces de <i>Leishmania</i> . ....	305
<b>Figure 24.</b>	(Annexe 5) Classification des espèces de <i>Leishmania</i> les plus étudiées.....	306
<b>Figure 25.</b>	(Annexe 9) Proposition de biogénèse des exosomes de <i>Giardia</i> .....	310

## DANS LA PARTIE 3 - [ARTICLES SCIENTIFIQUES]

Article 1 PLOS NEGLECTED  
TROPICAL DISEASES

- Fig 1.** EVs released by *L. infantum* parasites differ in morphology and size depending on their drug-resistance background.....173
- Fig 2.** EVs of drug-resistant *L. infantum* show altered particle profiles and EV secretion capacity.....174
- Fig 3.** Characterization of EVs' protein diversity in *L. infantum* parasites. ....175
- Fig 4.** Identification of *L. infantum* EVs' conserved proteins. ....176
- Fig 5.** GO analysis of proteins shared by *L. infantum* WT and drug-resistant strain EVs. ....177

Article 2 CellPress

- Fig 1.** Characterization of EVs of different *L. infantum* and *L. major* strains used in this study.....215
- Fig 2.** Differential enrichment of EV DNA in Sb-sensitive and Sb-resistant parasites.....216
- Fig 3.** Demonstration of HGT events leading to the transmission of the *mrpA* amplicon from drug-resistant to drug-sensitive strains of *L. infantum* .....217
- Fig 4.** Demonstration of HGT and IGT events leading to the transmission of the *DHFR-TS* circular amplicon from *L. major* drug-resistant parasites to *L. major* and *L. infantum* drug-sensitive strains .....218
- Fig 5.** Demonstration of HGT events leading to the transmission of artificial plasmid containing *BSD* and *mCherry* genes.....219
- Fig 6.** Detection of *mCherry* signal by fluorescence microscopy in naive recipient parasites after exposure to *BSD-mCherry*-EVs.....220
- Fig 7.** Evaluation of the impact of drug-resistant EVs on the drug-sensitivity profile, control of ROS, and general fitness of WT drug-sensitive parasites .....221



## 📄 Liste des sigles et abréviations

### A

<b>AAV</b>	<i>Adeno Associated Virus</i> (virus adéno-associé)
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>ADNdb</b>	ADN double brin
<b>ADNg</b>	ADN génomique
<b>ADNk</b>	ADN kinétoplastidique
<b>ADNmt</b>	ADN mitochondrial
<b>ADNsb</b>	ADN simple brin
<b>AdoMet</b>	S-adénosylméthionine
<b>ADR</b>	<i>Arginine Deprivation Response</i> (réponse à la privation d'arginine)
<b>AG</b>	Andrographolide
<b>AGO</b>	Argonautes
<b>AHCC</b>	<i>Active Hexose Correlated Compound</i> (composé corrélé à l'hexose actif)
<b>ALP</b>	Allopurinol
<b>AM</b>	Antimoniate de méglumine
<b>AmB</b>	Amphotéricine B
<b>ApoBDs</b>	<i>Apoptotic bodies</i> (corps apoptotiques)
<b>ApoExos</b>	<i>Apoptotic exosomes</i> (exosomes apoptotiques)
<b>ApoMVs</b>	<i>Apoptotic microvesicles</i> (microvésicules apoptotiques)
<b>AQP1</b>	Aquaglycéroporine 1
<b>ARF6</b>	<i>ADP-ribosylation factor 6</i> (facteur 6 de l'ADP-ribosylation)
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	ARNs messagers
<b>ARNt</b>	ARNs de transfert
<b>As<sup>III</sup></b>	Arsenic
<b>ASTMH</b>	<i>American Society of Tropical Medicine and Hygiene</i> (société américaine de médecine tropicale et d'hygiène)

## Liste des sigles et abréviations

	<b>ATP</b>	Adénosine-triphosphate
	<b>AVC</b>	Accident Vasculaire Cérébral
<b>B</b>	<b>BCA</b>	<i>BiCinchoninic acid</i> (acide BiCinchonique)
	<b>BioNLP</b>	<i>Biomedical Natural Language Processing</i> (Traitement biomédical du langage naturel)
<b>C</b>	<b>CADD</b>	<i>Computer-Aided Drug Design</i> (Conception de médicaments assistée par ordinateur)
	<b>CARD</b>	<i>Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i> (Base de données complète sur la résistance aux antibiotiques)
	<b>C<math>\beta</math>S</b>	Cystathionine $\beta$ synthase
	<b>CD</b>	Cellules Dendritiques
	<b>CDPK1</b>	<i>Calcium Dependent Protein Kinase 1</i> (Protéine kinase dépendante du calcium 1)
	<b>cfDNA</b>	<i>Circulating cell-free DNA</i> (ADN acellulaire circulant)
	<b>CLIA</b>	<i>Clinical Laboratory Improvement Amendments</i> (Modifications relatives à l'amélioration des laboratoires cliniques)
	<b>CMH</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
	<b>CNV</b>	<i>Copy Number Variation</i> (Variation du nombre de copies)
	<b>CPNPC</b>	Cancer du poumon non à petites cellules
	<b>CPP</b>	<i>Cell-Penetrating Peptide</i> (Peptide pénétrant dans les cellules)
	<b>CSMs</b>	Cellules Souches Mésenchymateuses
<b>D</b>	<b>ddPCR</b>	<i>Digital Droplet PCR</i> (PCR de gouttelettes numérique)
	<b>DDT</b>	Dichlorodiphényltrichloroéthane
	<b>DGUC</b>	<i>Density Gradient Ultracentrifugation</i> (Ultracentrifugation à gradient de densité)
	<b>DPD</b>	Dompéridone
<b>E</b>	<b>EGT</b>	<i>Endosymbiotic Gene Transfers</i> (Transferts de gènes endosymbiotiques)
	<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Dosage immuno-enzymatique)
	<b>ESCRT</b>	<i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i> (Complexes de tri endosomal requis pour le transport)
	<b>EVs</b>	<i>Extracellular Vesicles</i> (Vésicules extracellulaires)
	<b>EXOs</b>	Exosomes

## Liste des sigles et abréviations

<b>F</b>	<b>FAZ</b>	<i>Flagellum Attachment Zone</i> (Zone de fixation du flagelle)
	<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i> (Administration des aliments et des médicaments)
<b>G</b>	<b>G6PDH</b>	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
	<b>GP63</b>	Glycoprotéine 63
	<b>GSH</b>	Glutathion
<b>H</b>	<b>HGPRT</b>	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase
	<b>HGT</b>	<i>Horizontal Gene Transfers</i> (Transferts horizontaux de gènes)
	<b>HTS</b>	<i>High Throughput Sequencing</i> (Séquençage à haut débit)
	<b>hnRNP</b>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i> (Ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes)
	<b>HPS</b>	<i>Haptomonad Parasite Sphere</i> (Structure sphérique formée par les promastigotes haptomonades)
	<b>HO-1</b>	Hème oxygénase 1
	<b>HRM-PCR</b>	<i>High Resolution Melting - PCR</i> (PCR d'analyse de fusion à haute résolution)
	<b>HSC71</b>	<i>Heat Shock Cognate Protein 71</i> (Protéine apparentée au choc thermique 71)
	<b>HSP70</b>	<i>Heat Shock Protein 70</i> (Protéine de choc thermique 70)
	<b>I</b>	<b>IDSA</b>
<b>ILVs</b>		<i>Intraluminal Vesicles</i> (Vésicules intraluminales)
<b>IP</b>		Immunoprécipitation
<b>ISEV</b>		<i>International Society for Extracellular Vesicles</i> (Société internationale des vésicules extracellulaires)
<b>ISTH</b>		<i>International Society on Thrombosis and Haemostasis</i> (Société internationale de thrombose et d'hémostase)
<b>J</b>	<b>JBP1</b>	<i>J-DNA-binding protein 1</i> (Protéine 1 de liaison à l'ADN-J)
<b>K</b>	-	-
<b>L</b>	<b>LBA</b>	Lavage Broncho-Alvéolaire
	<b>LBPA</b>	<i>Lysobisphosphatidic acid</i> (Acide lysobisphosphatidique)
	<b>LC</b>	Leishmaniose Cutanée
	<b>LCan</b>	Leishmaniose Canine

## Liste des sigles et abréviations

<b>LCD</b>	Leishmaniose Cutanée Diffuse
<b>LCL</b>	Leishmaniose Cutanée Localisée
<b>LCR</b>	Liquide Céphalo-Rachidien
<b>LC-IMS-MS</b>	<i>Liquid Chromatography-Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry</i> (Chromatographie liquide-spectrométrie de mobilité ionique-spectrométrie de masse)
<b>LC-MS/MS</b>	<i>Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry</i> (Chromatographie liquide avec spectrométrie de masse en tandem)
<b>LdMT</b>	Transporteur de miltefosine
<b>LFR1</b>	<i>Leishmania Ferric iron Reductase 1</i> (réductase ferrique 1 de <i>Leishmania</i> )
<b>LGN</b>	<i>Leishmania Genome Network</i> (réseau du génome de <i>Leishmania</i> )
<b>LHR1</b>	<i>Leishmania Heme Response 1</i> (protéine transmembranaire)
<b>LIT1</b>	<i>Leishmania Iron Transporter 1</i> (transporteur de fer 1 de <i>Leishmania</i> )
<b>LMC</b>	Leishmaniose muco-cutanée
<b>LME</b>	Liste des Médicaments Essentiels
<b>LPG</b>	Lipophosphoglycanes
<b>LPV</b>	Lopinavir
<b>LV</b>	Leishmaniose Viscérale
<b>MF</b>	Miltefosine
<b>miARNs</b>	micro-ARNs
<b>MIP</b>	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i> (Protéine inflammatoire des macrophages)
<b>miRISC</b>	<i>miRNA-induced silencing complex</i> (complexe de silençage des miARNs)
<b>MISEV</b>	<i>Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles</i> (Informations minimales pour les études sur les vésicules extracellulaires)
<b>MMV</b>	<i>Medicines for Malaria Venture</i> (Médicaments contre le paludisme)
<b>MRP1</b>	<i>Multidrug Resistance Protein 1</i> (Protéine de résistance multidrogues)
<b>MTN</b>	Maladie Tropicale Négligée
<b>MTX</b>	Méthotrexate
<b>MVs</b>	Microvésicules
<b>MVBs</b>	<i>Multivesicular Bodies</i> (Corps multivésiculaires)

M

## Liste des sigles et abréviations

	<b>MVP</b>	<i>Major Vault Protein</i> (Protéine de voûte majeure)
	<b>MWCO</b>	<i>Molecular Weight Cutoff</i> (Seuil de poids moléculaire)
<b>N</b>	<b>NO</b>	<i>Nitric Oxide</i> (Oxide Nitrique)
	<b>nt</b>	Nucléotides
	<b>NTA</b>	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> (Analyse de suivi des nanoparticules)
<b>O</b>	<b>ODC</b>	Ornithine décarboxylase
	<b>ODD</b>	Objectifs de développement durable
	<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
	<b>OMV</b>	<i>Outer Membrane Vesicles</i> (Vésicules de la membrane externe) (bactéries)
<b>P</b>	<b>PAM</b>	Peptides Antimicrobiens
	<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Réactions en chaîne par polymérase)
	<b>PID</b>	Pulvérisation Intra-Domiciliaire
	<b>PKDL</b>	<i>Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis</i> (leishmaniose dermique post-kala-azar)
	<b>PMM</b>	Paromomycine
	<b>PPG</b>	Protéophosphoglycane
	<b>PPI</b>	<i>Protein-Protein Interactions</i> (Interactions protéine-protéine)
	<b>PS</b>	Phosphatidylsérine
	<b>PSG</b>	<i>Promastigote Secretory Gel</i> (Gel sécrété par les promastigotes)
	<b>PSGL-1</b>	<i>P-Selectin Glycoprotein Ligand 1</i> (Ligand de la glycoprotéine P-Sélectine)
	<b>PTD</b>	Pentamidine
	<b>PTU</b>	<i>Polycistronic Transcription Units</i> (Unités de transcription polycistronique)
	<b>P-gp</b>	Glycoprotéine de perméabilité
<b>Q</b>	<b>qPCR</b>	<i>Quantitative PCR</i> (PCR quantitative)
<b>R</b>	<b>RBP</b>	<i>RNA-binding protein</i> (protéine de liaison à l'ARN)
	<b>RE</b>	Réticulum Endoplasmique
	<b>RFLP</b>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (polymorphisme de longueur des fragments de restriction)
	<b>ROCK</b>	<i>Rho-associated protein kinase</i> (Protéine kinase associée à Rho)
	<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espèces réactives de l'oxygène)



## Liste des sigles et abréviations

	<b>RT-PCR</b>	<i>Reverse Transcriptase PCR</i> (PCR à transcription inverse)
<b>S</b>	<b>SAG</b>	<i>Sodium Antimony Gluconate</i> (Gluconate d'antimoine sodique)
	<b>Sb<sup>III</sup></b>	Antimoine trivalent
	<b>Sb<sup>V</sup></b>	Antimoine pentavalent
	<b>siARNs</b>	<i>Small Interfering ARNs</i> (Petits ARN interférents)
	<b>SNAREs</b>	<i>Soluble N-éthylmaleimide sensitive factor Attachment protein Receptor</i> (Les protéines du récepteur de la protéine d'attachement du facteur sensible au N - éthylmaléimide)
	<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polymorphisme de nucléotide unique)
	<b>SSG</b>	Sodium Stibogluconate
	<b>SR</b>	Séquences répétées
<b>T</b>	<b>TAMEL</b>	<i>Targeted And Modular EVs Loading</i> (Chargement ciblé et modulaire des EVs)
	<b>TEM</b>	<i>Transmission Electron Microscopy</i> (microscopie électronique à transmission)
	<b>TR</b>	Trypanothione Réductase
	<b>TRPS</b>	<i>Tunable Resistive Pulse Sensing</i> (Détection d'impulsion résistive accordable)
	<b>TVV</b>	<i>Trichomonas vaginalis virus</i> ( <i>virus Trichomonas vaginalis</i> )
	<b>T(SH)2</b>	Trypanothione
<b>U</b>	<b>UC</b>	Ultracentrifugation
	<b>V</b>	
	<b>VIH</b>	Virus de l'immunodéficience humaine
	<b>VP</b>	Vacuole parasitophore
<b>W</b>	<b>WGS</b>	<i>Whole Genome Sequencing</i> (Séquençage du génome entier)
	-	-
<b>X</b>		
<b>Y</b>	<b>YBX1</b>	<i>Y box binding protein 1</i> (Protéine de liaison à la boîte Y 1)
<b>Z</b>	-	-



*A ma famille, qui m'a toujours soutenue, malgré cette longue distance qui nous sépare.*

## Remerciements

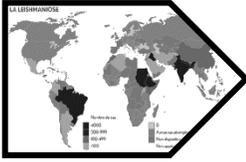
Il y a quelques années en arrière j'étais chez moi, à réfléchir à l'avenir et à me demander où continuer ma carrière professionnelle. Tant de questions que bon nombre d'entre nous se posent à un moment ou un autre. A cette époque est-ce que j'avais imaginé que j'en serais là aujourd'hui ? Bientôt diplômée d'une thèse et nouvellement maman d'un adorable bébé ? non, absolument pas ! Est-ce que je regrette d'être partie si loin de chez moi ? Non, mais évidemment le facteur « famille » a été à l'origine de plusieurs doutes quant au départ réel pour cette aventure, et de plusieurs moments difficiles. Partir à « l'autre bout du monde » (bon, pas exactement, mais vous avez compris le principe), n'est pas une chose facile, en tout cas l'idée ne l'était pas pour moi. Si aujourd'hui j'ai réussi à accomplir toutes ces choses dont je suis fière, c'est justement grâce à **ma famille**, qui malgré la difficulté du départ m'a toujours soutenue et encouragée dans mes choix ; grâce à **mon conjoint** et à **mon chat** (oui oui, très important aussi ! 🐾) qui m'ont accompagnée dans cette aventure et qui ont su me reconforter dans les coups durs ; et grâce aux personnes formidables que j'ai eu la chance de rencontrer ici, qui m'ont également soutenue au cours de cette aventure, et dont je souhaite adresser mes remerciements. Tout d'abord, à mon directeur de recherche, **Dr Christopher Fernandez-Prada**, et mon codirecteur de recherche, **Dr Martin Olivier**, pour m'avoir permis de réaliser ce projet de thèse, pour leur savoir et leur expertise, pour la confiance qu'ils ont su m'accorder, et pour toutes les opportunités qu'ils m'ont offertes ; au **Dr David Langlais**, pour son savoir et son expertise en génomique ; à mes collègues de laboratoire, qui en plus de m'avoir accompagné/aidé lorsque j'en avais besoin, sont devenu(e)s des ami(e)s qui comptent beaucoup pour moi, en particulier **Lorena, Chloé, Audrey, Ana, Victoria, Simon, Max, Francesca et Rafael** ; à **Claudia et Fannie**, pour leur sagesse, leur gentillesse et leur aide pour certaines expériences et/ou analyses ; au **Dre Aida Minguéz-Menendez**, pour son incroyable talent en graphisme ; à **Atia** (étudiante du Dr Langlais) et **George** (étudiant du Dr Olivier), pour leurs connaissances et leur précieuse aide dans certaines expériences et analyses ; et aux étudiant.e.s des labos voisins, en particulier **Marêva, Kelsey, Yaima, Nickolas, Laura G, Laura F, Yaindrys et Jonathan** pour leurs conseils et pour les bons moments passés ensemble. Par ailleurs, je remercie également **Dr Nahuel Fittipaldi, Dre Julie Brind'Amour, et Dre Maritza Jaramillo**, qui ont accepté d'évaluer mon travail en étant président-rapporteur, membre du jury et examinatrice externe, respectivement ; la **FMV** et l'**UdeM**, pour avoir accepté ma candidature au Ph.D. ; les **personnes-ressources facultaires** (TGDE) pour leur gentillesse et pour m'avoir aidé dans diverses procédures en lien avec mon dossier universitaire ; les **regroupements** (**Gremip, Op+Lait, Cripa,..**) pour leurs activités scientifiques qui ont enrichies mes connaissances ; et finalement, les **organismes subventionnaires** (**FRQNT, CRSNG,...**) et les **donateurs/partenaires financiers de l'UdeM**, pour m'avoir permis d'obtenir des bourses d'études : un soutien financier précieux !

Merci ! 😊



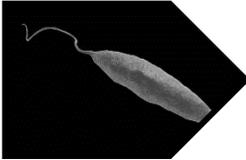
## Partie 1 - [Revue de la littérature]

# 1



[Chapitre 1. La leishmaniose : généralités](#)

# 2



[Chapitre 2. Le parasite \*Leishmania\*](#)

# 3



[Chapitre 3. Prévention et traitement contre la leishmaniose](#)

# 4



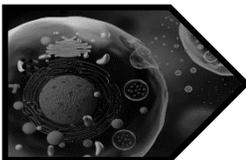
[Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez \*Leishmania\*](#)

# 5



[Chapitre 5. Quels nouveaux traitements contre la résistance ?](#)

# 6



[Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires : généralités](#)

# 7



[Chapitre 7. Utilisation médicale des EVs et méthodes d'étude](#)



# Chapitre 1. La leishmaniose : généralités



- [1.1. Aperçu historique de la leishmaniose](#)
- [1.2. Transmission de la maladie](#)
- [1.3. Distribution géographique de la leishmaniose](#)
- [1.4. Manifestations cliniques de la leishmaniose](#)
- [1.5. Diagnostic de la maladie](#)

## Chapitre 1. La leishmaniose : généralités

Comme indiquée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la leishmaniose est une maladie à transmission vectorielle, causée par des protozoaires flagellés du genre *Leishmania*.

### 1.1. Aperçu historique de la leishmaniose

La leishmaniose est une maladie vectorielle tropicale négligée de longue date, qui aurait fait son apparition vers l'an 2500 avant Jésus-Christ (revu par [1]). Les premières traces fossiles du parasite *Leishmania* ont été retrouvées dans la trompe et le tube digestif du phlébotome vecteur *Palaeomyia burbiti*, conservée dans de l'ambre de Birmanie datant du Crétacé [2]. Comme nous le verrons plus tard dans ce chapitre, la leishmaniose peut se présenter sous différentes formes chez l'humain ([section 1.4.1.](#)) (principalement la leishmaniose cutanée (LC), la leishmaniose viscérale (LV), et la leishmaniose muco-cutanée (LMC)) et peut également se développer chez le chien (LCan) ([section 1.4.2.1.](#)), et plus rarement, chez le chat ([section 1.4.2.2.](#)) et chez d'autres animaux ([section 1.4.2.3.](#)). Ainsi, des textes anciens ont permis de retrouver la première description de la maladie, correspondant à des lésions similaires aux lésions actuelles de la LC (revu par [1]). Dès l'époque précolombienne, des statuettes et des poteries péruviennes ont ensuite illustré la LMC (connue à l'époque sous le nom de « plaie orientale »), en mettant en évidence une lésion mutilante du nez. Certaines de ces œuvres sont d'ailleurs exposées dans des musées du Pérou.

Pour ce qui est de la LV, elle était connue sous le nom de « Kala-azar » (le mal noir) et elle était facilement confondue avec d'autres maladies, tels que le paludisme. Bien que la forme LV soit absente de toute source historique jusqu'au XIX<sup>ème</sup> siècle, elle était pourtant bien présente dès l'Antiquité (revu par [3]). Elle fut d'ailleurs récemment identifiée chez des momies de l'Égypte ancienne et de la Haute-Nubie [4]. Plus précisément, dans leurs travaux, Zink et *al.*, ont analysé des échantillons de tissus osseux provenant de momies égyptiennes et ils ont réussi à amplifier par réactions en chaîne par polymérase (« PCR », pour « *Polymerase Chain Reaction* ») un fragment de 120 pb d'ADN mitochondrial (ADNmt) du kinétoplaste de *Leishmania* [4]. Plus généralement, divers rapports permettent de reconstituer une chronologie des différentes découvertes concernant la leishmaniose. Quelques événements s'étant déroulés entre le 18<sup>ème</sup> et 20<sup>ème</sup> siècle sont présentés ci-dessous et un aperçu plus détaillé de l'histoire des descriptions de *Leishmania* est disponible en [Annexe 1](#) (revu par [1]).

- **1756** | Russel : 1<sup>ère</sup> description clinique détaillée de la LC
- **1898** | Borovsky : 1<sup>ère</sup> description de l'agent causal de la plaie orientale ; référence aux protozoaires
- **1901** | Identification des corps de Leishman-Donovan et lien avec le Kala Azar [5-7]

## Chapitre 1. La leishmaniose : généralités

- **1903** | Les corps de Leishman-Donovan sont nommés *Leishmania donovani*
- **1908** | Nicolle : 1<sup>ère</sup> isolation des parasites chez un nourrisson (*Leishmania* « *infantum* »)
- **1908** | Nicolle et Comple : 1<sup>ère</sup> isolation des parasites chez des chiens infectés
- **1911** | Vianna : 1<sup>ère</sup> description de *L. braziliensis* (Genre *Viannia*)
- **1921** | Sergent : preuve du rôle des phlébotomes dans la transmission de la maladie [8]

## 1.2. Transmission de la maladie

### 1.2.1. Modes de transmission

Pour être considérés comme des vecteurs (vecteurs « avérés ») de maladies, les organismes concernés doivent répondre aux critères d'incrimination des vecteurs (proposés par Killick-Kendrick et par le comité d'experts de l'OMS spécialisés sur le contrôle de la leishmaniose [9] et revu par [10]) qui sont les suivants :

*(i) ils se nourrissent de composants humains (ils sont anthropophiles), (ii) ils se nourrissent des hôtes réservoirs concernés dans le cas des agents zoonotiques, (iii) ils se retrouvent dans la nature, infectés par les mêmes parasites (les espèces de Leishmania) circulant chez l'homme (de la même aire géographique) ; (iv) ils favorisent le développement complet des parasites Leishmania circulant chez l'homme, y compris après la défécation des restes de repas sanguin ; et (v) ils sont capables de transmettre ces parasites à des hôtes sensibles lorsqu'ils prennent un repas de sang (revu par [11]).*

Ainsi, la leishmaniose est une maladie à transmission vectorielle, ayant comme vecteurs des phlébotomes ([section 1.2.2.](#)) femelles hématophages ; les mâles n'étant pas aptes à prendre un repas sanguin et ne répondant pas aux critères d'incrimination cités ci-dessus. Outre les phlébotomes, d'autres arthropodes (tels que les tiques) semblent également pouvoir constituer des vecteurs potentiels de *L. infantum* [12]. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires afin de vérifier les hypothèses et de mieux comprendre les caractéristiques relatives aux interactions entre *Leishmania* et les tiques. Par ailleurs, bien que plus rare, la transmission du parasite peut également s'effectuer même si le phlébotome est écrasé sur la peau ou sur les muqueuses. Finalement, même si moins connu, la leishmaniose peut aussi se propager par contact direct entre des hôtes infectés, par morsures de chiens, par échanges de sang (transfusion, aiguilles souillées, transmission *via* le placenta) et de sécrétions, ou lors de transplantations d'organes [13, 14] et revu par [15].

## 1.2.2. Les phlébotomes vecteurs

### 1.2.2.1. Classification des phlébotomes

Initialement, les études sur la taxonomie des phlébotomes reposaient exclusivement sur l'analyse morphologique des spécimens morts, mais grâce au développement de nouvelles méthodes, les connaissances sur la systématique des phlébotomes ont grandement évolué. Ainsi, les phlébotomes sont actuellement classés selon les rangs taxonomiques suivants : Règne : **Animalia** (Animaux), Embranchement : **Arthropoda** (Arthropodes), Classe : **Insecta** (Insectes), Ordre : **Diptera** (Diptères), Famille : **Psychodidae** (Bigot, 1854), Sous-famille : **Phlebotominae** (Phlébotomes) (Kertész, 1904) (revu par [1]). De plus, l'acquisition de nouvelles connaissances a amené à subdiviser la sous-famille Phlebotominae (Phlébotomes) en six genres, répartis également entre l'Ancien et le Nouveau Monde (revu par [1]). Un aperçu de cette classification (d'ailleurs largement utilisée de nos jours) est disponible en [Annexe 2](#), et un aperçu plus précis de l'ensemble de l'histoire de la taxonomie des phlébotomes est disponible en [Annexe 3](#) (revu par [1]). Finalement, parmi les nombreuses espèces de phlébotomes identifiées (plus de 900), 70 espèces ont été reconnues comme des vecteurs potentiels de maladies, et environ 40 espèces ont été identifiées comme vecteurs prouvés des parasites protozoaires du genre *Leishmania* (revu par [16]).

### 1.2.2.2. Les phlébotomes : d'importants vecteurs de la leishmaniose

Comme évoqué précédemment, la leishmaniose est classiquement transmise par les phlébotomes femelles hématophages. Ces vecteurs appartiennent essentiellement au genre ***Phlebotomus*** (Rondani & Berté, 1840) dans l'Ancien Monde, et au genre ***Lutzomyia*** (França, 1924) dans le Nouveau Monde. Toutefois, le genre ***Sergentomyia*** (França & Parrot, 1920) est aussi suspecté d'être un vecteur potentiel de *Leishmania* [17, 18]. Par ailleurs, au cours du temps, les différentes espèces de phlébotomes et de *Leishmania* ont fait face à la pression sélective de l'évolution de la vie, en particulier les changements écologiques naturels. Une conséquence de ce phénomène est notamment l'apparition d'une relation étroite et spécifique entre certaines espèces de phlébotomes et de *Leishmania* ; un exemple bien connu étant *P. papatasi* et *L. major* [19]. Plus généralement, lorsqu'un phlébotome femelle prend un repas sanguin sur un hôte infecté, il ingère les parasites sous leur forme amastigote, qui vont ensuite poursuivre leur développement au sein du vecteur ([chapitre 2, section 2.2.1.](#)). La transmission classique du parasite *Leishmania* à son hôte ([section 1.2.3.](#)) se fait ensuite lors du repas sanguin du phlébotome femelle infecté ([chapitre 2, section 2.2.2.](#)).

### 1.2.3. Hôtes et réservoirs

La leishmaniose touche essentiellement l'**humain** ([section 1.4.1.](#)) et le **chien** ([section 1.4.2.1.](#)), mais plusieurs cas ont également été rapportés chez d'autres animaux, tels que les **chats** ([section 1.4.2.2.](#)), les **moutons** et les **chevaux** ([section 1.4.2.3.](#)). Du fait de leur proximité avec les populations humaines, les chiens domestiques constituent un important réservoir de la leishmaniose, principalement dans la zone méditerranéenne et en Amérique du Sud (revu par [20, 21]). Plusieurs autres animaux peuvent également représenter d'importants réservoirs de *Leishmania*, tels que les **lézards**, les  **paresseux**, le **tatou**, l'**opossum** et certains **rongeurs**. Ces derniers sont d'ailleurs connus pour exercer ce rôle de manière significative en Asie et en Afrique. Finalement, l'humain peut aussi se comporter lui-même comme un réservoir de la maladie (on parle de leishmaniose anthroponotique), surtout dans les zones urbaines où la population est dense.

## 1.3. Distribution géographique de la leishmaniose

La leishmaniose est présente un peu partout dans le monde (Figure 1) et est considérée comme une maladie endémique dans les régions tropicales et subtropicales (revu par [22]). Plus précisément, plus de 70% des cas mondiaux de LC, et plus de 90% des cas mondiaux de LV, proviennent des pays d'Afrique (18%\*), d'Asie (60%\*) et d'Amérique du Sud (8,4%\*) (revu par [23-25]). La LMC se limite quant à elle essentiellement à l'Amérique Latine (avec 90% des cas situés au Brésil (2,7%\*), au Pérou (0,4%\*), et/ou en Bolivie (0,15%\*)) et à l'Éthiopie (1,5%\*) (revu par [25]). Finalement, la LCan est largement répandue dans la région méditerranéenne, au Moyen-Orient et dans certains pays d'Asie centrale et d'Amérique du Sud (revu par [26]). Cependant, cette distribution géographique de la leishmaniose n'est pas fixe et plusieurs facteurs peuvent l'influencer, tels que le tourisme, les importations de chiens, le réchauffement climatique (mouvements du vecteur), l'insalubrité, la proximité physique des chiens, etc. Par exemple, un cas de leishmaniose a récemment été confirmé au Québec, chez un chien importé du Maroc [27]. Par ailleurs, la susceptibilité à *Leishmania* demeure plus élevée chez les personnes atteintes du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Ainsi, depuis 2012, 35 pays (au sein desquels la leishmaniose est endémique) ont rapportés des cas de co-infection VIH-*Leishmania* ; le VIH étant ainsi également considéré comme un facteur pouvant augmenter la répartition du nombre de cas de leishmaniose. En effet, les personnes vivant avec le VIH et infectées par la leishmaniose développent des lésions plus sévères et présentent des taux de rechute et/ou de mortalité élevés. Plus généralement, depuis 1993, l'aire de répartition géographique de la leishmaniose ne cesse d'augmenter (revu par [28]). Toutefois, sur les 98 pays considérés à risque, seulement 1/3 ont des

\* Pourcentage par rapport à la population mondiale, estimée en 2021



## Chapitre 1. La leishmaniose : généralités

obligations légales sur la déclaration du nombre de personnes atteintes par la maladie, rendant difficile le chiffrage précis des cas. Finalement, il est aussi fort probable que de nombreux cas qui sévissent dans les pays en développement restent inconnus, en raison de l'accessibilité limitée/inexistante aux systèmes de soin.

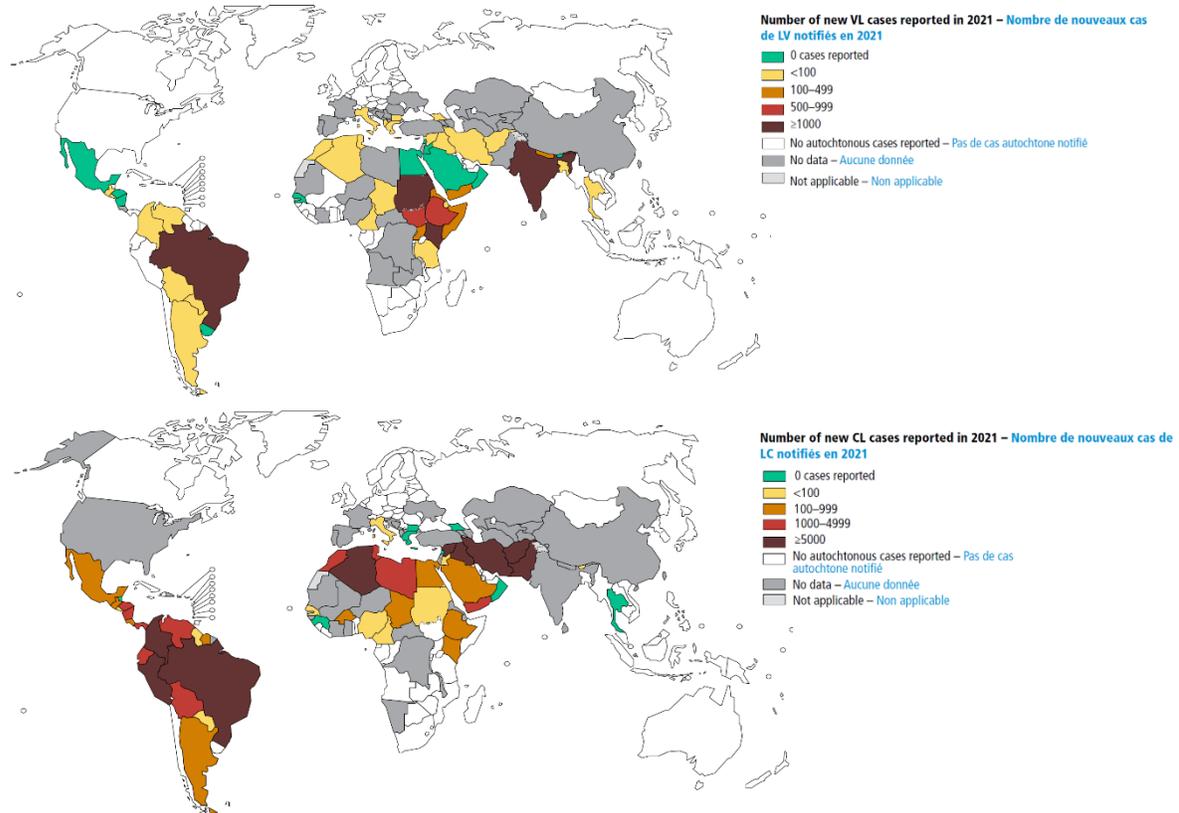


Figure 1. Répartition géographique de la LV et de la LC dans le monde (OMS 2021).

## 1.4. Manifestations cliniques de la leishmaniose

### 1.4.1. Chez l'humain

#### 1.4.1.1. Leishmaniose viscérale

La **leishmaniose viscérale** (LV) est la forme la plus sévère de la maladie, avec environ 0,5 à 0,9 million de nouveaux cas chaque année dans le monde, selon l'OMS. Elle est aussi connue sous le nom « Kala-azar » (le mal noir) et est souvent associée à la guerre, à la pauvreté et à des systèmes de soins défaillants (revu par [29]). Contrairement aux autres formes courantes de la leishmaniose (à savoir la leishmaniose cutanée ([section 1.4.1.2.](#)) et la leishmaniose muco-cutanée ([section 1.4.1.3.](#))), les symptômes de la LV se produisent

## Chapitre 1. La leishmaniose : généralités

en interne, et rendent difficiles la détection et la guérison de la maladie (revu par [24]). Plus précisément la LV peut être divisée en trois formes (asymptomatique, subclinique et clinique [30]) et peut se manifester par de la fièvre, de la diarrhée, une perte de poids, une hépatosplénomégalie, et une anémie (revu par [31]). Bien qu'il existe une trentaine d'espèces de *Leishmania* qui infectent les mammifères [32] ([chapitre 2, section 2.1.2.](#)), la LV n'est classiquement causée que par *L. donovani* et *L. infantum* [33]. Toutefois, chez les patients immunodéprimés, il arrive (de manière exceptionnelle) que les espèces de *Leishmania* dermatotropes atteignent les viscères et provoquent la LV (revu par [31]). Outre cet aspect, l'immunosuppression constitue un facteur de risque important de LV, notamment en raison de la persistance du parasite. Plus précisément, la période d'incubation classique pour la LV varie généralement de 2 à 6 mois, mais chez les patients immunodéprimés, les parasites viables peuvent persister pendant des décennies, puis se réactiver et provoquer la maladie (revu par [34]). Finalement, si elle n'est pas traitée, la LV entraîne un taux de mortalité élevé chez l'humain, et après un traitement efficace de la LV causée par *L. donovani*, la leishmaniose dermique post-kala-azar peut parfois se développer ([section 1.4.1.4.](#)).

### 1.4.1.2. Leishmaniose cutanée

La **leishmaniose cutanée** (LC) est la forme la plus courante de la maladie, avec entre 0,6 et 1 million de nouveaux cas dans le monde chaque année, selon l'OMS. Pour être plus précis, la LC se présente sous trois formes : **(i)** la LC localisée (LCL) qui se caractérise par des lésions cutanées et des ulcères, laissant souvent des cicatrices permanentes ; **(ii)** moins courante, la LC diffuse (LCD) qui se distingue de la LCL par l'apparition et la progression lente de nodules (sans ulcération) sur tout le corps (revu par [3]), et **(iii)** la leishmaniose muco-cutanée (LMC), présentée dans la [section 1.4.1.3.](#) Les lésions cliniques apparaissent généralement après une période d'incubation de plusieurs mois. Par conséquent, étant donné que l'infection se produit principalement pendant les mois d'été (climat adéquat pour les phlébotomes), c'est surtout pendant les mois d'hiver que la maladie apparaît. Pour mieux comprendre, des papules apparaissent, grossissent, puis se transforment en nodules ou en plaques, généralement dans les 6 mois. Dans le cas de la LCL, les nodules s'ulcèrent et une croûte brunâtre recouvre la zone d'infection (revu par [35]). Finalement, par sa capacité à imiter un grand nombre de dermatoses, la LC est aussi nommée « maladie imitatrice » (revu par [36]).

### 1.4.1.3. Leishmaniose muco-cutanée

Après guérison de la LC, il arrive parfois que la maladie réapparaisse et se propage aux muqueuses du nez,

## Chapitre 1. La leishmaniose : généralités

de la bouche et de la gorge : c'est la **leishmaniose muco-cutanée** (LMC). Le développement des ulcères des muqueuses provoque ensuite la destruction de la cloison nasale, des lèvres et du palais, amenant à une défiguration faciale étendue (revu par [3]). D'après plusieurs études, la LMC se développe chez la moitié des patients, 2 ans après la primo-infection de LC, et chez 90% des patients dans les 10 ans.

### 1.4.1.4. Leishmaniose dermique post-kala-azar

La **leishmaniose dermique post-kala-azar** (« PKDL », pour « *Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis* ») est une éruption cutanée chronique qui se développe généralement après un traitement efficace de la LV causée par *L. donovani* (revu par [31]). Cette forme de la maladie commence par des macules et des papules érythémateuses situées autour de la zone péribuccale, puis progresse par une éruption nodulaire qui se propage sur tout le corps. En fonction de l'atteinte corporelle de la maladie, la PKDL est classée en trois grades : (1) atteinte du visage uniquement (dans ce cas-ci la maladie est spontanément résolutive) ; (2) atteinte du visage et du tronc (et parfois des muqueuses) ; (3) atteinte du visage, du tronc et des extrémités du corps (revu par [31]). Dans les deux derniers cas, les patients nécessitent un traitement pour lutter contre la maladie [37-39]. D'un point de vue géographique, des études ont montré une variation dans la nature de la PKDL. A titre d'exemple, cette forme de la maladie est peu fréquente (5% à 10% des patients) dans le sous-continent indien et ne survient qu'un à deux ans après le traitement de la LV, alors qu'au Soudan elle se développe très rapidement (chez 50% à 60% des patients), généralement au cours des 6 premiers mois de traitement de la LV. Toutefois, bien que la maladie persiste, il semblerait qu'une guérison spontanée se produise dans la majorité des cas du Soudan (revu par [31]).

## 1.4.2. Chez les animaux

### 1.4.2.1. Leishmaniose Canine

La **leishmaniose canine** (LCan) correspond au développement de la maladie chez le chien domestique, d'ailleurs considéré comme le principal hôte réservoir de *L. infantum*. Cette maladie est potentiellement mortelle mais l'issue de l'infection chez les chiens est variable et dépend de la réponse immunitaire de chaque animal (revu par [21]). De plus, beaucoup de chiens sont des porteurs asymptomatiques, ce qui limite la détection de la maladie (revu par [40]). Principalement causée par *L. infantum*, quelques cas de LCan causée par *L. major* et *L. tropica* ont été documentés [41]. Longtemps ignorée, les données sur le nombre de cas

## Chapitre 1. La leishmaniose : généralités

réels et sur la propagation de la LCan n'ont été disponibles que tardivement, contrairement à la leishmaniose humaine. Par ailleurs, dans certains pays, notamment ceux de la région des Balkans, la majorité des données sur la LCan sont écrites dans les langues autochtones des Balkans, ce qui les rends difficilement compréhensibles (revu par [42]).

### 1.4.2.2. Leishmaniose féline

Bien que les chiens constituent le principal réservoir de la leishmaniose, les phlébotomes peuvent également se nourrir du sang des chats [43]. Par conséquent, de même que pour les chiens, les chats infectés peuvent également constituer des réservoirs urbains de la LV, transmettre le parasite à d'autres phlébotomes et ainsi permettre à *Leishmania* de continuer son cycle de vie ([chapitre 2, section 2.2.](#)) (revu par [44]). Étant donné que le développement de la **leishmaniose féline** est un phénomène plutôt récent, les données sont limitées et plusieurs aspects de la maladie chez ces mammifères restent mal connus (revu par [45]). Toutefois de plus en plus de cas de leishmaniose féline sont rapportés et la majorité d'entre eux provient d'Amérique du Sud, d'Europe et d'Amérique du Nord (revu par [45-47]). Finalement, les signes cliniques les plus fréquemment rencontrés comprenaient une perte de poids, de l'anorexie, une lymphadénomégalie, une splénomégalie et diverses lésions (cutanées, muco-cutanées et oculaires) (revu par [45]).

### 1.4.2.3. Autres animaux

Plus rarement, il arrive également que la leishmaniose se développe chez d'autres animaux tels que les **chevaux**, les **bovins** et les **moutons**. En effet, c'est il y a plus de 30 ans déjà qu'un cas de leishmaniose cutanée avait été rapporté chez un mouton du Transvaal oriental [48]. Bien qu'aucune tentative n'avait été réalisée pour cultiver le parasite, l'analyse des macrophages du mouton avait mis en évidence la présence d'un grand nombre de petits corps morphologiquement compatibles avec la forme amastigote de *Leishmania* [48]. Une étude récente a cette fois-ci validé (par différentes techniques de PCR) la présence de *Leishmania* chez des moutons et a confirmé que ces ovins pourraient constituer un hôte et un réservoir négligé de transmission humaine de la LV, dans certaines régions de Chine [49]. Par ailleurs, en Suisse, un cas de leishmaniose cutanée est apparu pour la première fois chez une vache [50]. Finalement, récemment des cas de leishmaniose ont été rapportés chez des chevaux. Plus précisément il s'agissait d'un cheval d'une région d'Italie où la LCan est fortement endémique [51] et de 5 chevaux du Costa Rica [52] ; soulignant ainsi la possibilité des équidés à jouer un nouveau rôle dans l'épidémiologie de la leishmaniose.

## 1.5. Diagnostic de la maladie

Bien qu'il existe différents outils pour diagnostiquer la leishmaniose, la plupart manquent de sensibilité, ce qui « force » les médecins à en utiliser plusieurs afin de maximiser la réussite du diagnostic. Plus précisément, les principales méthodes de diagnostic de laboratoires sont les suivantes : la **biopsie**, la mise en **culture des échantillons**, la **détection de l'ADN** de *Leishmania* par différentes méthodes PCR, et le **frottis de grattage dermique** ; ce dernier étant la méthode la plus couramment utilisée, en particulier dans les zones endémiques, en raison de sa simplicité et de son faible coût [53, 54]. Les anticorps antileishmaniens peuvent également être détectés par des **tests sérologiques**, mais cette approche reste peu courante (notamment car les anticorps sont généralement présents à de faibles titres, voir indétectables) [55]. Par ailleurs, avec les outils actuels, la plupart des tests restent positifs plusieurs mois après la guérison des patients, ce qui empêche la détection des cas de rechute de la maladie [56]. Seules les méthodes PCR, considérées comme plus spécifiques, peuvent détecter les infections en cours (revu par [35]).

Un autre point important dans la détection de la maladie est l'identification de l'espèce impliquée. En effet, celle-ci est essentielle pour attribuer un traitement approprié car selon l'espèce, le niveau de virulence et les réponses aux médicaments peuvent varier considérablement [57]. L'identification morphologique précise des espèces de *Leishmania* n'est pas possible avec les tests actuels, mais différents outils de diagnostic moléculaire basés sur l'ADN du parasite (tels que les méthodes de PCR nichée, la PCR d'analyse de fusion à haute résolution (« HRM-PCR », pour « *High Resolution Melting - PCR* »), ou encore le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (« RFLP », pour « *Restriction Fragment Length Polymorphism* »)) ont permis l'identification du parasite à différents niveaux taxonomiques (genre et espèce ([chapitre 2, section 2.1.](#)) (revu par [58]). Plus précisément, d'après diverses études, plusieurs marqueurs cibles servent à identifier les espèces de *Leishmania*, notamment l'ADN du kinétoplaste, le gène de la protéine de choc thermique 70, le gène de la N-acétylglucosamine-1-phosphate transférase et l'espaceur interne transcrit (revu par [59]).

Finalement, en cas de diagnostic positif de la maladie, des lignes directrices ont été rédigées par un groupe d'expert de la société américaine des maladies infectieuses (« IDSA », pour « *Infectious Diseases Society of America* ») et par la société américaine de médecine tropicale et d'hygiène (« ASTMH », pour « *American Society of Tropical Medicine and Hygiene* »), afin de faciliter la prise en charge clinique des patients [60].





## Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*



[2.1. Classification du parasite](#)

[2.2. Cycle de vie de \*Leishmania\*](#)

[2.3. Particularités génomiques de \*Leishmania\*](#)

## 2.1. Classification du parasite

Chaque organisme vivant a d'abord été répertorié selon une **classification classique** (ou Linnéenne), proposé en 1735 par Charles Linné, et qui consistait à classer les espèces selon leurs ressemblances les plus visibles. En 1950, Willi Hennig formalise la **classification phylogénétique**, fondée sur la cladistique, et qui permet de visualiser les relations de parenté entre les taxons [61].

### 2.1.1. Le genre *Leishmania*

Même si la cladistique reste la méthode la plus utilisée (notamment en milieux universitaires), en parasitologie vétérinaire et humaine, la classification classique (Linnéenne) reste de rigueur. Ainsi, *Leishmania* est classé selon les rangs taxonomiques suivants [1] : Domaine : **Eucaryotes** (Whittaker & Margulis, 1978), Règne : **Protista** (Haeckel, 1866), Embranchement : **Euglenozoa** (Cavalier-Smith, 1981), Classe : **Kinetoplastea** (Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976), Sous-classe : **Metakinoplastina** (Vickerman, 2004), Ordre : **Trypanosomatida** (Kent, 1880), ou **Kinetoplastida** [62], Famille : **Trypanosomatidae** ou **Kinetoplastidae** (Döflein, 1901), Sous-famille : **Leishmaniinae** (Maslov et Lukeš 2012), Genre : **Leishmania** (Ross, 1903).

### 2.1.2. Les différentes espèces de *Leishmania*

De nombreuses tentatives de classification des espèces du genre *Leishmania* se sont succédé au cours du temps, en commençant par celle de Charles Nicolle, qui en 1908, après avoir découvert la leishmaniose viscérale, a séparé *L. infantum* de *L. donovani* [1]. En 1982, Safjanova a proposé de placer les parasites *Leishmania* qui infectent les lézards dans un nouveau sous-genre, le **sous-genre Sauroleishmania**, dont la distribution géographique est isolée des autres [63]. Toutefois, bien que ce sous-genre ait été classé comme non pathogène pour l'homme, des travaux récents ont détecté *L. tarentolae* chez l'humain [64, 65]. En 1987, la classification présentée par Lainson et Shaw constitue une étape importante dans l'histoire et marque le début de la division du genre *Leishmania* en **deux sous-genres** : **Leishmania** et **Viannia** [1]. Grâce à la classification, il existerait une trentaine d'espèces de *Leishmania* qui infectent les mammifères (dont une dizaine serait d'importance significative pour la santé publique et une vingtaine qui infectent les reptiles [32, 66, 67] ; mais il est fort possible que de nombreuses autres espèces soit encore actuellement inconnues. La classification des espèces de *Leishmania* est disponible en [Annexe 4](#), et celle des espèces les plus étudiées est disponible en [Annexe 5](#).

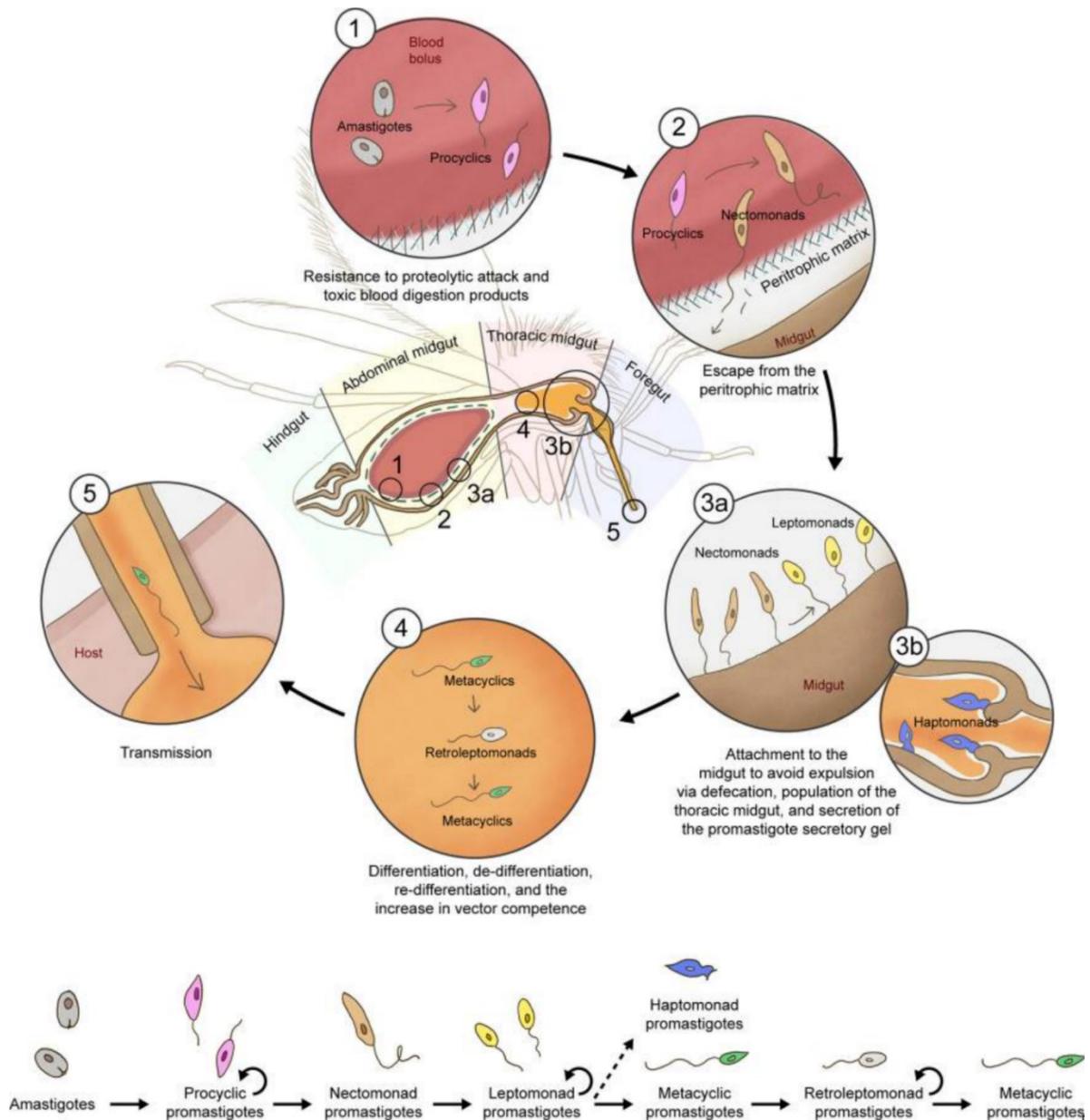
## 2.2. Cycle de vie de *Leishmania*

*Leishmania* est un **organisme hétéroxène** qui nécessite deux hôtes pour réaliser son cycle de vie : le vecteur phlébotome femelle et un hôte définitif. On parle souvent « d'hôte mammifère », en référence à l'humain ou au chien, chez qui *Leishmania* se développe majoritairement. Plus précisément, le parasite présente un cycle de vie dimorphique, dans lequel il alterne entre la forme promastigote flagellée motile (stade extracellulaire, [section 2.2.1.](#) et Figure 2) présente dans l'intestin de l'insecte vecteur, et la forme amastigote non-flagellée et non motile (stade intracellulaire, [section 2.2.2.](#) et Figure 3), dans les macrophages de l'hôte définitif [68]. Bien que les différentes espèces de *Leishmania* aient toutes un **cycle dimorphique**, des différences ont été observées entre les sous-genres *Leishmania* et *Viannia*. À titre d'exemple, les parasites du sous-genre *Leishmania* (qualifiés de « parasites suprapylaires ») se développent principalement dans l'intestin moyen (le mésentéron) de l'insecte, tandis que les parasites du sous-genre *Viannia* (qualifiés de « parasites péripylares ») vont dans l'intestin postérieur (le proctodeum) avant d'aller dans le mésentéron [69], revu par [66]. De plus, selon les espèces, la différenciation des amastigotes en promastigotes infectieux a une durée variable de 7 à 14 jours. Néanmoins, le cycle de vie de *Leishmania* constitue un ensemble de changements morphologiques et métaboliques complexes qui répondent à des stimuli présents dans l'environnement du parasite, et dont le but est d'assurer sa survie.

### 2.2.1. Stade extracellulaire (développement au sein du vecteur)

#### 2.2.1.1. Repas sanguin du phlébotome non-infecté | « Aspiration ! »

Lorsqu'un **phlébotome femelle** prend un repas sanguin sur un hôte infecté, il ingère les parasites sous leur forme amastigote (forme non motile +/- ronde de 2 à 6  $\mu\text{m}$  de diamètre, avec un bourgeon flagellaire). Très rapidement, le phlébotome sécrète une membrane péritrophique (composée de protéines, de protéoglycanes et d'un réseau de chitine [70]), qui enveloppe le repas sanguin et qui protège temporairement les amastigotes contre les attaques protéolytiques de la digestion [71], revu par [66]. Toutefois, jusqu'à 50 % des parasites de l'inoculum peuvent être détruit dès le premier jour suivant le repas sanguin [71, 72].

Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

**Figure 2.** Développement de *Leishmania* dans le phlébotome vecteur [11]

Au sein du vecteur, *Leishmania* doit surmonter différentes « menaces », telles que : (1) les attaques digestives, (2) la matrice péritrophique, (3a et 3b) l'expulsion, (4) la réussite de son développement, et (5) sa transmission.

## Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

### 2.2.1.2. Promastigotes procycliques | « Déploiement »

Une fois enveloppés dans la membrane péritrophique, les amastigotes évoluent et acquièrent une forme allongée (de 6 à 8  $\mu\text{m}$ ), flagellée et motile : c'est la forme **promastigote procyclique** [73, 74]. Plusieurs éléments semblent jouer un rôle dans l'induction de ce processus, en particulier les changements de température et de pH (insecte : pH alcalin et température à 25°C ; hôte mammifère : pH acide et température à 37°C) [75-77]. Les promastigotes procycliques se multiplient activement avec une réplication asexuée (par fission binaire) [73]. Ils développent également des mécanismes de défense pour lutter contre l'attaque digestive du phlébotome (Figure 2, (1)), tels que le contrôle de l'activité et de l'expression d'enzymes protéolytiques [78-81], et la sécrétion de molécules spécifiques (comme les protéophosphoglycane (PPG) qui, chez *L. major*, semblent être indispensables pour lutter contre les enzymes digestives du vecteur [82]).

### 2.2.1.3. Promastigotes nectomonades | « L'adhérence ou la mort »

Environ 48h après le repas sanguin, les promastigotes procycliques arrêtent de se répliquer et deviennent plus allongés (entre 15 et 20  $\mu\text{m}$  de longueur) et plus motiles : c'est la forme **promastigote nectomonade** [74, 83]. A ce niveau du développement, il est temps pour *Leishmania* de se libérer de la membrane péritrophique (Figure 2, (2)). Celle-ci est dégradée par de la chitinase, mais connaître le mécanisme à l'origine de la dégradation est source de débat. Certains travaux suggèrent que la chitinase est sécrétée spécifiquement par le parasite [84], et d'autres, par l'insecte-vecteur [84, 85]. En accord avec la seconde suggestion, une étude récente a montré qu'il n'existait aucune différence dans le processus de dégradation de la membrane péritrophique de phlébotomes infectés et non-infectés, ce qui souligne que *Leishmania* ne semble pas être à l'origine de la destruction de la membrane [86] | *mais cela ne veut pas forcément dire qu'il n'y « participe » pas*. Néanmoins, après leur libération hors de la membrane péritrophique, les parasites (devenus très motiles grâce à leur nouvelle morphologie) se déplacent rapidement dans la lumière intestinale pour aller s'attacher aux parois digestives du phlébotome, afin d'éviter leur élimination dans les excréments de l'insecte [87] (Figure 2, (3a)). Il a d'abord été suggéré que cette adhérence est possible grâce à la présence de lipophosphoglycane (LPG), des molécules de surface de *Leishmania* qui se lient aux lectines présentes à la surface intestinale du vecteur [19, 73, 88]. Selon d'autres travaux, cette adhérence serait dépendante des LPG dans les phlébotomes restrictifs à une seule espèce de *Leishmania*, mais indépendante chez ceux permettant la présence de plusieurs espèces du parasite [89], et pourrait s'expliquer par des modifications de la structure de base des LPG [90-94]. Finalement une étude récente suggère que la liaison de *Leishmania*

## Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

à la paroi intestinale du vecteur se fait par une courte zone d'attache présente sur le flagelle, nommée « FAZ » (« *Flagellum Attachment Zone* »), et que la protéine FAZ5 est indispensable à l'attachement [95].

### 2.2.1.4. Promastigotes leptomonades | « *Renflouer les troupes* »

Les promastigotes nectomonades migrent dans la partie antérieure de l'intestin et se transforment en **promastigotes leptomonades** (Figure 2, (3a)). Sous cette forme plus petite, les parasites effectuent de nouvelles répliquations [72, 83]. Cette transformation marque le début de la **métacyclogenèse** : dernière phase du stade extracellulaire, dans laquelle les parasites acquerront leur forme infectieuse.

### 2.2.1.5. Promastigotes métacycliques infectieux | « *Dans la cour des grands* »

La métacyclogenèse est marquée par la transformation du parasite *Leishmania* en une forme infectieuse : les **promastigotes métacycliques** (forme allongée de 11 à 20  $\mu\text{m}$ , avec un long flagelle et une très grande motilité) [74, 96-98] (Figure 2, (4)). A ce niveau du développement, une modification des LPG entraîne une forte diminution de l'adhérence des parasites à la paroi intestinale de l'insecte, ce qui leur permet de se détacher et d'entamer leur migration vers la valve stomodéale (jonction située entre l'intestin antérieur et l'intestin moyen) [72, 99]. Une fois sur place, les parasites sécrètent un gel nommé PSG (« *Promastigote Secretory Gel* ») [72, 100], dont l'accumulation provoque une obstruction qui finit par ouvrir la valve stomodéale. L'ouverture de cette valve entraîne la régurgitation des parasites dans la salive du phlébotome [101, 102], et une partie du bouchon de PSG [100, 103]. Le tout sera transmis à l'hôte, lors du repas sanguin du phlébotome (Figure 2, (5)). Il semblerait d'ailleurs que les PPG sécrétés par le parasite soient capables de modifier le comportement alimentaire du phlébotome, en l'incitant à se nourrir d'avantage ; favorisant ainsi la transmission de *Leishmania* [104]. En effet, les repas sanguins multiples augmentent le contact entre le vecteur et l'hôte, ce qui favorise la capacité des vecteurs (y compris les phlébotomes) à transmettre des maladies infectieuses [105-107]. Finalement, durant la métacyclogenèse, l'expression de la glycoprotéine 63 (GP63) augmente fortement pour préparer les parasites à une meilleure survie dans l'hôte [108, 109] ; la GP63 étant un important facteur de virulence [110].

### 2.2.1.6. Promastigotes retroleptomonades | « *Machine arrière* »

Récemment, une étude a montré l'existence d'un nouveau stade de promastigotes. Plus précisément, des promastigotes métacycliques seraient capables de reprendre la forme leptomonade ; d'où l'attribution du nom

## Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

de **promastigotes retroleptomonades** (Figure 2, (4)). Cette dédifférenciation se ferait lors des repas de sang multiples et permettraient aux promastigotes métacycliques de redevenir prolifératifs, de se répliquer, et de redevenir métacycliques ; la taille de la population de parasites infectieux étant ainsi augmentée. | [111]

### 2.2.1.7. Promastigotes haptomonades | « Les oubliés »

Selon quelques travaux, certains promastigotes leptomonades ne suivraient pas la voie classique dont l'aboutissement est de devenir infectieux et d'être transmis, mais se développeraient plutôt en **promastigotes haptomonades** (forme élargie, non-motile, de 5 à 8  $\mu\text{m}$ ), et s'attacheraient, grâce à leur flagelle, au niveau de la valve stomodéale [74, 88] (Figure 2, (3b)). Le rôle exact de cette forme morphologique n'a pas été clairement identifié, mais il est suggéré qu'elle semble faciliter la génération et le maintien du PSG, et donc de contribuer au blocage de l'intestin [74]. Bien que le rôle exact des promastigotes haptomonades soit resté quelque peu « mystérieux » pendant de nombreuses années, une étude récente a montré que ces promastigotes étaient capables de former une vaste structure sphérique nommée « HPS » (« *Haptomonad Parasite Sphere* ») [111]. Ce serait notamment l'addition de cette structure et du PSG qui permettrait l'obstruction de la valve stomodéale [111] ; indispensable pour la transmission efficace des parasites.

### 2.2.1.8. Métabolisme énergétique des promastigotes | « La bonne " bouffe " »

Pour survivre, les parasites doivent veiller au bon maintien de leur métabolisme énergétique. Par « chance », les phlébotomes se nourrissent aussi de nectar de fleurs, riches en amidon et en disaccharides (des glucides que *Leishmania* est capable de digérer [112], et pour certains, de façon optimale à des pH légèrement alcalin, comme celui de l'intestin du phlébotome [113]). Par ailleurs, de sa forme promastigote procyclique jusqu'au stade infectieux, *Leishmania* utilise divers processus (glycolyse [114], chaîne de transport des électrons [112], voies des pentoses phosphates [114]) pour générer suffisamment d'énergie pour sa survie dans le vecteur.

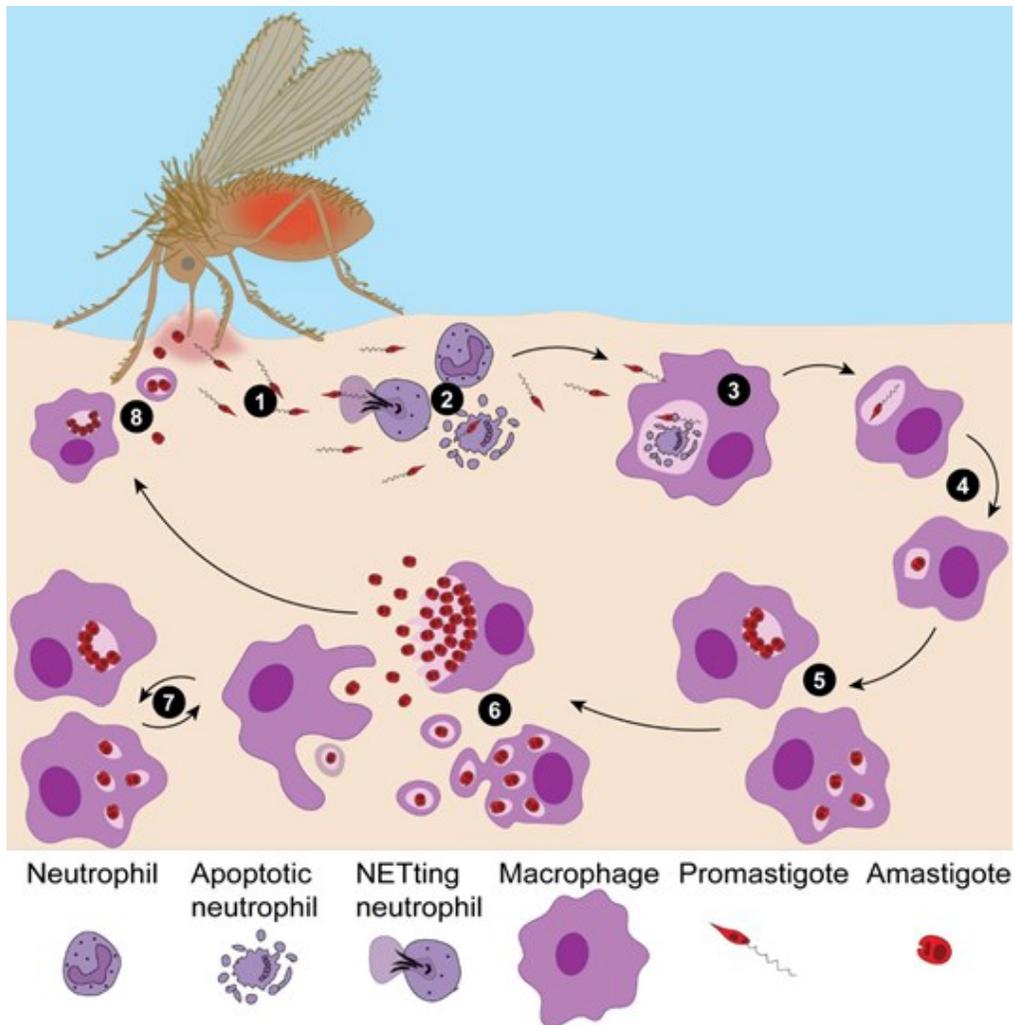
## 2.2.2. Stade intracellulaire (développement au sein de l'hôte)

### 2.2.2.1. Repas sanguin du phlébotome infecté | « En avant toute ! »

La transmission classique du parasite *Leishmania* à l'hôte se fait lors du repas sanguin d'un phlébotome femelle infecté (Figure 3, (1)). L'inoculum régurgité par l'insecte contient une partie du bouchon de PSG [100, 103], entre  $10^3$  et  $10^4$  parasites (promastigotes métacycliques) [115], et certaines molécules de la salive du

Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

vecteur serviraient de vasodilatateurs et faciliteraient l'infection [115, 116]. Pour assurer une transmission efficace, des travaux ont d'ailleurs démontré que les promastigotes métacycliques doivent comprendre deux populations distinctes : les parasites infectieux et ceux qui présentent à leur surface la phosphatidylsérine (PS) ; ces derniers permettant la pénétration silencieuse des parasites infectieux dans les phagocytes [117, 118]. Une fois inoculés dans le mammifère, les parasites doivent rapidement neutraliser les attaques défensives du système immunitaire de l'hôte, afin de pouvoir continuer leur cycle de vie.



**Figure 3.** Développement de *Leishmania* dans l'hôte mammifère (adapté de [119])

Le stade intracellulaire se déroule en plusieurs étapes : **(1)** Infection de l'hôte mammifère lors du repas sanguin, **(2)** Infection silencieuse des neutrophiles, **(3)** Recrutement des macrophages, **(4)** Différenciation des promastigotes en amastigotes, **(5)** Établissement des parasites au sein des vacuoles parasitophores « individuelles » ou « communales », selon les espèces de *Leishmania*, **(6)** Prolifération des parasites, **(7)** Réinfection des macrophages, et **(8)** transmission au vecteur.

## Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

### 2.2.2.2. Le système du complément | « Premier obstacle »

Le système du complément est rapidement activé après l'injection des promastigotes dans l'hôte mammifère et conduit à l'élimination efficace de plus de 90% des parasites (revu par [120, 121]). Même si un pourcentage élevé de promastigotes est en général éliminé dès le début de l'infection, les parasites restants sont capables de **détourner les attaques du système du complément** et de favoriser le développement de la maladie. A titre d'exemple, les protéines kinases du protozoaire (fortement exprimées chez les promastigotes métacycliques) semblent permettre l'inhibition de l'activation du complément, en phosphorylant les composants C3, C5 et C9 [122]. Chez *L. major*, la modification de la structure des LPG (qui les rend plus longs) empêche le complexe d'attaque membranaire C5b-9 du complément de se fixer à la membrane parasitaire [123]. Chez *L. donovani*, la GP63 se lie à la protéine C3 et induit la conversion du composant actif C3b en une forme inactive, la C3bi [109, 110]. De plus, des travaux récents ont démontré un nouveau mécanisme utilisé par *Leishmania* pour induire l'inactivation du C3b, dans lequel il recrute le facteur H (une molécule régulatrice du complément) du sérum de l'hôte [124]. En complément, une autre étude a révélé que *Leishmania* est capable d'utiliser un autre régulateur du complément, la protéine de liaison C4b (C4bBP), pour se protéger [125]. Finalement, les différents mécanismes utilisés par *Leishmania* pour détourner l'attaque du complément empêchent sa destruction et favorise sa phagocytose silencieuse par des cellules du système immunitaire (SI) inné (revu par [126, 127]). Toutefois, plusieurs travaux ont rapporté que pour permettre efficacement la phagocytose silencieuse des promastigotes, la présence de parasites apoptotiques semble nécessaire, notamment pour « tromper » la réponse immunitaire innée (revu par [128]).

### 2.2.2.3. Les neutrophiles | « Camouflage temporaire »

Les polynucléaires neutrophiles sont les premiers phagocytes à migrer au site de l'infection et sont capables d'être infectés de manière silencieuse (sans activer le système immunitaire de l'hôte) par les promastigotes [129, 130] (Figure 3, (2)). Habituellement courte, la vie des neutrophiles est ainsi prolongée par les parasites phagocytés qui empêchent l'entrée trop rapide des neutrophiles en apoptose [129, 131]. Cependant, plusieurs travaux soutiennent qu'à l'intérieur de ces cellules, les promastigotes peuvent survivre, mais ne peuvent ni se répliquer, ni se différencier ; qualifiant les neutrophiles de cellules hôtes initiales/transitoires du parasite [129, 131, 132]. Il est suggéré que cette possibilité unique de survie trouve son explication dans la composition trop pauvre en acides aminés essentiels du phagolysosome des neutrophiles [133]. Toutefois, la phagocytose des parasites par les neutrophiles peut être vue comme une stratégie du parasite pour obtenir



## Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

une « protection initiale » en attendant l'arrivée des macrophages, qui sont effectivement recrutés pendant ce temps-là [134]. À ce propos, des études plus récentes sur *L. infantum* et *L. mexicana* ont démontré que les PPG sécrétés par le parasite dans l'intestin du phlébotome et inoculés dans l'hôte pendant le repas sanguin, sont d'importants stimulateurs du recrutement des macrophages [135, 136].

L'élimination des promastigotes par les neutrophiles infiltrants est tout de même possible grâce à différents mécanismes, comprenant la phagocytose et la production de facteurs microbicides intracellulaires (tels que les espèces réactives de l'oxygène (« ROS », pour « *Reactive Oxygen Species* ») et extracellulaires (tels que les pièges extracellulaires des neutrophiles (« NETs », pour « *Neutrophil Extracellular Traps* ») [137] et revu par [138]. Cependant, des travaux ont démontré que *Leishmania* peut utiliser différentes stratégies pour empêcher sa destruction par les neutrophiles, tels que : (i) l'inhibition de la formation du phagolysosome, (ii) l'utilisation de compartiments non lytiques, (iii) la résistance contre les ROS et les NETs, ou leur inhibition, (iv) la digestion des NETs, et, possiblement, (v) la réplication dans les neutrophiles (revu par [138]). Chez *L. major*, l'inhibition de l'apoptose des neutrophiles impliquerait l'activation de la voie des kinases régulées par le signal extracellulaire (ERK1/2) [139, 140]. D'autre part, des travaux ont montré que la salive du phlébotome *Lutzomyia longipalpis* contient une endonucléase (la Lundep), spécifique à la femelle et capable d'hydrolyser l'ADN ; protégeant ainsi *Leishmania* contre les NETs [141].

### 2.2.2.4. La vacuole parasitophore | « L'habitat »

Une fois arrivés au site de l'infection, les macrophages peuvent phagocyter les promastigotes issus des neutrophiles en apoptose [142, 143] et les parasites qui sont restés libres hors des neutrophiles (Figure 3, (3)). L'interaction entre *Leishmania* et les macrophages s'initie par un contact *via* le flagelle des promastigotes. La métalloprotéase de surface GP63 et les LPG du parasite (revu par [144]), ainsi que des microdomaines lipidiques situés à la surface du macrophage [145, 146] jouent un rôle primordial dans l'entrée du parasite. Une étude récente a montré que selon l'espèce de *Leishmania*, différents récepteurs macrophagiques peuvent être impliqués dans l'entrée des parasites (notamment les récepteurs du complément, les récepteurs du mannose, les récepteurs de la fibronectine et les récepteurs Fcγ) et que le choix du récepteur pouvait avoir un impact sur l'évolution de l'infection [147]. Toutefois, en contradiction avec ces informations, des travaux ont démontré que la viabilité des parasites *L. donovani* et *L. major*, et leur phagocytose par les macrophages dérivés de la moelle osseuse murine, n'étaient pas affectées par le choix du type de récepteur du macrophage impliqué dans la reconnaissance du parasite, soulignant une fois de

## Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

plus la complexité de *Leishmania* [148]. Par ailleurs, il a récemment été démontré que l'endocytose dépendante de la cavéoline joue aussi un rôle clé dans l'internalisation des parasites *L. donovani*, par les cellules hôtes [149].

Les promastigotes phagocytés/internalisés intègrent le phagosome des macrophages, *via* des cavéoles composées de microdomaines lipidiques membranaires (revu par [126]). Les LPG du parasite s'insèrent ensuite dans les radeaux lipidiques et de l'actine s'accumule autour de la cellule ; l'ensemble permettant l'inhibition de la fusion entre le phagosome et le lysosome et empêchant la destruction du parasite [150, 151]. S'en suit la modification des phagosomes par fusion avec des organites pour former un compartiment dans lequel *Leishmania* pourra s'établir : la **vacuole parasitophore (VP)** (revu par [108, 126]). A l'intérieur de la VP, les promastigotes se réorientent (ils placent leur flagelle vers la périphérie de la cellule) et favorisent le déplacement de la vacuole vers l'extérieur du macrophage ; créant ainsi des lésions cellulaires néfastes pour l'hôte (revu par [126]). D'autre part, les conditions environnementales de la cellule, notamment l'augmentation de la température et la diminution du pH (hôte mammifère : pH acide et température à 37°C ; insecte : pH alcalin et température à 25°C), favorisent la différenciation des promastigotes en amastigotes (revu par [77]) (Figure 3, (4)). Toutefois, d'autres éléments semblent aussi intervenir dans la différenciation, tels que l'absorption du fer [152, 153], ou même la fusion de certains lysosomes avec la VP [154]. Selon les espèces de *Leishmania*, les VPs contiennent un seul ou plusieurs parasites. A titre d'exemples, *L. mexicana* et *L. amazonensis* s'établissent dans des VPs dites « communales » qui s'agrandissent au fur et à mesure que les parasites se multiplient ; tandis que *L. infantum* réside dans des VPs dites « individuelles » à partir desquelles les nouveaux parasites issus de la réplication se séparent dans de nouvelles VPs [155] (Figure 3, (5)). Une fois les promastigotes différenciés en amastigotes, ils prolifèrent activement, ce qui entraîne l'éclatement des macrophages (Figure 3, (6)) et les force à se déplacer jusqu'à d'autres macrophages non infectés afin de garder une exposition minimale au SI de l'hôte (revu dans [126]) (Figure 3, (7)). Finalement, lorsqu'un phlébotome femelle prend un repas sanguin sur l'hôte infecté, il ingère les amastigotes qui pourront ainsi continuer leur cycle de vie (Figure 3, (8)) (section 2.2.1.1.).

### 2.2.2.5. Détournement des fonctions des macrophages | « Place à la stratégie ! »

En réponse à la présence des parasites à l'intérieur des cellules, l'hôte met rapidement en place un mécanisme de défense majeur : l'**explosion oxydative** (*respiratory burst*, en anglais) ([156, 157]). Cela se traduit par une production accrue d'effecteurs microbicides puissants, dont les principaux sont les ROS et les

## Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

espèces réactives de l'azote (« RNS », pour « *Reactive Nitrogen Species* ») (revu par [158]). Dans ce contexte, des travaux récents ont démontré que *Leishmania* est capable de neutraliser le stress oxydatif généré par l'hôte, notamment en induisant une **expression accrue du facteur de transcription NRF2** et, consécutivement, de l'enzyme antioxydante hème oxygénase 1 (HO-1) et du facteur de transcription ATF3 [159-161] et revu par [162]. *Leishmania* peut aussi réguler à la baisse le gène CD40 afin de réduire l'activation des macrophages [163, 164]. Par ailleurs, des travaux ont montré que l'explosion oxydative générée par l'hôte peut également perturber l'intégrité de l'ADN des macrophages, et par conséquent, favoriser l'activation de signaux apoptotiques (revu par [165]). *Leishmania* est ainsi capable de mettre en place des réponses afin de limiter/réparer les dommages de l'ADN, *via* la régulation à la hausse du niveau de certains ARNm, tels que ceux codant pour des inhibiteurs de l'apoptose [159, 166]). Le protozoaire doit en effet éviter la destruction des macrophages ; cellules primordiales pour son établissement et sa persistance au sein de l'hôte (revu par [126]). Finalement, *Leishmania* est capable de favoriser le recrutement des macrophages, *via* une régulation à la hausse des gènes des protéines MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  [167]).

Chez les eucaryotes, la **méthylation de l'ADN et les modifications des histones** jouent un rôle majeur dans la régulation des gènes (revu par [168, 169]). Des travaux ont ainsi démontré que *Leishmania* induit la méthylation de l'ADN des macrophages, ce qui provoque une altération des gènes impliqués dans diverses voies de signalisation, telles que JAK/STAT, MAPK, Calcium, Notch et mTOR [170]. *Leishmania* est également capable d'induire une régulation à la hausse de l'expression de l'histone désacétylase 1 (« HDAC1 », pour « *Histone Deacetylase 1* ») dans les macrophages, ce qui réduit l'expression des gènes codant pour l'oxyde nitrique synthase inductible (« iNOS », pour « *Inducible Nitric Oxide Synthase* ») et par conséquent, diminue les niveaux de NO et favorise sa survie [171]. En effet, HDAC1 est une enzyme responsable du maintien de l'état d'acétylation des histones, qui agit principalement comme un « répresseur transcriptionnel » (revu par [172]). Plus largement, *Leishmania* exploite les histones lysine méthyltransférases/déméthylases pour rediriger la programmation épigénétique des gènes des macrophages et ainsi favoriser sa survie au sein de l'hôte [173].

La **modulation de divers ARNs non codants** dans les macrophages a également été décrite comme une stratégie utilisée par *Leishmania* pour détourner, à son avantage, la réponse immunitaire de l'hôte [174-177] et revu par [178]. La GP63 et les LPG de *Leishmania* sont d'ailleurs connus pour induire une régulation à la baisse de divers ARNs non codants dans les macrophages [179]. Finalement, il est important de souligner que des études récentes sur le transcriptome des macrophages ont montré que les promastigotes *Leishmania*

## Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

induisent une forte modulation des fonctions des macrophages (et autres cellules immunitaires) dans les premiers stades de l'infection, puis semblent finalement permettre une **stabilisation des ARNm** [159, 180].

### 2.2.2.6. Cellule Présentatrice d'Antigène (CPA) | « *La passerelle entre l'inné et l'adaptatif* »

Les cellules dendritiques (CDs) de l'épiderme (cellules de Langerhans) jouent un rôle important car ce sont des Cellules Présentatrices d'Antigène (CPA). Plus précisément, les CDs dégradent les antigènes parasitaires en peptides, puis les présentent à leur surface, liés avec les molécules des Complexes Majeurs d'Histocompatibilité (CMH) de classe 1 (CMH-I) ou de classe 2 (CMH-II). Les structures « peptides parasitaires-CMH » seront reconnues par les lymphocytes T (LT), notamment grâce à des récepteurs de surface exclusifs présents sur les LT, ce qui permettra leur activation (revu par [181]). Les macrophages peuvent également jouer le rôle de CPA, mais des travaux ont démontré que *Leishmania* est capable d'empêcher la présentation de l'antigène, en particulier car la PV macrophagique possède des propriétés similaires à celles connues pour les compartiments du CMH-II [182]. Plus précisément, les amastigotes sont capables : **(i)** de séquestrer et de dégrader les antigènes de la voie du CMH-II, **(ii)** d'éviter la migration des macrophages dans les ganglions lymphatiques drainants, et **(iii)** de diminuer l'expression du CMH-II et des molécules costimulatrices (revu par [128, 183]). Pour ces raisons, les CDs sont considérées comme étant les principales CPA de l'infection à *Leishmania* [184].

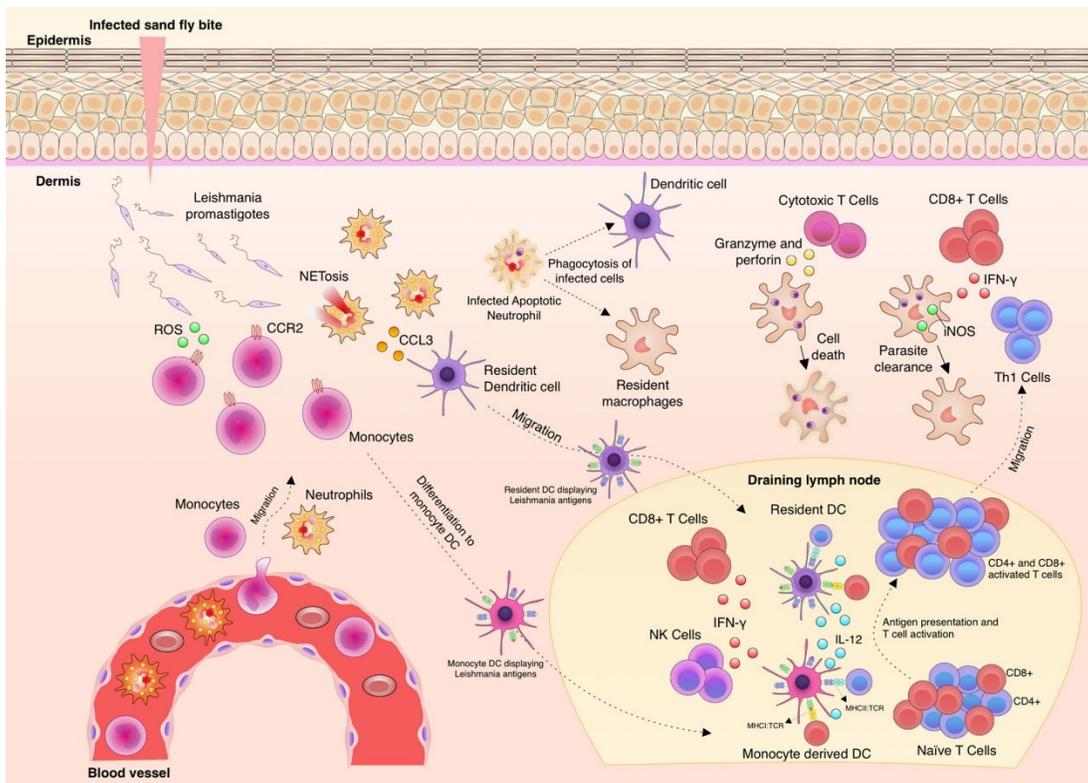
### 2.2.2.7. Les lymphocytes T (LT) | « *Les sentinelles* »

Bien que la réponse immunitaire innée de l'hôte soit importante pour la destruction de *Leishmania*, la réponse **immunitaire adaptative médiée par les lymphocytes T** (LT) joue un rôle vital dans l'issue de la maladie. En effet, étant donné que *Leishmania* se « cache » dans les macrophages, les lymphocytes B (LB) (responsables de la production d'anticorps) ne jouent pas un rôle central dans la clairance des parasites (revu par [185]). Toutefois, en raison des titres d'anticorps élevés, divers travaux ont montré que ce type de réponse est importante dans le diagnostic sérologique, en particulier chez les patients atteints de LV (revu par [121]).

Dans le cas de la leishmaniose, l'activation et l'expansion sélective des LT se déroule dans le ganglion lymphatique qui draine le site de l'infection [184]. Même si les cytokines ont un rôle important tout au long de l'infection, elles sont essentielles dans les réponses immunitaires adaptatives, y compris l'activation des LT. À titre d'exemple, l'interleukine 4 (IL-4) active les LT CD4<sup>+</sup> et induit leur différenciation vers la voie Th-2 (revu par [127, 186, 187]). Les LT CD4<sup>+</sup> Th-2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13, ce qui supprime la

Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

production de NO et contribue à la progression de la maladie (revu par [127, 186, 187]). À l'inverse, l'**interleukine 12 (IL-12)**, active les LT CD4<sup>+</sup> et induit leur différenciation vers la voie Th-1 (revu par [127, 186, 187]). Les **LT CD4<sup>+</sup> Th-1** produisent de l'**interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )**, ce qui favorise la production de NO dans les macrophages et donc la destruction de *Leishmania* (revu par [187]). L'IL-12 permet également l'activation des **LT CD8<sup>+</sup>** (revu par [187]) et une fois activés, ces lymphocytes dits « cytotoxiques » disposent de trois grands mécanismes de défense pour stopper l'infection : (i) la sécrétion de cytokines (en particulier l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ ), (ii) la libération de granules cytotoxiques (telles que la **perforine** et la **granzyme**), et (iii) la destruction des cellules infectées *via* les interactions Fas/FasL [188]. À titre d'exemple, chez des patients atteints de LV causée par *L. donovani*, l'implication de la perforine, de la granzyme et de l'IFN- $\gamma$  a été rapportée [189]. Cependant, *Leishmania (L. major)* est capable d'appauvrir le cholestérol membranaire des macrophages, ce qui inhibe la relocalisation du CD40 vers les domaines membranaires, perturbe sa signalisation et finit par induire une diminution de l'expression de l'IL-12 et une production accrue d'IL-10 ; favorisant la survie de *Leishmania* [190]. Dans le même ordre d'idée, *L. mexicana* peut empêcher la production d'IL-12, en perturbant la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, notamment grâce à l'action des cystéines peptidases (en particulier la cystéine peptidase B) [191].



**Figure 4.** Aperçu de l'immunité contre *Leishmania* (revu par [192])

## Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

### 2.2.2.8. Métabolisme énergétique des amastigotes | « Régime particulier »

#### 2.2.2.8.1. Les différentes voies utilisées par *Leishmania*

Une fois que les amastigotes ont établi l'infection dans les VP des macrophages, ils ont besoin de ressources énergétiques complexes, et leur survie à long terme dépend de la disponibilité des nutriments dans l'espace intracellulaire (revu par [126, 193]). De ce fait, plusieurs travaux ont démontré que les amastigotes utilisent la voie de sécrétion en fusionnant leur VP avec des vacuoles issues du réticulum endoplasmique (RE) pour récupérer un grand nombre de métabolites (tels que des acides aminés (en particulier l'arginine (section [2.2.2.8.2.](#))), des polyamines, des purines, des vitamines, des sphingolipides, de l'hème et du fer (section [2.2.2.8.3.](#)) et du  $Mg^{2+}$ ) nécessaires à leur croissance et leur survie [155, 194-196], revu par [126]. Par ailleurs, des études ont précisé que les amastigotes favorisent l'utilisation de sucres comme principale source de carbone, mais qu'ils sont aussi capables de ralentir leur métabolisme, en cas de ressources limitées [197, 198], revu par [193]. Un autre processus largement utilisé par *Leishmania* pour « voler » des nutriments est l'autophagie. Grâce à ce mécanisme, il dégrade et recycle des constituants cellulaires, des protéines et des lipides [199, 200], revu par [193]. Finalement, les corps lipidiques situés dans les macrophages semblent aussi répondre à certains besoins nutritionnels des amastigotes, notamment par leur contenu riche en énergie et par la présence de protéines clés pour leur survie [201], revu par [126].

#### 2.2.2.8.2. Course à l'arginine

Comme évoqué précédemment, les macrophages infectés activent des voies cytotoxiques pour favoriser l'induction de la biosynthèse du NO et la libération des ROS (revu par [158]). Dans ces processus, l'arginine est utilisée pour synthétiser le NO. Pour permettre son développement sécuritaire dans les VPs, il est donc crucial pour *Leishmania* de pouvoir neutraliser les ROS. Pour cela il doit synthétiser de la trypanothione (l'antioxydant qui neutralise les ROS) (revu par [193, 202, 203]), ce qui par conséquent, nécessite de l'arginine (seule source de production de spermidine et donc de trypanothione (revu par [203])). Ainsi, *Leishmania* induit une réponse de privation d'arginine nommée « ADR » (« *Arginine Deprivation Response* »), en réponse à la disponibilité limitée d'arginine dans les cellules hôtes [204]. Ceci est notamment illustré par une régulation à la hausse des niveaux d'ARNm et de protéines de la perméase d'acide aminé 3 « AAP3 » (pour « *Amino Acid Permease 3* »), ce qui entraîne une augmentation du transport de l'arginine [204]. Finalement, ce besoin commun entre les amastigotes et les macrophages peut être vu comme une « course

## Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

à l'arginine », où la victoire serait à celui qui parvient à en acquérir la plus grande quantité. Ce phénomène est d'ailleurs un élément clé de l'infection du parasite (revu par [205, 206]).

### 2.2.2.8.3. Fer et hème

Chez les protozoaires (et les autres métazoaires), le fer et l'hème sont essentiels dans de nombreuses voies métaboliques conservées (revu par [207, 208]). Le fer est en effet un régulateur essentiel du métabolisme cellulaire, et son absorption et sa régulation jouent des rôles clés dans l'issue de l'infection à *Leishmania*, ainsi que dans d'autres maladies (revu par [209-212]). Cependant, *Leishmania* doit acquérir ces éléments chez son hôte car il a la particularité de ne pas posséder de protéines cytosoliques de stockage de fer (revu par [213]) et de ne pas être capable, à lui seul, de synthétiser l'hème [214-216] | ce qui est donc plutôt « embêtant » vu l'importance de ces nutriments. Le processus dans lequel l'hôte restreint la disponibilité du fer et de l'hème pour les pathogènes est d'ailleurs nommé « immunité nutritionnelle » (revu par [217]). Chez *Leishmania* il existe des éléments clés pour l'acquisition du fer, tels que la réductase ferrique 1 (« LFR1 », pour « *Leishmania Ferric iron Reductase 1* »), le transporteur de fer ferreux 1 (« LIT1 », pour « *Leishmania Iron Transporter 1* »), la protéine transmembranaire LHR1 (« *Leishmania Heme Response 1* ») [152, 218] et revu par [213], ainsi que l'HO-1, également impliquée dans d'autres infections à protozoaires (revu par [219]). Toutefois, le fer et l'hème peuvent être néfastes pour *Leishmania*, notamment par leur rôle dans la production des ROS et dans l'apoptose (revu par [220]). Ils peuvent donc être vu comme des nutriments à « double tranchant ». Ainsi, pour survivre, les parasites doivent développer des mécanismes pour acquérir le fer et l'hème et pour réguler leur niveau intracellulaire (revu par [212]).

## 2.3. Particularités génomiques de *Leishmania*

Connaitre la biologie moléculaire fondamentale d'un pathogène est un atout majeur dans la compréhension des relations hôte-pathogènes, et surtout dans la recherche de nouvelles stratégies de traitement et de contrôle des maladies. En 1994, à Rio de Janeiro (Brésil), la création du « *Leishmania* Genome Network (LGN) » a officialisé l'importance des recherches visant à déterminer la séquence complète du génome des espèces clés de *Leishmania*. En 2005, la première séquence complète du génome de *L. major* (souche de référence du projet LGN) a été publiée [221], suivi, en 2007, de celle de *L. infantum* et de *L. braziliensis* [222], marquant ainsi les premiers succès de plusieurs années d'effort. Grâce au développement des technologies de séquençage, des progrès ont été observés, autant pour sur le génome nucléaire de

## Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

*Leishmania* [223-225] que sur son génome mitochondrial [226]. En effet, appartenant à l'ordre des Kinetoplastida, *Leishmania* possède **deux génomes** ([section 2.3.1.](#)), mais ce n'est que l'une de ses nombreuses particularités génomiques. Le protozoaire détient une incroyable « **plasticité génomique** » ([section 2.3.3.](#)) qui peut être illustrée par divers phénomènes, tels que des changements de ploïdie, des variations du nombre de copies de gènes (« CNV » pour « *Copy Number Variation* ») et des polymorphismes d'un seul nucléotide (« SNP » pour « *Single Nucleotide Polymorphism* ») [227]. De plus, le parasite a une **expression génique particulière** ([section 2.3.4.](#)) et il est surprenant de constater que les mécanismes impliqués sont tolérés ou bénéfiques pour le parasite.

### 2.3.1. *Leishmania*, un parasite à deux génomes

#### 2.3.1.1. Le kinétoplaste

Appartenant à l'ordre des Kinetoplastida ([section 2.1.1.](#)), l'une des premières caractéristiques clés du génome de *Leishmania* est qu'il possède un ADN mitochondrial (ADNmt) : le « **kinétoplaste** ». Cet ADNmt, placé en position antérieure du parasite, est un réseau complexe d'ADN composé de plusieurs dizaines de maxicercles et de milliers de minicercles, enchainés ensembles [228]. La taille des maxicercles varie entre 20 et 40 kb selon les espèces de *Leishmania*, tandis que celle des minicercles est plus constante et reste entre 0,5 et 2 kb [229]. Les maxicercles sont comparables aux génomes mitochondriaux conventionnels des eucaryotes et codent pour des ARNs ribosomiques et des complexes de la chaîne respiratoire. Cependant, un grand nombre d'ARNs transcrits par les maxicercles nécessitent d'être « édités » (modifiés) avant d'être traduits et ce processus « d'édition des ARNs » est notamment possible grâce aux minicercles qui codent pour des ARNs guides [230]. Dans le genre *Leishmania*, la structure du kinétoplaste (maxicercles et minicercles) de *L. tarentolae* a longtemps été la mieux caractérisée, faisant de cette espèce un organisme modèle pour étudier la machinerie complexe de l'édition des ARNs [228, 230, 231]. Toutefois, grâce au séquençage à haut débit, le génome nucléaire de différentes espèces de *Leishmania* a pu être décrit [226].

#### 2.3.1.2. Le génome nucléaire

Les espèces de *Leishmania* ont un génome de taille comprise entre 29 et 33 millions de paires de bases (Mb) [225]. Cette variation peut s'expliquer par la taille très variable des chromosomes (allant de 0,35 à ~3 Mb [232]) et par des différences dans leur nombre. En effet, les espèces de l'Ancien Monde ont 36 paires de

## Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

chromosomes [232], tandis que celles du Nouveau Monde en ont 34 ou 35 [233]. Cette différence n'est pas due à une « perte » de chromosome(s), mais à des événements de fusion de certains d'entre eux [233]. Dans le génome de *Leishmania*, on compte plus de 8000 gènes qui codent pour des protéines, et environ 900 qui produisent des ARNs non codants ; mais pour ce qui est des chiffres exacts, là encore des différences ont été observées [221, 222]. Par ailleurs, les fonctions des protéines codées par les gènes de *Leishmania* sont encore majoritairement inconnues [222, 223]. Cependant, des travaux sur la génomique ont permis d'identifier un nombre important de protéines conservées et partagées avec les trypanosomes *Trypanosoma brucei* et *Trypanosoma cruzi*, et de constater que la majorité des gènes de *Leishmania* sont conservés entre les espèces *L. infantum*, *L. major* et *L. braziliensis* [222].

### 2.3.2. Nucléotides et chromatine

#### 2.3.2.1. La base J

En plus d'avoir deux génomes ([section 2.3.1.](#)), *Leishmania* possède une modification particulière au niveau de son ADN nucléaire : le  $\beta$ -d-glucopyranosyloxyméthyluracile (base J). L'existence de cette base a été suspectée dans les années 1980, dans les travaux de Bernards et *al.* [234] et de Pays et *al.* [235], mais sa structure et sa formation n'ont été comprises que plus tard par Gommers-Ampt et *al.* [236, 237]. Actuellement, les connaissances disponibles suggèrent que la base J est synthétisée à la suite d'une modification d'une base thymine (T) spécifique dans l'ADN (la base J est une base hyper-modifiée) (revu par [238]). De plus, chez le parasite, la base J est présente tout au long de son cycle de vie ([section 2.2.](#)), contrairement à *Trypanosoma brucei*, chez qui elle est absente lorsque le parasite est dans le vecteur [235, 239, 240].

Plus généralement, cette base est présente chez les protozoaires de l'ordre des Kinetoplastida [239] et chez une algue unicellulaire [241], mais elle n'a, à l'heure actuelle, encore jamais été retrouvée chez d'autres organismes [239]. Chez *Leishmania*, plus de 98% des bases J sont situées sur les régions télomériques des chromosomes, et seulement ~1% se trouvent à l'intérieur de ces derniers, au niveau des sites d'initiation et de terminaison de la transcription « RNAP II » (zones transcrites par l'ARN polymérase II) [242]. De plus, la base J est la cible d'une protéine de liaison à l'ADN (la protéine J-binding 1 (« JBP1 » pour « *J-DNA-binding protein 1* ») [243]), dont l'élimination est mortelle chez certaines espèces de *Leishmania* (revu par [238]).

En complément, il existe différents complexes protéiques de liaison spécifique à la base J, et bien que la proportion de bases J présentes dans les zones de transcription de l'ARN Polymerase II ne représente



## Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

qu'environ ~1%, la base J a tout de même un rôle clé dans la répression de gènes spécifiques, et donc dans le maintien de la viabilité du parasite [244-246], revu par [247]. Plus précisément, elle semble contrôler la terminaison de la transcription, en bloquant l'ARN polymérase II, au niveau de la fin des unités de transcription polycistroniques (« PTU », pour « *Polycistronic Transcription Units* ») ([section 2.3.4.2.](#)) [246]. Finalement, l'une des protéines de liaison à la base J (la protéine « JBP3 ») aurait un rôle dans la modification et le remodelage de la chromatine ([section 2.3.2.2.](#)) [246].

### 2.3.2.2. Remodelage de la chromatine

Bien que le remodelage de la chromatine soit un mécanisme moléculaire fondamental présent chez tous les eucaryotes (ce n'est donc pas une particularité génomique propre à *Leishmania*), un élément important peut être abordé ici. Dans les cellules eucaryotes, le nucléosome (assemblage complexe des histones centrales (H2A, H2B, H3 et H4)) représente l'unité fondamentale de la chromatine. La structure de cette dernière joue un rôle important dans l'emballage de l'ADN et régule l'expression des gènes. Par ailleurs, la chromatine est reconnue comme une cible importante pour divers agents pathogènes, ce qui rend son étude primordiale (revu par [248]). Bien que les histones soient hautement conservées parmi les espèces [249], les histones de *Leishmania* se sont diversifiées au cours de l'évolution [221]. Par conséquent, en s'incorporant dans les chromosomes de l'hôte, les histones de *Leishmania* peuvent affecter la structure de la chromatine. Dans ce contexte, une étude récente a découvert un nouveau mécanisme de virulence chez *L. major*, dans lequel l'histone H3 du parasite forme un nucléosome avec les histones de l'hôte [250]. Ainsi, lors de l'infection, la H3 de *Leishmania* est capable de détendre la chromatine de l'hôte (probablement par l'interaction affaiblie H3-ADN), de moduler l'expression des gènes et donc de faciliter la survie du parasite [250].

## 2.3.3. Plasticité génomique

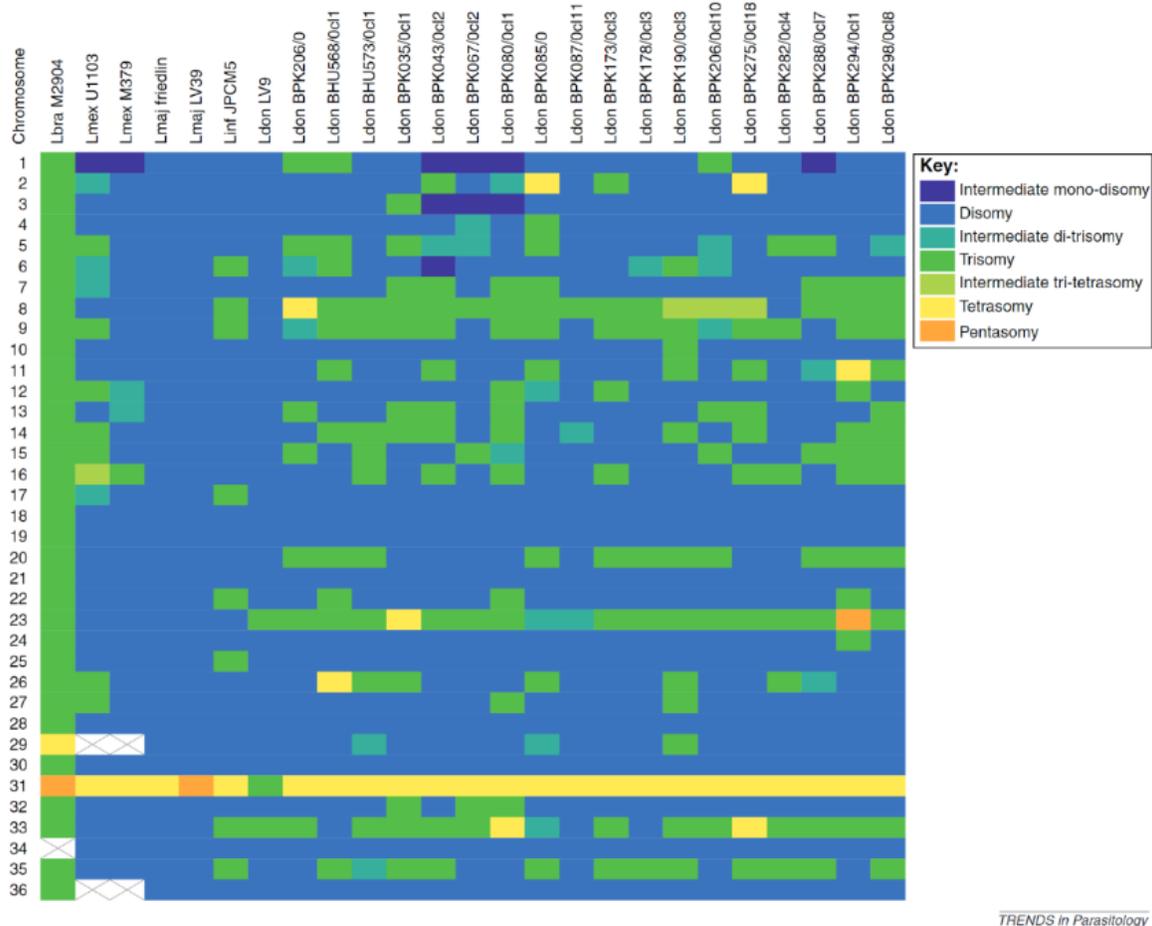
### 2.3.3.1. Aneuploidie en mosaïque

Bien que *Leishmania* soit considéré depuis longtemps comme étant un organisme diploïde, des études ont montré que la ploïdie chromosomique chez ce parasite est très variable au sein des populations [251-253]. Plus précisément, l'instabilité de la ploïdie et les variations des contenus chromosomiques permettent de représenter le génome de *Leishmania* par une « **aneuploidie en mosaïque** » [224, 225] (Figure 5). Ainsi, au



Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

sein de la population cellulaire d'une souche de *Leishmania*, dans chaque cellule, chaque chromosome peut présenter différents états de ploïdie, allant de la monosomie à la pentasomie [251].



**Figure 5.** Aneuploïdie chez différentes souches de *Leishmania* [251]

Les nombres de copies de chaque chromosome sont représentés par différentes couleurs (bleu, disomique ; vert, trisomique ; jaune, tétrasomie ; orange, pentasomie). Les cases barrées correspondent à des chromosomes inexistant à la suite d'une fusion des chromosomes 20 et 34 chez *L. braziliensis* et des chromosomes 8 et 29, puis 20 et 36 chez *L. mexicana*. Abréviations : Lbra, *L. braziliensis* ; Lmex, *L. mexicana* ; Lmaj, *L. major* ; Linf, *L. infantum* ; Ldon, *L. donovani*.

Chez les organismes multicellulaires, l'aneuploïdie est généralement délétère (exemple de la trisomie 21 chez l'homme), mais chez certains organismes unicellulaires elle peut être tolérée et potentiellement bénéfique. Par exemple, chez des champignons pathogènes, elle semble contribuer à la virulence et à la résistance médicamenteuse [254, 255]. De même, chez *Leishmania*, l'aneuploïdie semble bénéfique et utilisée par le parasite pour moduler l'expression des gènes et résister aux médicaments [256-258]. D'autre part, l'aneuploïdie de *Leishmania* semble être modulable au cours de son cycle de vie et permettrait au

## Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

protozoaire de s'adapter à son environnement [259]. De plus, la similarité des caryotypes de promastigotes isolés de phlébotomes indépendants, suggère que les changements d'aneuploïdie ne sont pas aléatoires mais représentent un phénomène adaptatif du parasite [259]. Par ailleurs, l'aneuploïdie de *Leishmania* pourrait être impliquée dans un nouveau modèle de reproduction parasexuelle (revu par [253]). Plus généralement, les découvertes faites sur l'aneuploïdie tendent à dire que cette caractéristique est constitutive de *Leishmania* [252].

### 2.3.3.2. Amplifications géniques

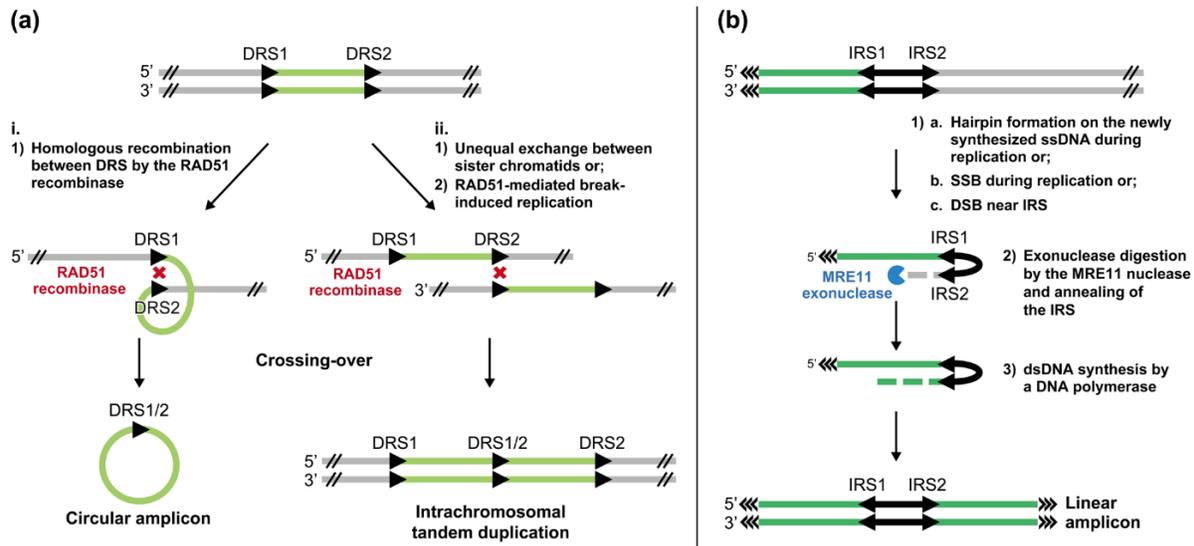
La plasticité du génome de *Leishmania* est également sa capacité à réaliser des amplifications géniques fréquentes et stochastiques [258]. De même que l'aneuploïdie, ces amplifications contribuent à la diversité génétique constitutive au sein des populations de *Leishmania* [258], et sont bénéfiques pour le protozoaire. Elles lui permettent notamment de contrôler le nombre de copies d'un gène (ou d'un groupe de gènes) et donc de lui conférer une meilleure survie dans des situations de stress environnementaux (par exemple lors d'une pression médicamenteuse) [256, 258]. Toutefois, il est important de préciser qu'entre 60% et 80% des amplicons prédits semblent déjà « préexister » chez *Leishmania* (même en l'absence de sélection) et leur « préexistence » aurait pour but de favoriser des traits adaptatifs précis, en réponse à la pression médicamenteuse [260]. La plupart du temps, une fois le stress environnemental retiré, l'abondance de ces amplicons diminuerait, soulignant une fois de plus la capacité d'adaptation du parasite [260].

La majorité de ces amplifications sont extrachromosomiques et apparaissent sous la forme d'amplicons circulaires ou linéaires (Figure 6). Elles concernent de petites régions spécifiques d'ADN et se situent au niveau de séquences répétées (SR) homologues. *Leishmania* possède de nombreuses SR qui ont le potentiel d'être réarrangées pour générer des éléments d'ADN extrachromosomiques [260]. Plus précisément, environ 2 000 SR ont été identifiées dans le génome de *L. infantum* (ce qui correspond à environ 5% du génome) et elles permettraient potentiellement la formation de plus de 3 000 éléments d'ADN extrachromosomiques [260]. Bien que le point commun de ces amplifications soit la présence des SR, selon l'aboutissement circulaire ou linéaire, leur formation est différente et spécifique. En effet, la recombinaison homologue entre des SR directes permet la formation d'**amplicons circulaires** (Figure 6, (a)), tandis que l'appariement de SR en orientation inversée amène à la formation d'**amplicons linéaires** (Figure 6, (b)) [257, 260, 261]. De plus, la formation des amplicons linéaires extrachromosomiques est dépendante de MRE11 (une nucléase impliquée dans la réparation de l'ADN) [261], tandis que la formation des amplicons circulaires



Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

extrachromosomiques est dépendante de RAD51 (principale recombinaison chez les eucaryotes) [260]. Bien que la recombinaison homologue ait pour but de maintenir la stabilité du génome, *Leishmania* exploite les fonctions de RAD51 à son avantage pour former des amplicons circulaires extrachromosomiques bénéfiques [262].



**Figure 6.** Model des mécanismes potentiels d'amplifications géniques chez *Leishmania* [258]

(a) La recombinaison RAD51 permet la formation (i) d'un amplicon circulaire extrachromosomique ou (ii) d'une duplication intrachromosomique en tandem. (b) La nucléase MRE11 permet la formation d'une amplification linéaire extrachromosomique. Abréviations : DRS, séquences répétées directes ; IRS, séquences répétées inversées ; SSB, rupture simple brin ; DSB, rupture double brin ; ADNdb, ADN double brin ; ADNss, ADN simple brin.

### 2.3.3.3. SNPs et délétions

Les SNPs sont les variations génétiques les plus courantes dans les génomes humains. Chez *Leishmania* elles sont fréquentes et peuvent être impliqués dans la résistance médicamenteuse (par exemple dans la résistance à la miltefosine [263, 264] et à l'amphotéricine B [265]) et dans l'augmentation de la virulence (par exemple chez la souche *L. major*, concernant le facteur de virulence P46 [266]). Finalement des délétions de gènes peuvent aussi avoir lieu chez le protozoaire, et de même que pour la plupart des autres particularités génomiques du parasite, ces modifications peuvent être impliquées dans la résistance de *Leishmania* [257].

## 2.3.4. Expression génique

### 2.3.4.1. Absence de promoteur chez *Leishmania*

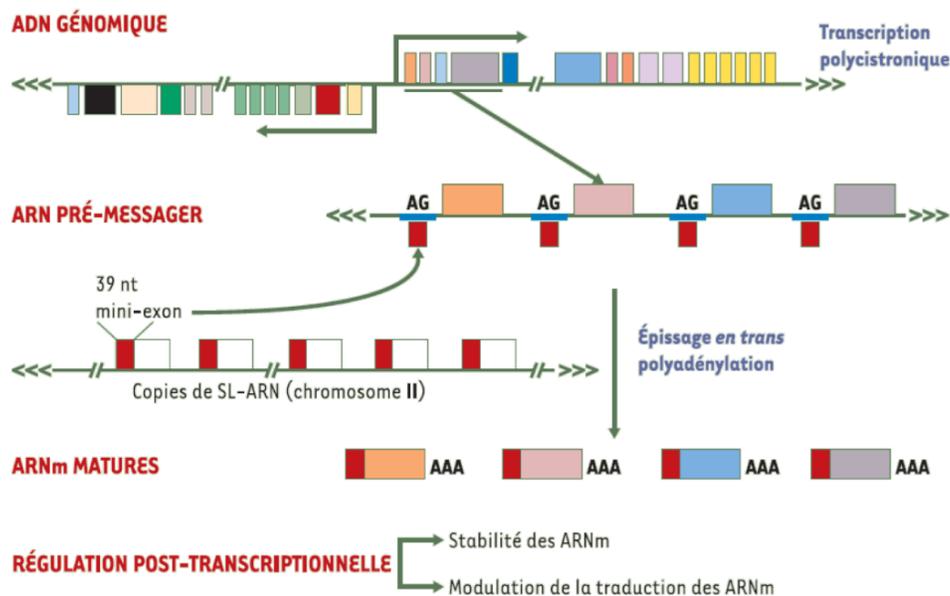
Chez les eucaryotes, l'expression des gènes est un processus complexe et hautement régulé. L'initiation de la transcription est contrôlée grâce à des séquences promotrices (ou promoteurs) qui agissent en *cis*, et qui favorisent le recrutement de facteurs généraux de transcription (qui agiront en *trans*) et/ou de facteurs régulateurs [267, 268]. Par ailleurs, outre leur rôle dans la régulation de l'initiation de la transcription, les promoteurs des gènes contiennent des éléments d'ADN spécifiques qui permettent de les catégoriser [269]. À titre d'exemples, la présence ou l'absence d'une « boîte TATA » au niveau des promoteurs est un critère largement utilisé dans la classification des gènes [270, 271]. Plus généralement, les promoteurs permettent la fixation de l'ARN polymérase, le complexe enzymatique responsable de la transcription de l'ADN génomique en ARN. Contrairement aux eucaryotes, chez *Leishmania* il n'existe pas de séquences promotrices classiques qui régulent l'initiation de la transcription, et le parasite possède un mécanisme unique de transcription des gènes : la « transcription polycistronique ». Toutefois, chez *L. tarentolae*, un élément conservé pouvant potentiellement être défini comme « promoteur » aurait été identifié [272].

### 2.3.4.2. Transcription polycistronique

Dans le génome du parasite, on peut constater la présence d'**unités de transcription polycistroniques** (« PTUs », pour « *Polycistronic Transcription Units* »), définies par la succession de plusieurs centaines de gènes orientés de la même façon et fonctionnellement non apparentés (Figure 7) [221, 222, 273]. Cette caractéristique notable et particulière est également retrouvée dans le génome des autres *Kinetoplastidae* [273]. Les PTUs, qui sont convergentes ou divergentes, peuvent s'étendre sur plus de 1 200 kb et sont généralement séparées par des régions dites de « changement de brin » de 0.9 à 14 kb [221, 274]. D'après certains travaux, la transcription des gènes codant pour les protéines serait effectuée de façon bidirectionnelle à partir des régions de changement de brin [275-277] et se terminerait au niveau des régions convergentes des PTUs [276]. Bien que moins courant, il semblerait que la transcription puisse aussi être amorcée en dehors des régions de changement de brin, soulignant une fois de plus la complexité du génome du parasite [278]. D'autre part, bien qu'une étude ait démontré l'implication de l'ARN polymérase I dans la transcription génique de *Leishmania* [279], des études plus récentes suggèrent un rôle pour l'ARN polymérase II [280, 281]. Et comme précisé dans la [section 2.3.2.1.](#), la base J semble contrôler la terminaison de la transcription,

Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

en bloquant l'ARN polymérase II à la fin des PTUs [244-246]. Les ARNs produits sont d'abord qualifiés « d'ARNs pré-messagers » et nécessitent une maturation pour devenir des « ARNm matures » et être traduits en protéines. Deux processus couplés ont lieu : l'épissage en *trans* et la polyadénylation. Lors de l'épissage en *trans*, un ARN « leader » épissé de 39 nucléotides (qui contient la coiffe de l'ARNm) est ajouté en 5' des ARNm, au niveau d'un site accepteur [281, 282]. Finalement, bien que la transcription polycistronique soit coûteuse en énergie, elle permet à *Leishmania* d'exprimer son génome de manière constitutive pour la majorité des gènes et donc de pouvoir facilement s'adapter à son environnement (revu par [283]).



**Figure 7.** Déroulement de l'expression génique chez *Leishmania* [282]

Les gènes de *Leishmania* sont organisés en unités polycistroniques, qui sont transcrites en ARN pré-messagers. Ces derniers subissent une maturation (addition d'un mini-exon en 5' (épissage en trans) et polyadénylation en 3') pour devenir des ARNm matures. Une régulation post-transcriptionnelle a ensuite lieu. Abréviations : SL-ARN, spliced leader ARN ; nt, nucléotide.

### 2.3.4.3. Régulation post-transcriptionnelle

Chez les *Trypanosomatidae*, l'expression des gènes est régulée par la dégradation des ARNm selon deux méthodes. La première (appelée « voie constitutive ») consiste en une déadénylation, suivi d'une dégradation à partir de l'extrémité 3' ; la seconde (qualifiée de « voie régulée ») semble être indépendante de la déadénylation [284, 285]. Chez *Leishmania*, les connaissances actuelles (en prenant en compte la présence des PTUs et l'absence de promoteurs classiques) suggèrent que la régulation de l'expression génique du

## Chapitre 2. Le parasite *Leishmania*

parasite est un réseau complexe d'éléments post-transcriptionnels situés à différents niveaux (stabilité des ARNm, efficacité de la traduction, régulation de la traduction, ...) [282, 285-287].

La **régulation post-transcriptionnelle** a d'ailleurs été démontrée très tôt dans des travaux portant sur l'étude de la réponse aux stimuli environnementaux, dans lesquels les protéines HSP70 et HSP83 étaient synthétisées à des taux élevés pendant le stress thermique [288]. Par la suite, d'autres travaux portant sur *L. major* ont montré que la stabilité des ARNm impliquerait également des éléments régulateurs, tels que les petits rétrotransposons dégénérés « SIDER1 » et « SIDER2 » [289]. En effet, il a été démontré que SIDER2 peut déstabiliser et dégrader les ARNm [289, 290], et SIDER1 régule spécifiquement la traduction des ARNm [291]. Finalement, il existerait des différences de régulation (peut-être spécifiques au stade de développement du parasite) et la stabilité des ARNm serait moins prononcée chez les promastigotes que chez les amastigotes [292].





## Chapitre 3. Prévention et traitements contre la leishmaniose



[3.1. Prévention de la leishmaniose](#)

[3.2. Traitements médicamenteux contre la leishmaniose](#)



## 3.1. Prévention de la leishmaniose

Pour la prévention et le contrôle des MTNs, l'OMS recommande la mise en place de différentes stratégies, en particulier : **(i)** l'approvisionnement en eau potable et l'assainissement dans les pays en voie de développement, **(ii)** la chimio-prévention, **(iii)** la lutte antivectorielle, **(iv)** la prise en charge rapide des cas, et **(v)** la création de mesures de santé publique. Cependant, le développement de médicaments pour les MTNs étant très limité (notamment en raison d'un manque d'initiatives et/ou de ressources financières) [293], la prévention des MTNs à transmission vectorielle repose principalement sur la **lutte antivectorielle**. Plus exactement, c'est même LE seul moyen de prévention pour un grand nombre de ces maladies, comme la leishmaniose (revu par [294]). Dans l'infection à *Leishmania*, en parallèle de la lutte antivectorielle ([section 3.1.1.](#)), certains pays ont également recommandé et pratiqué l'abattage des chiens infectés par *Leishmania*. En plus des problèmes éthiques et moraux qu'a entraînée cette pratique, plusieurs preuves scientifiques ont révélé que cette méthode n'était pas totalement efficace pour interrompre la transmission du pathogène et que d'autres méthodes préventives adaptées présentaient de meilleurs résultats [295, 296] et revu par [297]). Malgré tout, les stratégies préventives actuellement disponibles restent limitées et il n'existe aucun vaccin qui offre une prévention optimale contre la maladie, ce qui souligne le besoin urgent de développer de nouveaux vaccins adaptés et efficaces. À ce propos, des travaux ont récemment proposé une nouvelle approche vaccinale (basée sur l'utilisation d'antigènes des phlébotomes) à l'efficacité prometteuse (revu par [298]), ravivant l'espoir de parvenir dans un futur proche à un meilleur contrôle de la maladie ([section 3.1.2.2.](#)).

### 3.1.1. La lutte antivectorielle

Par définition, la lutte antivectorielle a pour but de réduire la transmission des agents pathogènes, en empêchant le contact entre le vecteur et l'hôte. Initialement, elle reposait principalement sur la gestion de l'environnement, en s'appuyant sur la connaissance des vecteurs (écologie, comportement, etc.). L'arrivée des insecticides a ensuite « facilité » la lutte antivectorielle, mais l'utilisation abusive de ces produits a aussi eu des effets destructeurs sur la biodiversité, et a entraîné l'émergence de vecteurs résistants.

#### 3.1.1.1. Premières tentatives de lutte contre les phlébotomes

Historiquement, les premières tentatives de lutte contre les phlébotomes semblent dater de la fin de la Première Guerre Mondiale. La gestion de l'environnement était la méthode de contrôle standard et reposait



## Chapitre 3. Prévention et traitement contre la leishmaniose

notamment sur deux grands principes : établir les campements sur un terrain drainé et nivelé, et veiller à garder un sol imperméable aux phlébotomes (colmatage des fissures et traitement à la chaux) (revu par [294]). Par la suite, le contrôle des phlébotomes a été complété par l'utilisation d'outils chimiques, tels que la pulvérisation de crésol ou la répartition de goudron autour des tentes [299]. Cependant, à cette époque, peu de progrès en termes de développement d'outils chimiques ont été réalisés contre les phlébotomes adultes. Pour pallier ce manque, quelques outils plus « simples » ont été développés, tels que l'utilisation de moustiquaires. Cependant, en raison de la petite taille des phlébotomes, les moustiquaires devaient être confectionnées avec des mailles extrêmement fines, ce qui les rendaient inconfortables dans les régions chaudes, et donc finalement peu/mal utilisées (revu par [294]).

### 3.1.1.2. Le succès de la pulvérisation chimique à base de DDT

Ce n'est qu'à partir des années 1940, que l'utilisation d'outils à base de produits chimiques a été vue comme une stratégie révolutionnaire. En effet, l'invention du premier insecticide à effet rémanent, le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), a augmenté considérablement l'efficacité de la lutte antivectorielle contre les phlébotomes. Plus précisément, c'est grâce à la pulvérisation intra-domiciliaire (PID) de DDT que la lutte contre ces vecteurs a eu le meilleur succès, et a permis de réduire de manière fulgurante l'incidence des cas dans plusieurs régions du monde [300, 301] et revu par [294, 302]. Cependant, à la fin des années 1990, en raison des effets considérés comme étant trop dangereux, l'utilisation du DDT dans les programmes de PID a été interdite, notamment au Népal et au Bangladesh (revu par [303]). Suite à l'interdiction de l'utilisation du DDT, une forte augmentation du nombre de cas de leishmaniose a été observée (revu par [304]). En désaccord avec cette décision, une utilisation illégale du DDT sous différentes formes a été rapportée, notamment au Bangladesh [305]. Selon certains rapports, les intentions étaient de retrouver un contrôle efficace des phlébotomes, mais également d'éviter l'apparition de diverses maladies susceptibles d'être provoquées par les immenses stocks restant du produit [305].

### 3.1.1.3. Autres formulations d'insecticides

Récemment, une étude a confirmé le succès de la prévention basée sur la pulvérisation chimique et la gestion environnementale dans des zones où aucun cas de leishmaniose n'avait été signalée [306]. Cependant, en raison de la taille étendue des zones à traiter et de son impact sur la santé publique, cela fait quelques années déjà qu'il est soutenu que la pulvérisation chimique ne peut pas être une stratégie viable à long terme (revu



## Chapitre 3. Prévention et traitement contre la leishmaniose

par [307]). D'autres méthodes d'utilisation des insecticides (et des répulsifs) ont été commercialisées, telles que des moustiquaires et des colliers pour chien imprégnés, des lotions, et des sprays (revu par [307, 308]). Plusieurs études ont rapporté l'efficacité de ces outils, notamment dans la protection des chiens [309-313], qui rappelons-le, sont considérés comme le principal réservoir de la maladie (revu par [1]). Plus précisément, en Iran, l'utilisation de collier de chien imprégnés d'insecticide a réduit l'incidence de l'infection humaine de plus de 40% et la leishmaniose viscérale infantile de 50% [313, 314].

### 3.1.1.4. L'émergence de vecteurs résistants

Depuis leur développement, l'utilisation d'insecticides chimiques constitue la stratégie de lutte antivectorielle la plus répandue. Beaucoup d'efforts ont été réalisés pour lutter contre les moustiques vecteurs, notamment dans les programmes de contrôle du paludisme. Un bon nombre d'insecticides ont été développés et peuvent être regroupés dans six grandes classes : les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthrinoïdes, les pyrroles et les phénylpyrazoles (revu par [315]). Cependant l'utilisation de ces produits a parfois été trop intensive, ce qui a entraîné l'émergence de moustiques résistants. De plus, il est évident que d'autres vecteurs, tels que les phlébotomes, aient également été exposés à ces produits lors des utilisations répétitives. Par conséquent, la résistance aux insecticides chez les phlébotomes a également été rapidement signalée dans plusieurs régions du monde, en particulier dans les zones d'endémie palustre et dans les pays voisins, tels que l'Inde [316, 317]. Toutefois, une étude récente réalisée au Bangladesh et au Népal, portant sur la sensibilité des phlébotomes, a montré, qu'heureusement, ces vecteurs restent largement sensibles aux insecticides utilisés [318]. Cependant, il est primordial de contrôler et de varier l'utilisation de ces produits afin de limiter le risque de se retrouver face à une résistance grandissante et persistante des vecteurs.

### 3.1.1.5. Modification génétique et paratransgénèse

Bien que différentes stratégies soient utilisées pour la lutte antivectorielle, l'état actuel de la situation souligne le besoin urgent de créer de nouveaux outils de lutte. Conscient de cette nécessité, l'OMS soutient le développement de toutes technologies potentiellement bénéfiques, telles que la modification génétique et la paratransgénèse, à conditions bien évidemment que celles-ci soient réglementées [319]. A titre d'exemples, des travaux ont été réalisés sur la manipulation génétique des moustiques pour lutter contre le paludisme [320] et sur l'infection bactérienne (*Wolbachia*) des vecteurs pour empêcher la transmission de la dengue et de d'autres arbovirus à l'homme [321]. Dans le cas de la leishmaniose, bien que peu d'études soient

## Chapitre 3. Prévention et traitement contre la leishmaniose

disponibles sur ce sujet, des travaux récents ont montré que des espèces bactériennes constituent des candidats potentiels pour l'approche paratransgénique [322, 323]. Ces découvertes ont redonné de l'espoir dans la lutte contre la maladie, mais des études complémentaires restent nécessaires afin de mieux comprendre l'utilisation potentielle des bactéries dans le contrôle des parasites *Leishmania*. Finalement, outre ce type de technologie, la vaccination fait également partie des stratégies étudiées pour la lutte antivectorielle.

### 3.1.2. La vaccination

#### 3.1.2.1. Bref historique de la vaccination

Les maladies infectieuses existent depuis de nombreuses années, mais l'histoire de la vaccination n'a débutée qu'à partir de la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle, notamment avec les travaux du médecin anglais Edward Anthony Jenner, basés sur l'inoculation expérimentale de la variole (1798) (revu par [324]). A cette époque, bien que cette découverte ait été efficace dans la lutte contre la variole, le manque général de connaissances en microbiologie et en immunologie n'a pas permis l'application de ce processus à d'autres maladies infectieuses. Ce n'est qu'à partir de la fin des années 1800 que les travaux du célèbre scientifique Louis Pasteur ont permis une meilleure compréhension des vaccins (composition, mode d'action, etc...) et ont ainsi ouvert la voie à d'autres infections [325]. Ces nouvelles découvertes ont d'ailleurs constituées le début du « *premier âge d'or* » de la vaccination [325]. Depuis, un certain nombre de vaccins ont pu être développés, notamment contre les agents pathogènes de maladies bactériennes (choléra et typhoïde (1896), peste (1897), coqueluche (1926), tuberculose (1927)) et virales (rage (1885), fièvre jaune (1935), poliomyélite (1955 et 1963), rougeole (1963), oreillons (1967), rubéole (1969)) (revu par [324, 326]). Cependant, contrairement aux maladies bactériennes et virales, les infections à protozoaires présentent un retard important en termes de développement de vaccins. A titre d'exemple, bien que les premières descriptions du paludisme (l'une des maladies négligées les plus importantes) dates du Ve siècle avant notre ère (revu par [327]), aucun vaccin contre *Plasmodium* n'a encore été homologué (revu par [328]). De même, dans le cas des leishmanioses humaines, aucun vaccin moderne n'est actuellement autorisé (revu par [328]).

Plusieurs raisons semblent expliquer le retard de développement de vaccins anti-protozoaires, en particulier le manque de connaissances qu'il y avait à l'époque (revu par [328]). Par exemple, la description précise du cycle biologique de *Plasmodium* et la compréhension de sa transmission n'ont été réalisées qu'au début des années 1900, soit tardivement après les premières observations de la maladie [329]. Les descriptions scientifiques en lien avec la leishmaniose n'ont également débuté qu'à partir du XX<sup>ème</sup> siècle, notamment



## Chapitre 3. Prévention et traitement contre la leishmaniose

avec la description du parasite par Leishman et Donovan [7]. D'autre part, la coévolution des parasites et de leur(s) hôte(s) rendent difficile la compréhension de certains paramètres biologiques et immunologiques, et par conséquent, le développement de vaccins efficaces (revu par [324]). Ces paramètres peuvent aussi être complexes dans les maladies bactériennes et virales, mais contrairement à elles, les maladies négligées provoquées par des protozoaires (comme le paludisme et la leishmaniose) n'ont eu d'intérêt, en termes de développement de vaccins, que récemment (revu par [328]).

### 3.1.2.2. Histoire de la vaccination chez *Leishmania*

L'histoire de la vaccination chez *Leishmania* a débuté avec l'utilisation de « vaccins vivants », aussi connus sous le nom du principe de « leishmanisation ». Cette méthode consistait à « *injecter des parasites virulents vivants ou des extraits de tissus de lésions infectées dans des parties cachées du corps d'un individu non immunisé, afin d'empêcher la formation de lésions visibles suite à des lésions naturelles* » (revu par [330]). Dans ce contexte, les premiers travaux basés sur l'inoculation de *L. tropica* ont révélé qu'une lésion persistait d'environ 3 mois à 1 an, et qu'après un suivi de 2 ans, les individus qui avaient développé des cicatrices au site de vaccination détenaient une meilleure protection (80%) contre le parasite [331]. De même, diverses autres études ont mis en avant des résultats protecteurs au sujet de la leishmanisation [332] et revu par [333, 334]. Toutefois, bien que cette pratique semblât prometteuse, elle a rapidement été abandonnée en raison de complications majeurs, telles que l'exacerbation des maladies de la peau, l'apparition de lésions cutanées non cicatrisantes, et l'impact de l'immunosuppression [335] et revu par [336].

Le développement de nouvelles technologies et de méthodes de manipulation génétique plus précises chez le protozoaire a ensuite permis aux chercheurs de se concentrer sur la mise au point de d'autres types de vaccins, en particulier les **vaccins de première génération** (constitués de parasites vivants atténués, de parasites tués, ou de l'antigène de *Leishmania* fractionné), les **vaccins de seconde génération** (aussi nommés « vaccins sous-unitaires » ; constitués de protéines recombinantes) et les **vaccins de troisième génération** (constitués d'ADN) (revu par [337]). Par ailleurs, des travaux ont proposé une stratégie de **vaccination volante** qui consistait en l'utilisation de la protéine salivaire SP15 du phlébotome *Phlebotomus papatasi*, une protéine connue pour augmenter l'infection à *Leishmania* [338]. Cette étude a montré que les souris ayant reçu des morsures des phlébotomes modifiés avaient des niveaux élevés d'anticorps anti-SP15, ce qui valida la stabilité et l'immunogénicité de la protéine lors du transfert à l'hôte mammifère [338]. Toutefois, des travaux complémentaires sont nécessaires pour vérifier la fonctionnalité et l'universalité de cette stratégie

## Chapitre 3. Prévention et traitement contre la leishmaniose

de vaccination. Plus généralement, bien que des formulations vaccinales antileishmaniales aient été créés, quelques candidats seulement ont été choisis pour des essais cliniques (revu par [337]).

Même s'il n'existe actuellement aucun vaccin efficace à long terme contre la leishmaniose, des progrès notables ont tout de même été observés au cours du temps. La recherche a notamment permis l'élaboration de quatre vaccins vétérinaires homologués, qui permettent de réduire le risque d'apparition de signes cliniques et de progression de la maladie chez les chiens infectés [339, 340]. Il s'agit des vaccins Leishmune® (premier vaccin contre la leishmaniose canine ; utilisé depuis 2004 au Brésil, mais la licence définitive n'a été obtenue qu'en 2011 [341]), [LEISH-TEC](#) (licence obtenue au Brésil en 2008), [CaniLeish](#) (mis sur le marché depuis 2011) et [LetiFend®](#) (commercialisé en Europe depuis 2016). Par ailleurs, un vaccin récemment breveté s'est révélé prometteur comme nouvelle stratégie de lutte antivectorielle. Basé sur l'utilisation d'antigènes non salivaires de phlébotomes, ce vaccin permettrait de bloquer l'infection à *Leishmania* et d'altérer son cycle de vie (revu par [298]). Pour l'humain, il n'existe actuellement aucun vaccin disponible. Toutefois, la recherche montre que les avancées obtenues concernant les vaccins de seconde génération (tels que LEISH-F2) et les vaccins à base d'ADN semblent prometteurs pour la prévention de la leishmaniose humaine (revu par [337]). A titre d'exemple, Das et al. [342] ont utilisé des cellules humaines pour développer un vaccin à ADN, nommé « [LEISHDNAVAX](#) ». Fondé sur l'utilisation d'antigènes (conservés dans diverses espèces de *Leishmania*, différentes régions endémiques et dans le temps), ce vaccin induit une immunité basée sur les lymphocytes T et s'est avéré protecteur dans un modèle d'infection de rongeurs [342, 343].

### 3.2. Traitements médicamenteux contre la leishmaniose

Malgré la lutte antivectorielle ([section 3.1.1.](#)), l'absence de vaccins efficaces contre la leishmaniose ([section 3.1.2.](#)) amène à une prévention globale de la maladie très limitée. Par conséquent, le contrôle de la leishmaniose repose essentiellement sur l'utilisation d'agents chimiothérapeutiques. Cependant, la courte liste de médicaments disponibles sur le marché offre peu de possibilités en termes de choix de traitements. De plus, ces molécules ne sont pas idéales, notamment en raison du coût élevé, du type d'administration, de leur toxicité et de leur accès limité dans certaines zones du monde. Par ailleurs, la grande majorité des médicaments antileishmaniens sont produits par un seul fabricant, ce qui entraîne des problèmes non négligeables en termes de qualité, de capacité de production et d'approvisionnement. En effet, les besoins en médicaments sont souvent mal connus, ce qui entraîne des ruptures de stocks, surtout dans les pays endémiques. Même si l'OMS déploie de nombreux efforts pour promouvoir un accès équitable aux services



## Chapitre 3. Prévention et traitement contre la leishmaniose

de santé (réduction du prix des médicaments, financement pour certains diagnostics et traitements, dons de médicaments, etc.), l'état actuel reste préoccupant. Par ailleurs, depuis plusieurs années, il existe un comité d'experts de l'OMS qui se réunit tous les deux ans pour évaluer (sur la base de preuves scientifiques) les médicaments commercialisés, notamment leur efficacité, leur innocuité et leur rentabilité. Ces vérifications permettent d'identifier ceux qui correspondent le mieux aux contextes et aux priorités sanitaires actuels, et de les regrouper dans « la liste modèle de l'OMS des médicaments essentiels (LME) », accessible sur internet. Finalement, les composés utilisés pour le traitement de la leishmaniose ont évolué au cours du temps, mais certains datent depuis de nombreuses années. Actuellement, 6 antileishmaniens sont indiqués sur la LME pour le traitement de la leishmaniose humaine : les dérivés de l'**antimoine** pentavalent ( $Sb^V$ ) (dont le stibogluconate de sodium (« SSG », pour « *Sodium Stibogluconate* ») et l'antimoniote de méglumine (AM) [344]), la **miltefosine** (MF), l'**amphotéricine B** (AmB), la **paromomycine** (PMM) et la **pentamidine** (PTD). Pour la leishmaniose canine (LCan), les agents chimiothérapeutiques actuellement utilisés regroupent les six médicaments de la LME, ainsi que l'**allopurinol** (ALP) et la **dompéridone** (DPD) (revu par [345]), mais d'autres molécules semblent potentiellement efficaces [346]. Par exemple, une étude récente a montré que des nucléotides alimentaires et le composé actif corrélé à l'hexose (« AHCC », pour « *Active Hexose Correlated Compound* ») modulent la réponse immunitaire avec une efficacité similaire à l'allopurinol [347].

### 3.2.1. Quelques repères historiques sur le traitement de la leishmaniose

**1912** **Tartrate d'antimoine et de potassium** | Au début du XX<sup>ème</sup> siècle (1909), Paul Ehrlich identifie le salvarsan : le premier composé organométallique détenant des propriétés médicinales efficaces, notamment contre la syphilis [348]. En 1912, un autre composé organométallique, le tartrate d'antimoine et de potassium (aussi connu sous le nom de tartre émétique) est utilisé par le Dr. Gaspar Vianna comme premier traitement contre la leishmaniose cutanée (LC) [349]. En 1915, l'efficacité du tartre émétique est confirmée contre la leishmaniose viscérale (LV) en Sicile, par Di Cristina et Caronia [350] et en Inde, par Sir Leonard Rogers (l'un des pionniers les plus importants de la médecine tropicale) [351].

**1922** **Urée stibamine** | Malgré l'efficacité du tartre émétique, sa toxicité et son instabilité favorisent le développement de d'autres composés [352]. En 1922, le professeur Brahmachari synthétise l'urée stibamine, un médicament contenant de l'antimoine et utilisé en Inde pour le traitement de la LV [353, 354]. Malgré sa toxicité, son utilisation a sauvé de nombreuses vies. Grâce à ce succès, le

professeur Brahmachari a eu la Médaille Kaisar-I-Hind et a été nommé pour le prix Nobel. Cependant, l'urée stibamine n'est actuellement plus utilisée.

**1945 Antimoines pentavalents (Sb<sup>V</sup>)** | En 1945, les travaux de Brahmachari, Schmidt, Kikuth et *al.*, ont permis d'introduire la première ligne de médicaments pour le traitement de la leishmaniose : les antimoines pentavalents [355]. Il s'agissait notamment du stibogluconate de sodium (« SSG », pour « *Sodium Stibogluconate* ») (aussi nommé gluconate d'antimoine de sodium (« SAG », pour « *Sodium Antimony Gluconate* »)), et de l'antimoniate de méglumine (AM) (également connu sous le nom d'antimoniate de N-méthylglucamine) [355, 356]. Même si leur introduction sur le marché date de plusieurs années, et que leur toxicité est connue, les antimoines pentavalents sont toujours utilisés pour lutter contre la leishmaniose. Ils sont d'ailleurs encore considérés comme des médicaments de première intention, autant pour lutter contre la leishmaniose humaine que pour la leishmaniose canine (revu par [345, 357]).

**1949 Pentamidine (PTD)** | La PTD est utilisée depuis 1935 dans le traitement des trypanosomiasés (revu par [358]). En 1949, elle est utilisée pour la première fois en Inde, pour le traitement de la LV de patients ne répondant plus au Sb<sup>V</sup> (revu par [357]). Depuis les années 1950, la PTD est utilisée contre différentes formes de leishmaniosés [359], mais seulement en seconde intention. À la fin des années 1970, l'utilisation de la PTD reprend de l'importance, notamment en raison de l'augmentation du nombre de patients ne répondant plus au Sb<sup>V</sup>. Son efficacité est constatée à plusieurs reprises, avec des taux de guérison dépassant les 98%, et sans rechute signalée [360]. Cependant, le succès de la PTD ne dure que très peu de temps, et les taux de guérison diminuent rapidement (autour des 75%), suggérant l'émergence de parasites résistants [361, 362]. Finalement, l'efficacité réduite et la toxicité élevée ont conduit à un abandon complet du médicament pour le traitement de la LV en Inde [363]. Toutefois, la PTD fait partie de la LME de l'OMS et est utilisée pour le traitement de la LCan (revu par [345]).

**1960 Amphotéricine B (AmB), formulation désoxycholate (Fungizone)** | En 1956, des travaux sur une bactérie du genre *Streptomyces* ont permis la découverte de l'AmB [358]. Bien qu'il s'agisse d'un agent antifongique, l'AmB a été utilisée comme traitement de deuxième intention pour le traitement de la LV, à partir des années 1960 (revu par [364]). Cependant, en raison des nombreux effets secondaires, son utilisation était limitée [365, 366].



**1980** **Paromomycine (PMM)** | La PMM est un antibiotique aminoside initialement utilisé contre les protozoaires intestinaux et certaines bactéries. Dans les années 1980, son activité leishmanicide est découverte [367] et revu par [358, 368]. La PMM est utilisée pour la première fois au Kenya chez des patients atteints de LV, et son efficacité est rapidement reconnue [369]. Malgré ce succès thérapeutique et le besoin de nouveaux composés, la PMM n'a été autorisée en Inde qu'en 2006 [370]. Aujourd'hui, la PMM fait partie de la LME et est utilisée contre la LCan comme second choix (revu par [345]).

**1990** **Amphotéricine B (AmB), formulations lipidiques (AmBisome)** | En 1990, de meilleures formulations d'AmB ont été synthétisées (à partir d'espèces de *Streptomyces* moins toxiques) et utilisées chez de nombreux patients atteints de leishmaniose réfractaire aux Sb<sup>V</sup> ou à la PTD (revu par [358]). En médecine vétérinaire, les nouvelles formulations d'AmB sont utilisées comme médicament de second choix (revu par [345]).

**1991** **Allopurinol (ALP)** | De plus en plus d'échecs thérapeutiques et de cas de résistance ont été rapportés (essentiellement en l'Inde) (revu par [358]), ce qui a favorisé la recherche de nouveaux traitements. Bien que l'activité de l'ALP contre *Leishmania* ait été signalée en 1974 [371], sa première utilisation contre la LC n'a eu lieu qu'en 1991 [372]. Cependant, en raison de son inefficacité en monothérapie, son utilisation reste peu fréquente en médecine humaine (aujourd'hui, l'ALP ne fait pas partie de la LME). A l'inverse, pour la LCan, l'ALP est le composé le plus utilisé dans les chimiothérapies combinées, notamment en Europe [373]. Finalement, l'ALP est également utilisé chez les chats (revu par [45]).

**2002** **Miltefosine (MF)** | La MF (un alkyl phospholipide développé comme agent antitumorale dans les années 1980 [374]) a aussi montré une efficacité contre *Leishmania* [363, 375]. Due à l'émergence grandissante de la résistance au Sb<sup>V</sup> en Inde, la MF a été approuvée en 2002 comme premier traitement oral pour la LV indienne [376]. Grâce à son efficacité (et à sa forme orale), la MF a été considérée comme une percée majeure dans le développement d'agents chimiothérapeutiques contre *Leishmania* [377].

**2009** **Dompéridone (DPD)** | La DPD (un dérivé du benzimidazole qui possède une activité antagoniste sélective des récepteurs dopaminergiques D2 (revu par [378])) est initialement utilisée en médecine humaine et vétérinaire pour des troubles gastriques ou pour élever la production de lait (revu par [379, 380]). En 2003, P. Gomez-Ochoa *et al.*, ont montré *in vitro* l'efficacité de la DPD contre le

parasite [381], et en 2009 ils ont confirmé son efficacité dans un essai clinique contre la LCan [382]. Depuis, les propriétés immunostimulantes de la DPD ont été reconnues comme étant efficaces contre la LCan, et la DPD est un composé recommandé en tant qu'agent prophylactique ou immuno-thérapeutique [383].

### 3.2.2. Caractéristiques générales des principaux antileishmaniens actuels

*Ci-dessous sont présentées les caractéristiques générales des principaux antileishmaniens actuels. Afin de constituer une suite logique avec la partie précédente, le même ordre de présentation des antileishmaniens sera utilisé, soit le suivant : les antimoniés pentavalents ( $Sb^V$ ), la pentamidine (PTD), l'amphotéricine B (AmB), la paromomycine (PMM), l'allopurinol (ALP), la miltefosine (MF) et la dompéridone (DPD).*

**Sb<sup>V</sup>** | Ils constituent le premier choix contre la LCan, dans les pays méditerranéens [373]. Ils sont utilisés de deux façons : seuls ou en association avec l'ALP ou la MF [373, 384]. Ils sont administrés par injection intraveineuse lente, sous-cutanée ou intramusculaire (revu par [345]). Une biodisponibilité et un volume de distribution élevés sont souhaités car l'effet leishmanicide du  $Sb^V$  dépend de la concentration atteinte dans les organes cibles (rate, foie et moelle osseuse) [385, 386]. De façon générale, le  $Sb^V$  a beaucoup d'inconvénients qui rendent son utilisation difficile sur le terrain.

**PTD** | Peu d'essais cliniques ont été réalisés sur l'utilisation de la PTD dans le traitement de la LCan, mais elle semble tout de même être efficace [387]. Bien qu'aucun effet secondaire n'ait été constaté chez le chien, il en existe chez l'humain [346]. Même si la PTD est sur la LME de l'OMS, son utilisation est secondaire, ou même non recommandée dans certains pays (revu par [345, 363]).

**AmB** | Avec la résistance croissante au  $Sb^V$ , l'AmB est devenue une alternative contre la LV. Cependant, son coût est élevé et étant donné sa haute toxicité, l'injection doit être lente et surveillée (revu par [388]). Les formulations lipidiques d'AmB (AmBisome) ont amélioré l'efficacité, et réduit la toxicité ainsi que les effets secondaires [389, 390]. L'OMS a d'ailleurs encouragé l'utilisation d'Ambisome comme dose unique pour les patients atteints de LV [391, 392], mais la dose semble très minime pour traiter la maladie [393]. Pour la LCan, l'AmB est un médicament de 2<sup>nd</sup> ou 3<sup>ème</sup> choix, notamment en raison de son impact sur la fonction rénale, et des taux de rechutes importants [40, 346].

**PMM** | Le traitement à la PMM semble efficace sur la LV humaine, est peu coûteux, et est souvent donné en association avec la MF ou le  $Sb^V$  [394, 395]. La PMM semble également efficace pour la LCan, mais elle est

### Chapitre 3. Prévention et traitement contre la leishmaniose

extrêmement néphrotique et ne peut donc pas être donnée à tous les chiens [396]. Bien que plus rares, des cas de d'ototoxicité chez le chien ont également été rapportés [40]. Il existe également une forme topique de la PMM qui est parfois utilisée dans le traitement de la LC [397], mais l'efficacité reste faible (revu par [398]).

**ALP** | Il est utilisé seul ou associé (avec Sb<sup>V</sup> ou MF) pour renforcer l'efficacité contre la LCan [399]. Cependant, son utilisation seule n'élimine pas efficacement les parasites et ne permet pas non plus la prévention [400]. De manière générale, l'ALP semble avoir une faible toxicité, mais presque tous les chiens traités ont des taux de xanthine anormaux, et plus occasionnellement des problèmes rénaux [401, 402]. En Europe, l'ALP est le médicament le plus utilisé en chimiothérapie combinée [373]. Par exemple, l'utilisation conjointe d'ALP et de MF est une bonne option thérapeutique, mais les taux de rechute sont plus élevés que dans les combinaisons Sb<sup>V</sup>-ALP [401].

**MF** | Dans les pays d'Europe du Sud, la MF remplace le Sb<sup>V</sup> comme médicament de 1er choix contre la LCan [373]. La MF a la particularité d'être soluble dans l'eau, ce qui permet l'administration par voie orale ; un fort avantage comparé aux autres antileishmaniens (revu par [345]). Toutefois, la MF ne parvient pas à réduire efficacement la charge parasitaire dans la moelle osseuse, laissant les chiens partiellement guéris [403]. De plus, la MF est tératogène, ce qui rend son utilisation non recommandée chez la femme enceinte [404, 405].

**DPD** | C'est une solution buvable utilisée dans le traitement de la LCan, mais également comme mesure prophylactique [406], revu par [345]). La DPD offre une amélioration des signes cliniques, mais la rémission complète de la maladie n'est pas obtenue [407]. Il a également été supposé que dans certaines zones endémiques, un traitement prophylactique à base de DPD offrait une meilleure protection contre la LCan par rapport à certains vaccins [406]. Les effets secondaires sont possibles, mais globalement plutôt rares [406].

Ci-dessous est présenté un résumé des informations clés sur les principaux antileishmaniens actuels.

Médicaments	Cibles		Indications			Format		Toxicité									
																	
Sb <sup>V</sup>	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PTD	✓	✓	✓			✓		✓	✓	✓	✓				✓	✓	✓
AmB	✓	✓	✓			✓									✓		
PMM	✓	✓	✓			✓				✓					✓	✓	
ALP	✓						✓								✓		
MF	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓	✓	✓			✓	✓	
DPD	✓						✓			✓							

**Tableau 1.** Informations clés sur les principaux antileishmaniens actuels.

[345, 396, 401-403, 408-414]

 Chiens,  Humains,  Forme viscérale (LV),  Forme cutanée (LC),  Forme muco-cutanée (LMC),  Voie parentérale,  Voie orale,  Douleur articulaire et/ou musculaire,  Maux de tête / fièvre,  Douleur abdominale,  Nausée et/ou vomissement,  Diarrhée,  Pneumonie,  Néphrotoxicité,  Hépatotoxicité,  Cardiotoxicité,  Thrombose

### 3.2.3. Principaux mécanismes d'action des antileishmaniens actuels

#### 3.2.3.1. Les antimoniés pentavalents ( $Sb^V$ ) |

Bien que les dérivés de l'antimoine soient utilisés dans le traitement de la leishmaniose depuis longtemps, leurs mécanismes d'action restent mal compris. Toutefois, deux modèles ont été proposés : **(1)** les  $Sb^V$  en tant que prodrogues et **(2)** les  $Sb^V$  comme formes actives (revu par [364, 415]).

##### 3.2.3.1.1. Les $Sb^V$ en tant que prodrogues

Dans ce modèle, les  $Sb^V$  administrés sont considérés comme des prodrogues qui nécessitent d'être réduites en antimoine trivalent ( $Sb^{III}$ ) pour devenir actives et leishmanicides [416]. Cependant, l'emplacement et les mécanismes précis impliqués dans la réduction sont soutenus par différentes théories, et constituent une source de débat. De ce fait, il est possible que les mécanismes d'action des  $Sb^V$  n'aient pas une seule, mais plusieurs « voies mécanistiques ». Ainsi, les principales connaissances actuelles sur les  $Sb^V$  en tant que prodrogues sont les suivantes :

**Entrée dans les amastigotes** | Les antimoniés peuvent pénétrer dans le parasite sous les deux formes ( $Sb^V$  et  $Sb^{III}$ ), mais selon des systèmes de transports différents [416]. L'entrée du  $Sb^{III}$  dans les amastigotes se fait par l'intermédiaire de l'aquaglycéroporine 1 (AQP1) [417], tandis que le  $Sb^V$  pénètre dans le parasite *via* un transporteur actuellement non identifié [418].

**Réduction du  $Sb^V$  en  $Sb^{III}$**  | Elle semble être possible dans les macrophages [419] et les amastigotes [416], et nécessite la présence de composés thiols de l'hôte et du parasite [420, 421]. Les 3 thiols majeurs sont la cystéine [422, 423], le glutathion (GSH) [424] et le trypanothione (T(SH)<sub>2</sub>) [202, 425] ; le T(SH)<sub>2</sub> étant l'antioxydant spécifique des *Trypanosomatidae* qui neutralise les ROS [202, 203]. La réduction peut être non enzymatique [420, 421, 426, 427], ou enzymatique quand elle implique la réductase thiol dépendante 1 [428] ou l'arséniate réductase 2 [429].

**Rôle du  $Sb^{III}$**  | Le  $Sb^{III}$  semble agir à différents niveaux : inhibition enzymatique des processus métaboliques essentiels [430, 431] ; formation de complexes avec des thiols, puis inhibition de la trypanothione réductase (perturbe l'équilibre redox, augmente la quantité de ROS et favorise l'apoptose des parasites) [432, 433] ; compétition avec le zinc pour la liaison à des protéines spécifiques impliquées dans les interactions protéines-acides nucléiques (entraîne une fragmentation de l'ADN et favorise l'apoptose de *Leishmania*) [415, 434].

## Chapitre 3. Prévention et traitement contre la leishmaniose

### 3.2.3.1.2. Les Sb<sup>V</sup> en tant que formes actives

Dans ce modèle les Sb<sup>V</sup> sont une forme active qui n'a pas besoin d'être réduite (en Sb<sup>III</sup>) pour être efficace. Des travaux proposent que les Sb<sup>V</sup> perturbent le métabolisme énergétique des amastigotes (en diminuant la synthèse d'adénosine-triphosphate (ATP)), ce qui réduit la viabilité des parasites [435, 436]. De plus, les Sb<sup>V</sup> affectent la survie des amastigotes en perturbant leurs processus cellulaires (en inhibant spécifiquement l'ADN topoisomérase de type I de *Leishmania*) [437, 438]. Par ailleurs, il semblerait que les Sb<sup>V</sup> forment des complexes avec des ribonucléosides pour agir comme (i) des inhibiteurs de transporteurs de purine de *Leishmania*, ou (ii) des perturbateurs de la voie de récupération de la purine [439, 440]. Étant donné que le parasite ne peut pas synthétiser le cycle purique *de novo*, la récupération des purines est un processus nutritionnel obligatoire pour sa viabilité [441]. Finalement, des travaux proposent que les Sb<sup>V</sup> induisent la production de ROS et de NO (principales molécules microbicides [442]) dans les macrophages infectés [443, 444]. La destruction des parasites serait ainsi renforcée grâce au système immunitaire de l'hôte qui agirait en 2 temps : ROS et NO (phase précoce de l'infection), puis de nouveau du NO (phase tardive) [445, 446].

### 3.2.3.2. La pentamidine (PTD) |

Bien que le mécanisme d'action précis de la PTD soit mal compris, des travaux ont montré que la nature et la structure de la PTD lui permette de se lier à l'ADN (en particulier à la topoisomérase II), inhibant ainsi la réplication et la transcription [447-449]. Il a également été proposé que la PTD entraîne une modification de la morphologie du kinétoplaste ([450], revu par [451]), et une inhibition du complexe II de la chaîne respiratoire [452], ce qui entraîne la destruction du parasite. Par ailleurs, la PTD semble entraîner la perturbation de la biosynthèse des polyamines du parasite, en inhibant l'absorption de l'arginine et des polyamines [453, 454].

### 3.2.3.3. L'amphotéricine B (AmB) |

De même que la MF, l'AmB altère la fluidité de la membrane plasmique du parasite. Pour cela l'AmB se lie avec l'ergostérol, ce qui induit la formation de pores aqueux dans la membrane. Ces pores entraînent la fuite vers l'extérieur de petites molécules intracellulaires de *Leishmania*, provoquant ainsi des perturbations métaboliques et la mort du protozoaire [455], revu par [388]. Il a été proposé que cette affinité de l'AmB pour l'ergostérol s'explique par son utilité initiale d'antifongique (l'ergostérol est en effet très présent dans les champignons [456]). D'autre part, l'AmB peut entraîner l'auto-oxydation et la formation de radicaux libres, ce qui entraîne la mort du parasite par apoptose [457]. Plus précisément, l'AmB induit la formation de ROS et

## Chapitre 3. Prévention et traitement contre la leishmaniose

entraîne une augmentation du niveau de calcium dans le cytosol. Ceci provoque la dépolarisation du potentiel membranaire mitochondriale et donc un dysfonctionnement mitochondrial qui finit par induire la mort cellulaire programmée du parasite (revu par [458]).

### 3.2.3.4. La paromomycine (PMM) |

Le mode d'action de la PMM chez *Leishmania* n'est pas parfaitement connu, mais il a été bien étudié chez les bactéries, notamment en raison de son utilisation initiale contre les infections bactériennes [459]. Malgré tout, quelques travaux chez *Leishmania* ont permis de suggérer que la PMM semble agir au niveau de la mitochondrie, en inhibant la synthèse des protéines (interaction avec les sous-unités ribosomiques) et en entraînant un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire [459-462]. Par ailleurs, la PMM semble altérer la fluidité membranaire du parasite, ainsi que le métabolisme des lipides [460, 463]. Finalement, pour compléter cette activité leishmanicide, la PMM semble aussi renforcer le système immunitaire de l'hôte [464].

### 3.2.3.5. L'allopurinol (ALP) |

L'ALP est un analogue de l'hypoxanthine (base purique associée au métabolisme des acides nucléiques [465]), qui inhibe l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT), une enzyme clé qui participe à la voie de récupération des purines. Étant donné que *Leishmania* n'est pas capable de synthétiser les purines *de novo* [466], l'inhibition de l'HGPRT permet à l'ALP phosphorylé de s'incorporer dans les acides nucléiques, de perturber la traduction et de favoriser la mort du parasite [465, 467], revu par [399].

### 3.2.3.6. La miltefosine (MF) |

De même que pour les Sb<sup>V</sup>, les mécanismes d'action de la MF ne sont pas clairement définis. Toutefois, des suggestions ont mis en évidence des interactions à différents niveaux. Tout d'abord, la MF semble altérer la fluidité de la membrane plasmique du parasite, en modifiant sa composition (interférence avec le métabolisme des acides gras et des stérols) [468, 469]. De plus, la MF semble interagir au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (inhibition de la cytochrome c oxydase (complexe IV), et donc altération du métabolisme énergétique [470]), et au niveau de l'ADN (condensation et fragmentation de l'ADN, induisant la mort du parasite par apoptose [471]). Par ailleurs, il a été démontré que la MF agit au niveau des cellules hôtes en stimulant la production de NO et en favorisant la réponse immunitaire de type Th1, ce qui permettrait ainsi l'élimination du parasite [472]. D'autres travaux ont montré que le métabolisme de la MF est un processus



## Chapitre 3. Prévention et traitement contre la leishmaniose

très lent, d'où l'importance d'avoir une concentration intracellulaire suffisante pour pouvoir être efficace [473]. Par conséquent, l'accumulation de la MF à l'intérieur du parasite (notamment grâce au transporteur de miltefosine (*LdMT*) [474]) est une étape primordiale pour la réussite du traitement. Il est aussi important de préciser que la fonction du *LdMT* dépend de sa liaison avec la protéine LRos3 (considérée comme une sous-unité  $\beta$  spécifique du *LdMT*) [475]. En effet, les deux protéines (*LdMT* et LRos3) sont mutuellement dépendantes pour leur fonction et leur localisation dans la membrane plasmique du parasite [475].

### 3.2.3.7. La dompéridone (DPD) |

La DPD stimule la production de prolactine par l'hypophyse, ce qui favoriserait la réponse immunitaire de type Th1, et par conséquent entrainerait l'élimination des parasites [382, 476]. Des travaux ont d'ailleurs démontré que la DPD stimulerait la réponse immunitaire jusqu'à un mois après le traitement et que cela jouerait notamment un rôle clé dans la guérison de la maladie [407, 477, 478]. Récemment, un essai thérapeutique a obtenu des résultats préliminaires sur la capacité de la DPD à améliorer la fonction rénale chez les chiens atteints de LCan [479].





## Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez *Leishmania*



[4.1. Les approches « -omiques » utilisées dans l'étude de la résistance](#)

[4.2. Un processus automatisé pour l'étude de la résistance ?](#)

[4.3. Facteurs impliqués dans l'émergence de la résistance](#)

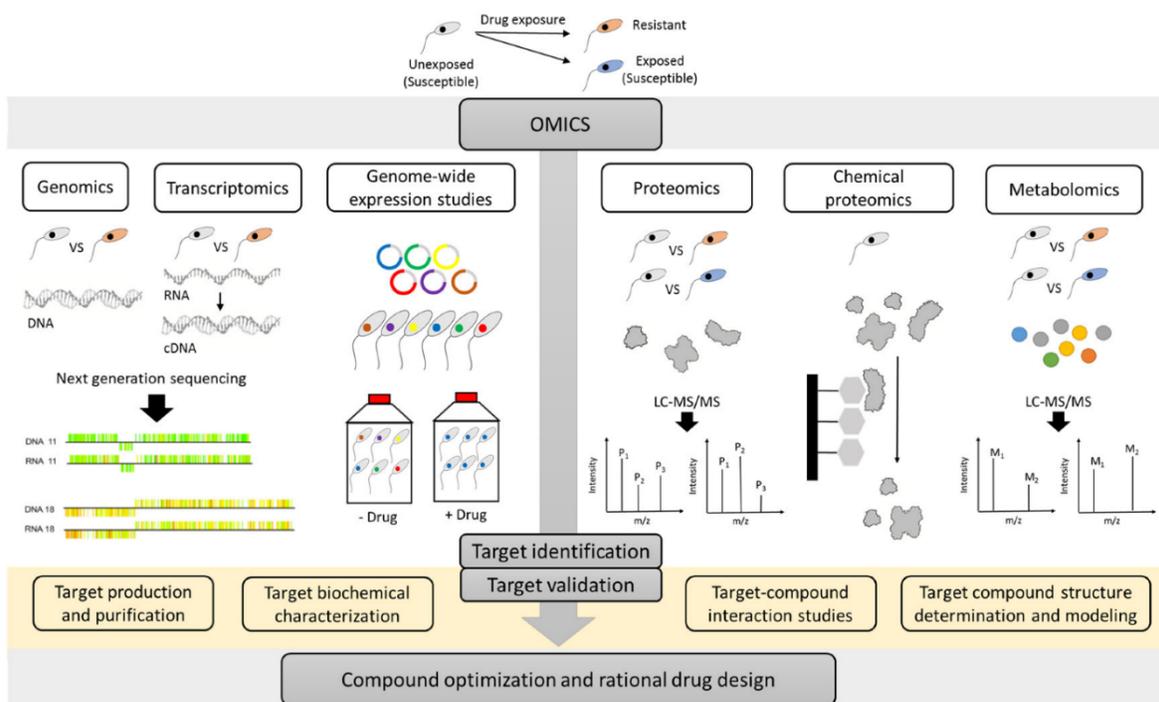
[4.4. Principaux mécanismes de résistance aux médicaments](#)

## Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez *Leishmania*

*La résistance aux médicaments peut être définie par la capacité des organismes à s'opposer aux effets induits par un médicament, habituellement efficace contre eux. En cas de résistance, il y a une diminution significative de la sensibilité de la population (en raison d'une sélection biologique de ces derniers), et les souches résistantes sont génétiquement différentes de la souche sauvage (revu par [480])*

### 4.1. Les approches « -omiques » utilisées dans l'étude de la résistance

La résistance aux médicaments est un ensemble de mécanismes complexes. Même si certaines méthodes d'études répandues depuis longtemps ont permis l'identification d'éléments impliqués dans la résistance, c'est surtout grâce à l'avancée des nouvelles technologies que de nombreuses découvertes ont été réalisées. Au cours de ces dernières années, de nouvelles stratégies dites « -omiques » ont vu le jour et peuvent être utilisées pour l'étude de la résistance aux médicaments (Figure 8). Parmi elles, se trouvent la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique [481], et revu par [482].



**Figure 8.** Stratégies omiques utilisées dans l'étude de la résistance aux médicaments [482]

L'utilisation de diverses approches -omiques peut permettre l'identification de cibles médicamenteuses et ainsi servir de point de départ dans le développement de nouveaux traitements visant à lutter contre la résistance aux médicaments. Abréviations : M, métabolite ; P, protéine.

### 4.1.1. Génomique

À l'ère de la génomique, les analyses se limitent surtout aux gènes soupçonnés d'être impliqués dans la résistance [483], en particulier dans des études comparatives entre une lignée cellulaire résistante et son type sauvage parent. Dans l'analyse de cibles génétiques spécifiques, la majorité des tests effectués reposent sur l'utilisation des PCR et le clonage fonctionnel. L'évaluation de l'expression de gènes cibles par PCR quantitative en temps réel (qPCR) a par exemple permis d'identifier des gènes marqueurs candidats impliqués dans la résistance au Sb [484]. Le clonage fonctionnel a, quant à lui, permis de découvrir l'existence d'un gène clé responsable de la résistance à la MF : le transport de la miltefosine (LdMT) [264].

Plus largement, l'avancée des nouvelles technologies a permis l'implantation d'une approche non ciblée, notamment grâce au développement des technologies du séquençage à haut débit (« HTS », pour « *High Throughput Sequencing* »). Comme l'ont montré plusieurs études, la résistance aux médicaments chez *Leishmania* peut être multifactorielle [464, 485], faisant de l'approche non ciblée une stratégie d'étude judicieuse. Étant donné que l'amplification génique est un phénomène majoritairement retrouvé dans la résistance aux médicaments [486], la possibilité de pouvoir détecter des CNV dans l'ensemble du génome est un atout considérable. Ainsi, le séquençage du génome entier (« WGS », pour « *Whole Genome Sequencing* ») a révolutionné l'analyse génomique, en particulier car il présente l'avantage de pouvoir détecter simultanément des CNVs, des mutations et des changements de ploïdie [483] ; de précieuses informations dans l'étude la résistance aux médicaments. Dans le même contexte, la technologie Cos-Seq, l'hybridation génomique comparative et le profilage de l'expression génique basée sur les puces à ADN, sont d'autres techniques qui ont apporté de nouvelles connaissances sur les mécanismes de résistance aux médicaments, tels que le Sb, la MF et l'AmB [483, 487, 488].

### 4.1.2. Transcriptomique

Chez les Kinetoplastidae tels que *Leishmania*, la comparaison du transcriptome de parasites résistants et sensibles est une autre stratégie utilisée, revu par [482]. D'ordre général, la mesure des niveaux d'ARNs est un bon moyen d'obtenir un large éventail d'informations. Cependant, la complexité génomique de *Leishmania*, en particulier sa régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes [285], n'amène pas forcément à privilégier en premier lieu son étude transcriptomique. En effet, le contrôle post-transcriptionnel entraîne souvent une faible corrélation entre les ARNm et l'abondance des protéines, ce qui peut être vu



## Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez *Leishmania*

comme un inconvénient non négligeable de cette approche [489]. Toutefois, ces dernières années, les technologies d'études ont grandement évolué et ont ainsi apporté de nouvelles connaissances. Par exemple, la technologie RNA-Seq permet l'obtention d'informations précises sur la transcription de gènes exprimés à de très faibles niveaux, ou au contraire, à des niveaux très élevés. Ainsi, grâce à la technologie RNA-Seq, des altérations au niveau transcriptomique ont été observées chez des souches de *Leishmania* résistantes aux médicaments [490]. Toutefois, il est difficile d'élucider avec précision la base génétique de la résistance uniquement par l'interprétation de caractéristiques génomiques et transcriptomiques. Pour cette raison, de plus en plus d'études sur la résistance s'intéressent à *Leishmania* à des niveaux post-génomiques (notamment par des études protéomiques et/ou métabolomiques) [491, 492].

### 4.1.3. Protéomique

Comme décrit précédemment, la régulation chez *Leishmania* se déroule majoritairement au niveau post-transcriptionnel [285]. Par conséquent, la protéomique contribue fortement à l'enrichissement des connaissances, notamment sur les différences entre les parasites sensibles et résistants aux médicaments. Plus précisément, l'abondance et l'expression des protéines peuvent apporter des informations clés sur l'implication des fonctions biologiques dans la résistance du parasite. Bien que peu précises (données qualitatives et non quantitatives), les électrophorèses bidimensionnelles (gel 2D) ont tout de même permis d'identifier des protéines régulées à la hausse et potentiellement impliquées dans la résistance (revu par [491]). Cependant, dans cette méthode, les protéines moins abondantes peuvent être masquées ou non détectées, limitant la précision des résultats obtenus.

Ces dernières années, l'amélioration des techniques d'analyses protéiques (notamment le développement des méthodes sans gel) a permis d'obtenir d'avantage de précisions sur les résultats obtenus. Grâce à ces avancées, de nombreuses protéines de *Leishmania* ont été identifiées et caractérisées. Actuellement, les méthodes utilisant la spectrométrie de masse pour la protéomique quantitative ont un rôle primordial dans l'étude des mécanismes de résistance aux médicaments [493]. De plus, les bases de données en ligne, accessibles à tous (telles qu'[UniProt](#) ou [TriTrypDB](#)), ont facilité la récolte et le regroupement de l'information. Toutefois, étant donné la complexité du protozoaire, un certain nombre de protéines restent encore sans fonction connue. Ceci souligne la nécessité de poursuivre les recherches, mais oriente également l'intérêt vers l'étude des données métabolomiques.



#### 4.1.4. Métabolomique

La compréhension de la biologie des agents pathogènes (notamment les adaptations clés permettant la résistance aux médicaments) est devenue l'objectif de nombreuses d'études post-génomiques. L'avancée majeur des technologies (telles que les plateformes de chromatographie en phase liquide et de spectrométrie de masse) a permis l'obtention de données métabolomiques (revu par [494]), dont l'intérêt dans l'étude de la résistance aux médicaments semble tout autant important. Le métabolome est d'ailleurs considéré comme la représentation la plus proche du phénotype du pathogène, dans le sens où il illustre les produits finaux de l'expression des gènes [483]. Dans le contexte de la résistance aux médicaments, l'analyse des métabolites semble une stratégie d'étude judicieuse, en particulier car les processus métaboliques font majoritairement partie des cibles médicamenteuses (comme l'ergostérol (AmB), le métabolisme des phospholipides (MF), et le dihydrofolate réductase (MTX)) (revu par [495]). La métabolomique étant un domaine émergent, peu d'études ont été menées à ce jour. Toutefois, les résultats obtenus ont d'ores et déjà soutenu l'importance de cette discipline en complétant les connaissances génomiques et protéomiques actuelles. Par exemple, de récents changements de métabolomique ont été observés chez *Leishmania* résistant à la PMM [496] et des biomarqueurs potentiels de métabolites ont été identifiés chez des parasites résistants au Sb [497].

#### 4.2. Un processus automatisé pour l'étude de la résistance ?

Contrairement à la tuberculose, au VIH et au paludisme, les MTNs telles que la leishmaniose reçoivent un financement de recherche relativement moindre pour la prévention et le contrôle de la maladie [498]. Toutefois, la mise en place d'objectifs de développement durable (ODD) a permis aux MTNs d'être mieux considérées dans la recherche [499-501]. Pour la leishmaniose, une étude récente a effectué une analyse bibliométrique des publications scientifiques portant sur la maladie et publiées au cours de ces dernières années [502]. Dans les 19 premières années du 21<sup>ème</sup> siècle, un total de 19 317 publications scientifiques ont été identifiées [502]. Au fil du temps, l'augmentation du nombre d'informations scientifiques produites a soulevé la nécessité de mettre en place des systèmes numériques de stockage et de gestion des données [503]. Pour répondre à ces besoins, des bases de données sur *Leishmania* (de manière exclusive ou non) ont été développées, telles que [Leish-Exp](#) (« *Leishmania Exclusive Protein database* »), [LeishPathNet database](#) (images cliniques et pré-cliniques), [LeishDB](#) (annotations de gènes codants et d'ARNs non codants chez *L. braziliensis*) [504], [LeishCyc](#) (voies biochimiques de *L. major*) [505], [Leishmania in the Americas DB](#)

## Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez *Leishmania*

(points géo-référencés d'occurrence d'espèces de *Leishmania* en Amérique [506], [LeishGEdit](#) (« *Leishmania Genome Editing* ») [507, 508], [TriTrypDB](#) (base de données sur les Kinetoplastidés) [509].

Récemment, une méthodologie d'extraction automatique des relations gènes-résistance aux antibiotiques à partir de bases de données a été développée pour lutter contre la résistance bactérienne [510]. Globalement, malgré quelques lacunes, ce processus a montré un grand potentiel dans l'identification rapide de gènes de résistance connus, nouvellement rapportés ou potentiels. Malheureusement, chez *Leishmania*, bien que les bases de données disponibles offrent un large éventail de ressources, jusqu'à présent aucune d'entre elles n'est spécialisée dans la résistance aux médicaments du parasite. Par conséquent, le manque de centralisation de ce type de données rendrait probablement difficile l'application actuelle d'un processus d'extraction automatique des relations gènes-résistance aux médicaments chez le protozoaire, tels que celui développé dans le cas de la résistance bactérienne. Étant donné l'ampleur de l'impact de la résistance aux médicaments chez *Leishmania*, il serait donc intéressant et pertinent de pouvoir développer un tel système. Finalement, avec une vision plus large, un processus d'extraction automatique spécialisé sur la recherche des gènes de résistance et adapté à chaque type de pathogène/maladie serait probablement un atout majeur dans la lutte mondiale contre la résistance aux médicaments.

### 4.3. Facteurs impliqués dans l'émergence de la résistance

#### 4.3.1. Facteurs propres à la biologie de *Leishmania*

Comme présenté précédemment, la résistance aux médicaments est un ensemble de mécanismes complexes, dont la compréhension nécessite l'utilisation de multiples stratégies d'études dites -omiques. Bien qu'il soit difficile d'identifier des marqueurs précis de la résistance aux médicaments, grâce aux études -omiques, des éléments clés de la biologie de *Leishmania* ont été identifiés, à différents niveaux d'études. Quelques facteurs propres à la biologie de *Leishmania* et impliqués dans la résistance aux médicaments du parasite, sont présentés ci-dessous.

##### 4.3.1.1. Les amplicons extrachromosomiques

Comme décrit dans le [chapitre 2, section 2.3.3.2.](#), *Leishmania* détient une incroyable plasticité génomique, illustrée par différents phénomènes, tels que des amplifications géniques fréquentes et stochastiques [258]. La grande majorité de ces amplifications sont extrachromosomiques et apparaissent sous la forme

## Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez *Leishmania*

d'**amplicons circulaires ou linéaires**. Dans des situations de stress environnemental (telles que la pression médicamenteuse), ils confèrent une meilleure survie au protozoaire, et constituent l'un des principaux éléments clés impliqués dans la résistance du parasite (revu par [486]). A titre d'exemple, les amplicons sont bien caractérisés dans la résistance au méthotrexate antifolate (MTX) et à l'antimoine (Sb). Le MTX a d'ailleurs été l'un des premiers médicaments qui a permis d'identifier ces amplicons [511, 512].

### 4.3.1.2. Les mutations génétiques

Outre les amplifications géniques, des études ont rapportés l'implication des **mutations génétiques** dans la résistance aux médicaments de *Leishmania*. Celles-ci varient selon le gène concerné, tout comme le mécanisme de résistance succédant la mutation. Les observations succédant les mutations génétiques étaient notamment l'augmentation de la traduction de protéines intracellulaires clés de la biologie du parasite [513], la perte de l'ergostérol [514], ou la diminution de l'entrée du médicament ([265], revu par [357]).

### 4.3.1.3. Les transporteurs ABC

La résistance aux médicaments chez *Leishmania* est souvent engendrée par une diminution de l'accumulation intracellulaire de ceux-ci, grâce à des **transporteurs ABC** (ou « **protéines d'efflux** ») qui pompent les médicaments hors de la cellule avant qu'ils ne puissent atteindre leur site d'action (revu par [515]). Chez le parasite, la première identification d'un transporteur ABC était d'ailleurs directement associée à la résistance aux médicaments [516], ce qui a rapidement permis de comprendre que ces protéines détiennent des rôles similaires à ceux observés chez d'autres protozoaires [517], et chez les cellules cancéreuses [518]. De plus, bien que ces transporteurs fassent partie d'une famille très diversifiée (plusieurs sous-familles hautement conservées [519]), toutes les fonctions décrites à ce jour sont majoritairement associées à la résistance [516, 520-522]. Ainsi, même si cette famille de gènes ne représente que 0,5% du génome de *Leishmania*, elle est d'une grande importance. Quelques exemples de protéines ABC impliquées dans la résistance aux médicaments chez *Leishmania* sont disponibles en [Annexe 6](#).

### 4.3.1.4. Autres molécules intracellulaires clés de la biologie de *Leishmania*

De nombreuses études ont montré que certaines **molécules intracellulaires** pouvaient jouer un rôle clé dans la résistance aux médicaments du parasite. Les transporteurs ABC, décrits ci-dessus, sont un exemple clé, mais ils ne constituent pas les seuls éléments impliqués. En effet, d'autres protéines ont été rapportées,



## Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez *Leishmania*

notamment des protéines kinase des protéines de choc thermique [523, 524] et des protéines ribosomiques [525, 526]. Par ailleurs, les rôles de certains acides aminés et d'enzymes ont aussi été décrit (revu par [484, 527]). Il s'agissait par exemple d'enzymes réductases (revu par [528]), d'enzymes de la glycolyse [464], d'enzymes du cycle glutathion-ascorbate [458], et bien d'autres encore. Finalement, les thiols intracellulaires peuvent aussi être impliqués dans la résistance aux médicaments, tels que l'antimoine [529-531].

### 4.3.2. Facteurs liés au médicament

L'un des facteurs participant à l'émergence de la résistance est la **demi-vie** du médicament, car elle détermine, entre autres, la pression sélective médicamenteuse sur les parasites. Des études ont rapporté que les médicaments possédant une longue demi-vie exercent généralement une forte sélection pour la résistance, et inversement [532, 533]. Cependant, malgré la courte demi-vie de l'antimoine (SSG), de nombreuses souches de *Leishmania* résistantes ont émergé très rapidement [534]. Dans le même ordre d'idée, lors de la commercialisation de la MF, les scientifiques suspectaient une émergence rapide de la résistance, notamment dû à la longue demi-vie du médicament (environ 7 jours), mais peu de cas ont été rapportés. Une fois de plus, ces informations soulignent la difficulté à cibler des facteurs précis et constants de la résistance aux médicaments chez *Leishmania*. Un autre facteur clé de l'émergence de la résistance consiste en une **mauvaise qualité** du médicament. On entend par qualité, aussi bien des caractéristiques propres au médicament (pouvant par exemple réduire la concentration du composé actif et donc l'efficacité du traitement), qu'un dosage inadéquat. Un bon exemple est un dosage trop élevé qui augmente la pression médicamenteuse et favorise la sélection rapide des parasites résistants. Finalement, il faut aussi porter une attention particulière au **mécanisme d'action** du médicament. Par exemple, les stress oxydatif et nitrosatif sont connus pour constituer des réponses au stress des cellules hôtes, envers lesquelles les pathogènes intracellulaires ont développé différents mécanismes de défense (revu par [535]). Par conséquent, un médicament qui cible les mécanismes de défense généraux des pathogènes tels que les voies de ces deux stress, pourraient indirectement favoriser l'émergence de la résistance, étant donné la préexistence de voies de mécanismes de défense à ces niveaux (revu par [535]).

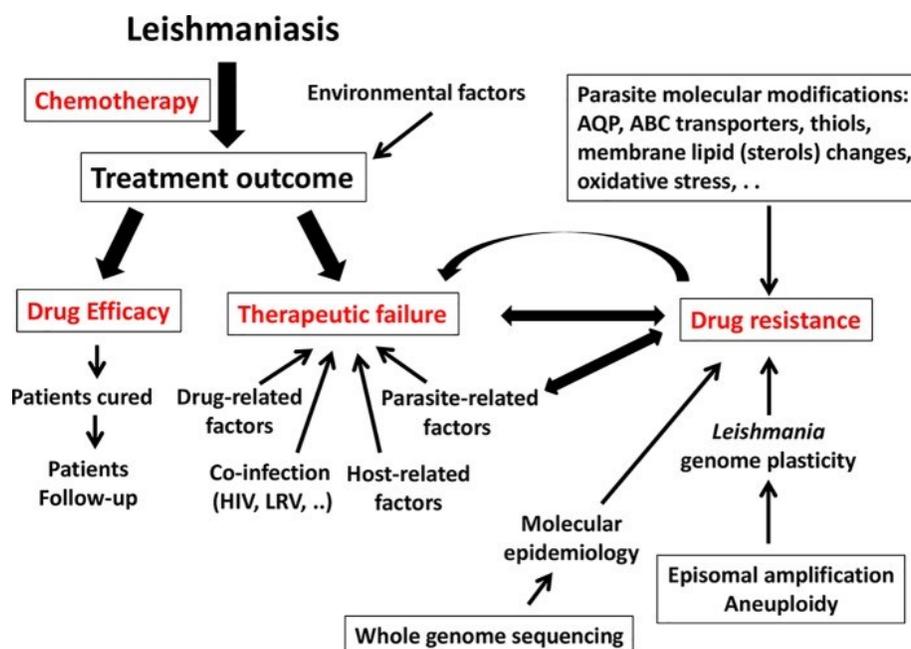
### 4.3.3. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux sont souvent moins rapidement assimilés à l'émergence de la résistance aux médicaments. Toutefois, ces facteurs peuvent y être impliqués, notamment par leur action sur la transmission

## Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez *Leishmania*

de la maladie. En effet, dans les zones géographiques endémiques où la **transmission** de la maladie est majoritairement **locale**, les patients atteints présentent généralement un faible degré de recombinaison génétique (dû aux infections clonales), ce qui favorise l'émergence et le maintien des populations de parasites résistants | revu par [535]. Par ailleurs, certaines zones géographiques pauvres et fortement industrialisées sont victimes de la **pollution environnementale** et n'ont accès qu'à des médicaments limités et souvent toxiques. Pour la leishmaniose, un exemple qui illustre parfaitement ce phénomène est celui décrit dans la [section 4.4.1.](#), sur l'État du Bihar (Inde). Finalement, la pollution de l'environnement par le Sb lui-même a aussi été rapportée. Par conséquent, dans les régions géographiques où la pression médicamenteuse était absente ou très faible, à la suite de cette pollution (qui a donc (re)créé une pression médicamenteuse), les souches de *L. infantum* isolées de chiens malades ont révélé une sensibilité réduite au SSG (revu par [536]). De même, cette pollution environnementale a été supposée au Pérou, notamment à la suite des nombreux cas de résistance au SSG, malgré la présence d'un réservoir animal non traité [537].

### 4.3.4. « Émergence de la résistance » versus « échec thérapeutique »



**Figure 9.** Distinction entre « résistance aux médicaments » et « échec thérapeutique » [538]

(HIV) virus de l'immunodéficience humaine ; (LRV) virus à ARN de *Leishmania* ; (AQP) aquaporine ; (ABC transporters) transporteurs de cassette à liaison à l'ATP.

## Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez *Leishmania*

Une notion importante à ne pas négliger, est qu'un **échec thérapeutique** ne correspond pas forcément à l'émergence de parasites résistants (Figure 9). Ces deux phénomènes peuvent être liés, mais la relation n'est pas obligatoire. Dans le cas de la leishmaniose, tout comme pour l'émergence de la résistance, les facteurs connus pouvant être impliqués dans l'échec thérapeutique peuvent être liés au pathogène, aux médicaments et/ou à l'environnement. À ces éléments s'ajoutent d'autres facteurs, tels que ceux liés à l'hôte mammifère.

Les **facteurs parasitaires** comprennent notamment la virulence inhérente de l'isolat infectant de *Leishmania* [535], et dans certaines situations, la présence des virus à ARN au sein de l'infection parasitaire [539, 540]. Ces virus à ARN de *Leishmania* (« LRV », pour « *Leishmania RNA Virus* ») appartiennent à la famille des *Totiviridae* ([541] et revu par [542]) et ont été identifiés chez *L. guyanensis* et *L. braziliensis* (on parle du LRV1), ainsi que chez *L. major* (on parle du LRV2) (revu par [543]). En comparaison avec des souches de *Leishmania* sans virus, celles hébergeant les LRVs modulent les réponses immunitaires de l'hôte, sont associées à une forme grave de la maladie et peuvent être à l'origine d'un échec thérapeutique (revu par [544]). Ce dernier peut aussi survenir selon la souche de *Leishmania* responsable de l'infection. Bien que les raisons exactes n'aient pas encore été toutes clairement définies, des travaux ont montré que pour des cas cliniques similaires avec un traitement précis, une relation pouvait être établit entre la réussite/l'échec du traitement et l'espèce/la souche de *Leishmania* responsable de l'infection (revu par [544]).

Des **facteurs liés au médicament lui-même et/ou à l'environnement** peuvent aussi être impliqués. Ceux-ci rejoignent ceux décrits dans la [section 4.3.2.](#) et la [section 4.3.3.](#), et correspondent à un sous-dosage du médicament [545], à l'administration d'un produit de mauvaise qualité [546], ou à un environnement non idéal [547]. Dans ce dernier cas, un stockage à long terme dans des conditions de chaleur inappropriées peut par exemple entrainer l'expiration de l'activité du médicament et un échec thérapeutique [547].

Finalement, des **facteurs liés à l'hôte mammifère** peuvent également influencer la réussite du traitement, en particulier le caractère immunodéprimé de certains patients, qui rend difficile leur guérison [548]. Bien que celui-ci corresponde principalement à des patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (et donc souffrant d'une co-infection leishmaniose-VIH), des immunosuppressions non liées au VIH et relevant du domaine de la médecine de transplantation, de la rhumatologie, de l'hématologie ou de l'oncologie, ont également été signalées (revu par [549]). Une variation naturelle moins extrême de la réponse immunitaire de l'hôte peut aussi moduler la capacité d'un médicament à agir, ainsi que son efficacité, mais peu de données sont actuellement disponibles à ce sujet (revu par [538]).



## 4.4. Principaux mécanismes de résistance aux médicaments

### 4.4.1. Résistance à l'antimoine (Sb)

Dans l'État du Bihar (Inde), l'eau est polluée par des métaux lourds, tels que l'arsenic (As<sup>III</sup>), et il s'avère que les Sb<sup>V</sup> sont des métalloïdes structurellement et chimiquement similaires au As<sup>III</sup>. Par conséquent, une étude a montré que l'émergence de parasites résistants au Sb<sup>V</sup> dans l'État du Bihar pouvait notamment être expliquée par l'exposition chronique de *Leishmania* à de faibles doses d'As<sup>III</sup> issues des eaux polluées [550]. Ce phénomène de résistance à l'As<sup>III</sup> avait d'ailleurs déjà été montré *in vitro* chez *L. tarentolae*, au début des années 1990 [551]. Depuis l'émergence de la résistance aux dérivés de Sb, de nombreux travaux tentent de mieux comprendre les mécanismes mis en place par *Leishmania* pour résister. Malgré la complexité de ce phénomène, diverses études ont pu démontrer que la résistance au Sb implique plusieurs facteurs (résistance multifactorielle), tels que la réduction de l'entrée du médicament dans le parasite, l'efflux du médicament, l'inhibition de l'activation du médicament, et la séquestration du médicament (revu par [357, 528]).

#### 4.4.1.1. AQP1 | Diminution de l'entrée du médicament

La régulation négative des protéines membranaires, telles que l'**aquaglycéroporine 1 (AQP1)**, permet la résistance au Sb, en diminuant l'entrée du médicament dans le parasite [417, 552]. Chez les parasites résistants, des altérations génomiques ont été identifiées dans la région subtélomérique du **chromosome 31** (chromosome contenant le gène de la protéine AQP1) [553].

#### 4.4.1.2. *mrpA* | Séquestration et efflux du médicament

Même si l'entrée du médicament peut être diminuée par *Leishmania* grâce à la régulation négative d'AQP1, celle-ci n'est pas totalement abolie. De plus, comme présenté dans le [chapitre 3, section 3.2.3.1.1.](#), l'antimoine peut aussi pénétrer dans le parasite sous la forme inactive (Sb<sup>V</sup>) ; AQP1 ne permettant que l'entrée du Sb<sup>III</sup> [417, 418]. De nombreux travaux montrent que la plasticité du génome de *Leishmania* contribue de façon remarquable à la résistance au Sb, et que le parasite développe de multiples stratégies pour survivre. L'utilisation du séquençage à haut débit a permis d'identifier des processus clés, tels que la modulation de l'expression de gènes, l'aneuploïdie, les amplifications extrachromosomiques, et les polymorphismes de nucléotides simples (revu par [554]). Ceci explique également pourquoi il est difficile

## Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez *Leishmania*

d'identifier un marqueur moléculaire précis et conservé dans le contexte de la résistance au Sb. Toutefois, un mécanisme connu et considéré comme un marqueur clé conservé de la résistance au Sb est la formation d'amplifications extrachromosomiques (aussi nommées « amplicons circulaires ») contenant le **gène *mrpA***, et présent sur le **locus H du chromosome 23** des parasites résistants au Sb<sup>III</sup> [256, 555]. Ce gène code pour la **protéine MRPA** (un transporteur ABC (« *ATP-binding cassette* ») qui séquestre le Sb (conjugué métal-thiol) dans des vésicules intracellulaires (situées près de la poche flagellaire du parasite), qui sont ensuite exocytées [521, 556]. Cette poche (située à la base du flagelle) est considérée depuis longtemps comme le seul site d'endocytose et d'exocytose chez les *Kinetoplastidae* (revu par [557, 558]). Toutefois, nous avons récemment montré que la résistance au Sb peut être indépendante du gène *mrpA*, et impliquer d'autres gènes (*sat* et *ABCC2*) [559]. Par ailleurs, d'autres transporteurs ABC (*ABCC4*, *ABCC5*, *MRP1*) peuvent aussi influencer la résistance aux antimoniés, en favorisant l'efflux du médicament [560, 561].

### 4.4.1.3. Inhibition de l'activation du médicament

Récemment, il a été proposé que l'**activation du médicament** puisse être **bloquée** (par exemple par une régulation négative d'enzymes réductases spécifiques), ce qui empêcherait la réduction du Sb<sup>V</sup> en Sb<sup>III</sup> et constituerait donc un mécanisme de résistance (revu par [528]).

### 4.4.1.4. Niveau élevé de thiols intracellulaires et protection contre les ROS

Des travaux ont montré que des niveaux élevés de thiols intracellulaires sont impliqués dans la résistance au Sb, *in vitro* et en clinique [529-531]. Comme présenté précédemment, les thiols favorisent la résistance en formant des conjugués avec le Sb<sup>III</sup> pour l'efflux et/ou la séquestration du médicament ([section 4.4.1.2.](#)). D'autre part, des niveaux élevés de thiols protègent les parasites du stress oxydatif médié par le Sb. Chez *Leishmania*, bien que le principal thiol intracellulaire soit le **trypanothione**, chez *L. donovani*, des niveaux significatifs d'**ovothiol** ont été observés [562]. De plus, des travaux ont montré une protection accrue contre les ROS chez les parasites résistants au Sb, notamment grâce à la modulation positive de l'environnement redox intracellulaire thiol-dépendant. Ainsi, l'augmentation du métabolisme d'acides aminés (l'arginine, la cystéine) et de la synthèse d'enzymes (la cystéine synthase, la cystathionine  $\beta$  synthase, la mercaptopyruvate sulfurtransférase, l'ornithine décarboxylase, la spermidine synthase, la trypanothione réductase ou synthétase, la peroxydoxine, la peroxydase ascorbate-dépendante, la glutarédoxine, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), la tryparédoxine et la tryparédoxine peroxydase) a été notée (revu par [484, 527]).

## Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez *Leishmania*

### 4.4.1.5. Modulation des niveaux intracellulaires de NAD<sup>+</sup>

Récemment, des travaux ont montré la relation entre l'**homéostasie du NAD<sup>+</sup>** et la résistance au Sb<sup>III</sup>. Le métabolisme du NAD<sup>+</sup> serait étroitement lié à celui des thiols, et par conséquent, les niveaux intracellulaires de NAD<sup>+</sup> pourraient moduler la sensibilité des parasites au Sb<sup>III</sup> [563].

### 4.4.1.6. Modulation de la régulation des protéines intracellulaires

Des études ont montré que des **protéines intracellulaires** modulent la sensibilité de *Leishmania* au Sb, telles que la protéine kinase MAPK1 spécifique à la sérine/thréonine (régulées à la baisse) [564, 565], les protéines de choc thermique Hsp23, Hsp70 et Hsp83 (régulées à la hausse) [523, 524], la petite protéine liée à la calpaïne kinétoplastidienne (régulée à la baisse) [524], et des protéines ribosomiques L28 60S et L23a [525, 526]. D'autres protéines identifiées avaient des fonctions encore inconnues, telles que P299, ARM56 et ARM58 [523, 566, 567]. Par ailleurs, des travaux ont montré que les gènes codant pour l'histone 1 (H1), l'histone 2A (H2A) et l'histone 4 (H4), avaient une expression significativement plus élevée chez les parasites résistants au Sb, et que la surexpression d'H2A permet également la résistance à la MF et à l'AmB [487].

### 4.4.1.7. Mutations génétiques dans le gène codant pour la protéine CDPK1

Des **mutations** dans le gène codant pour la protéine kinase dépendante au calcium 1 (« CDPK1 », pour « *Calcium Dependent Protein Kinase 1* ») conduiraient aussi à la résistance au Sb, en augmentant la traduction d'importantes protéines intracellulaires [513]. En complément, une **substitution** d'un acide aminé (mutation H451Y) dans le gène de la CDPK1 (dont le gène fait maintenant partie d'une nouvelle famille de gènes, nommée SCAMK [568]) permettrait aux parasites de survivre *in vitro* à de fortes concentrations de Sb<sup>III</sup> et de rapidement devenir résistants, sans modification génomique supplémentaire [563]. Ces travaux soulignent donc que la « tolérance » au Sb peut être le point de départ de l'acquisition de la résistance.

### 4.4.1.8. Modulation du cycle de vie

Chez les parasites résistants au Sb, une augmentation de la **métacyclogénèse** a été rapportée. Ces observations soulèvent de nouveau les risques d'une sélection d'agents pathogènes plus virulents due à l'utilisation massive des médicaments | [569].



## Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez *Leishmania*

### 4.4.1.9. Modulation de la composition des métabolites

De récents travaux ont identifié des biomarqueurs potentiels de métabolites chez des parasites résistants au Sb. Plus précisément, des différences dans la composition des **métabolites** ont été constatées entre les parasites sensibles et résistants, soulignant l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme de remodelage métabolique permettant de lutter contre le médicament | [497].

### 4.4.2. Résistance à la pentamidine (PTD)

La résistance à la PTD a été supposée en Inde, suite à une diminution de l'efficacité du médicament chez des patients traités [570]. Même si les mécanismes de résistance à la PTD ne sont pas encore bien compris, des études *in vitro* ont permis d'obtenir quelques suggestions.

#### 4.4.2.1. Faible accumulation du médicament

Un mécanisme de résistance à la PTD est la réduction du potentiel membranaire mitochondrial, engendrée par une diminution de l'activité enzymatique (notamment les déshydrogénases mitochondriales) [450]. Cette régulation négative **réduit l'accumulation du médicament** et favorise la survie du parasite [450, 571].

#### 4.4.2.2. Séquestration du médicament

Des travaux sur *L. major* ont montré que le transporteur ABC nommé **PRP1 (protéine de résistance à la pentamidine 1)** pouvait être associé à la résistance à la PTD [520]. Le transporteur PRP1 fait partie de la sous-famille des transporteurs ABCC (comprend aussi la protéine MRPA impliquée dans la résistance au Sb [521, 555] ([section 4.4.1.2.](#)) mais contrairement à MRPA, PRP1 est spécifique au genre *Leishmania* (aucun orthologue n'a été identifié dans le génome des parasites apparentés *Trypanosoma cruzi* et *Trypanosoma brucei* [519]). Ainsi, de même que MRPA, PRP1 transporte et séquestre la PTD dans des vésicules intracellulaires (localisées près de la poche flagellaire), qui sont ensuite exocytées hors du parasite [572].

#### 4.4.2.3. Changement dans la séquence d'ADNk

Il semblerait qu'une **modification dans la séquence d'ADNk** de *Leishmania* puisse conférer la résistance à la PTD. Toutefois, le mécanisme exact de ce phénomène reste encore inconnu [481].



### 4.4.3. Résistance à l'amphotéricine B (AmB)

Depuis plus de 70 ans, l'AmB est utilisée comme agent antifongique, et malgré cette longue période d'utilisation, la résistance a été relativement rare dans les infections fongiques (revu par [573]). Par conséquent, même si l'AmB est utilisée depuis les années 1960 pour lutter contre la leishmaniose, le risque de résistance a toujours été considéré comme étant faible (revu par [574]). Et effectivement, rares sont les rapports qui présentent des cas de résistance à l'AmB (revu par [538]). Cependant, étant donné que l'utilisation d'AmB comme dose unique a été préconisée pour les patients atteints de LV [391, 392] et que cette dose est très minime pour pouvoir traiter la maladie [393], le risque de résistance à l'AmB est bien présent. En effet, celui-ci réside notamment dans le fait que cette faible dose pourrait sélectionner des parasites à vulnérabilité réduite au médicament, favoriser la propagation de parasites tolérants, et par conséquent l'émergence de la résistance (revu par [538]). D'autre part, étant donné que l'AmB est utilisée à la fois en monothérapie et en thérapie combinée avec d'autres médicaments, le développement de traits adaptatifs à l'AmB chez *Leishmania* pourrait donc rendre inefficaces les stratégies de combinaisons à base d'AmB et favoriser le développement de mécanismes de résistance au second médicament utilisé ; les médicaments des thérapies combinés étant généralement administrés à des doses plus faibles qu'en monothérapie (revu par [538]). Plus généralement, même si la résistance à l'AmB est rare, des cas ont malgré tout été observés dans des infections fongiques [575] et chez des souches cliniques de patients atteints de LV en Inde [576]. Finalement, bien que les mécanismes de résistance ne soient pas encore bien connus, des études expérimentales en laboratoire ont permis d'en identifier certains.

#### 4.4.3.1. Diminution de la teneur et/ou perte de l'ergostérol

De même que dans la résistance à la MF, des études ont montré que des **changements dans la teneur en stérols** (notamment l'ergostérol et des stérols apparentés) étaient impliqués dans la résistance à l'AmB [576-578]. De plus, ces travaux ont montré que la **perte totale de l'ergostérol** était aussi possible chez les parasites résistants, empêchant ainsi toute liaison avec l'AmB. En complément, une étude récente a démontré qu'une mutation dans le gène de la 14 $\alpha$ -déméthylase (une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des stérols) pouvait notamment permettre la perte de l'ergostérol [514]. Dans ces souches résistantes, le principal stérol n'était donc plus l'ergostérol, mais un précurseur (le cholesta-5,7,24-trien-3-ol) [576, 577].



## Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez *Leishmania*

### 4.4.3.2. Défense oxydative

Un autre mécanisme impliqué dans la résistance à l'AmB (aussi observé dans la résistance à la MF) consiste en la mise en place d'une **défense oxydative** de la part de *Leishmania*, afin d'empêcher l'induction de l'apoptose. Ainsi, chez les promastigotes *L. major*, la surexpression du gène de l'ascorbate peroxydase (enzyme clé du cycle glutathion-ascorbate) a été identifiée comme mécanisme potentiel de défense oxydative et de résistance à l'AmB [458].

### 4.4.3.3. Efflux du médicament

L'étude d'isolats cliniques résistants à l'AmB a également permis de démontrer le rôle des transporteurs de la famille ABC dans la résistance du médicament. En effet, des niveaux élevés d'expression de MDR1 et une augmentation de l'**efflux du médicament** ont été détectés [576].

## 4.4.4. Résistance à la paromomycine (PMM)

Étant donné que la PMM n'est utilisée pour le traitement de la leishmaniose que depuis quelques années seulement, les études visant à comprendre les mécanismes de résistance aux aminoglycosides se sont principalement effectuées sur les maladies fongiques et bactériennes [579, 580]. Bien que les travaux sur la résistance à la PMM soient limités chez *Leishmania*, quelques mécanismes ont pu être identifiés *in vitro*.

### 4.4.4.1. Absorption réduite du médicament

Un des premiers mécanismes de résistance à la PMM identifié consiste en une **absorption réduite du médicament** chez les parasites résistants [460, 581, 582]. Le déroulement précis de ce mécanisme n'est pas encore élucidé mais il semble fortement impliquer des transporteurs ABC (supposément MDR1 et MRPA), qui comme décrit précédemment, sont déjà connus pour être impliqués dans la résistance au Sb [521, 555, 556] ([section 4.4.1.](#)) et à l'AmB [576] ([section 4.4.3.](#)).

### 4.4.4.2. Séquestration du médicament

Comme chez les parasites résistants au Sb, il semblerait que les souches résistantes à la PMM développent un mécanisme de **séquestration du médicament**. Divers phénomènes ont été observés, tels qu'une



## Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez *Leishmania*

régulation à la hausse d'enzymes et de protéines impliquées dans le trafic, la fusion et l'endocytose des vésicules, et un nombre plus élevé de vacuoles vésiculaires chez les souches résistantes à la PMM [464].

### 4.4.4.3. Augmentation de la glycolyse

Pour produire de l'énergie, *Leishmania* est connu pour utiliser principalement des enzymes des voies glycolytiques et des pentoses phosphates. Chez les souches résistantes à la PMM, des travaux ont constaté que plusieurs voies biologiques liées à la **glycolyse** étaient enrichies [464], probablement pour pallier le dysfonctionnement mitochondrial engendré par le médicament.

### 4.4.4.4. Défense contre l'apoptose

Des travaux ont montré que la régulation à la baisse de protéines clés (telles que la **prohibitine**) était une stratégie développée par le parasite pour résister à la PMM [464]. La prohibitine est connue pour jouer un rôle important dans les interactions hôte-parasite [583] et son homologue semble être impliqué dans l'apoptose [584]. Par conséquent, sa régulation négative chez les parasites résistants à la PMM semble être une stratégie de défense contre l'apoptose [464].

### 4.4.4.5. Régulation à la hausse de certaines protéines

Des études protéomiques ont permis de comprendre que la résistance à la PMM impliquerait de nombreuses protéines régulées à la hausse, dont les principales sont la **protéine 14-3-3** (facteur de virulence), des **protéines de choc thermique** (probablement en raison du stress causé par le médicament), ainsi que des protéines impliquées dans la **machinerie traductionnelle** de *Leishmania* [464]. De plus, des mutations des gènes des protéines impliquées dans la traduction [513] confirment la stratégie du parasite à vouloir empêcher l'inhibition de la synthèse des protéines engendrée par le médicament. Ces travaux ont notamment identifié la protéine CDPK1 comme un marqueur de résistance à la PMM (également impliquée dans la résistance au Sb, ([section 4.4.1.7.](#))).

## 4.4.5. Résistance à l'allopurinol (ALP)

La résistance à l'ALP n'a été démontrée que récemment chez *L. infantum* (isolé de chiens) [585], mais son



## Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez *Leishmania*

émergence est préoccupante car c'est actuellement le premier médicament utilisé pour le contrôle à long terme de la Lcan [586, 587]. Les séquençages du génome entier de souches cliniques et de laboratoire (sensibles et résistantes) ont permis d'identifier des changements génétiques associés à la résistance à l'ALP, dont le plus important était une réduction du nombre de copies du gène codant pour la **S-adénosylméthionine synthétase (METK)** [588]. La METK est une enzyme clé de la synthèse de la S-adénosylméthionine (AdoMet), une molécule importante impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires, telles que la *trans*-méthylation, la *trans*-sulfuration et la synthèse des polyamines [589, 590].

### 4.4.6. Résistance à la miltefosine (MF)

Malgré l'utilisation récente de la MF sur le terrain, des parasites résistants ont déjà été observés, notamment en Inde ; pays dans lequel la MF a d'ailleurs été approuvée en 2002 comme premier traitement oral pour la LV [376]. Dans ce pays, la MF est disponible en vente libre, ce qui a fort probablement entraîné une consommation abusive et non contrôlée du médicament et ainsi favorisé l'émergence de la résistance [364]. Pour mieux comprendre ce phénomène, l'induction de résistance *in vitro* a été réalisée. De plus, des isolats cliniques de souches résistantes à la MF ont pu être récupérés de patients, ce qui a permis d'obtenir leurs profils génomiques et moléculaires et de confirmer certaines caractéristiques observées sur les souches sélectionnées expérimentalement en laboratoire [591, 592]. Bien que la résistance à la MF ne soit pas encore bien connue, les études en laboratoire (sur les isolats cliniques et sur les souches sélectionnées expérimentalement) ont permis d'identifier quelques mécanismes.

#### 4.3.6.1. Faible accumulation du médicament

Moins d'accumulation du médicament dans le parasite est un phénomène constaté dans toutes les lignées de *Leishmania* résistantes à la MF. Cela est notamment possible suite à des **mutations dans le gène de la protéine de transport de la MF (LdMT)** et/ou de la Lros3 ([265], revu par [357]). Plus précisément, l'inactivation ou la sous-expression de LdMT peut être induite par différents mécanismes, tels que les SNPs, un décalage de cadre ou un codon stop, et la délétion d'un nucléotide (revu par [527]). D'autre part, la surexpression des transporteurs ABC (tels que MDR1 chez *L. tropica* [593]) diminue également l'accumulation intracellulaire de la MF, grâce à l'efflux du médicament à travers la membrane plasmique du parasite [522, 593].

## Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez *Leishmania*

### 4.4.6.2. Modifications lipidiques de la membrane plasmique

Un autre mécanisme de résistance implique des altérations de la **composition lipidique** de la membrane du parasite et de la **biosynthèse des stérols** [265, 594], telles que des changements dans l'insaturation des acides gras et une forte réduction du niveau d'ergostérol [265, 469].

### 4.4.6.3. Modulation de l'expression de certains gènes

Des travaux ont rapporté des **altérations de gènes** impliqués dans la traduction, le repliement des protéines, la réparation et la réplication de l'ADN, ou le métabolisme des thiols (revu par [357, 538]). A l'inverse, d'autres gènes, tels que le gène **SIR2, est régulé à la hausse** et semble favoriser la survie de *Leishmania* en empêchant sa mort par apoptose (qui est induite par la MF) [595]. Toutefois, étant donné que la régulation de l'expression génique chez *Leishmania* s'effectue au niveau post-transcriptionnel, il n'est pas certain que l'expression accrue du gène *SIR2* se traduise par des niveaux plus élevés de protéines. Ce point a d'ailleurs été soulevé par les auteurs qui recommandent justement des études complémentaires de protéomique et de métabolomique.

### 4.4.6.4. Défense oxydative

Des études ont montré que les parasites résistants à la MF peuvent développer des mécanismes pour résister aux **ROS** et au **stress oxydatif**. Ces adaptations sont notamment en lien avec la suppression de l'apoptose évoquée précédemment ; le stress oxydatif étant un facteur clé de l'induction de la mort cellulaire programmée | [595-597].

### 4.4.6.5. Augmentation des quantités de glucides et d'enzymes

Des travaux ont montré que l'augmentation des quantités de **glucides** et d'**enzymes** métabolisant les acides aminés semble être impliquée dans la résistance à la MF. Les éléments suivants ont été identifiés : la GDP-mannose pyrophosphorylase, l'aldolase de l'acide 2,4-dihydroxyhept-2-ène-1,7-dioïque, la pyrroline-5-carboxylate réductase et l'alcool déshydrogénase dépendante du NADP. | [598]



### 4.4.7. Résistance à la dompéridone (DPD)

Actuellement aucune résistance à la DPD n'a été rapportée. De plus, l'action immunostimulante de la DPD, sans activité directe connue contre le pathogène *Leishmania*, fait que le risque de résistance suite à son utilisation apparaît comme faible [599].

### 4.4.8. Résistance croisée

Parmi les adaptations mises en place par *Leishmania* pour assurer sa survie en présence de médicaments, certaines d'entre elles ont été identifiées comme pouvant permettre une résistance croisée entre plusieurs antiparasitaires. Quelques exemples sont présentés ci-après, dans le tableau 2.

Mécanismes	Résistance aux médicaments
Surexpression de PRP1	Résistance à la PTD chez <i>L. infantum</i> et au Sb <sup>III</sup> chez <i>L. major</i> [520]
Altération du transporteur LdMT	L'altération du transporteur LdMT chez les souches résistantes à l'AmB, permet la résistance croisée entre l'AmB et la MF [265]
Surexpression de l'histone 2A	Résistance au Sb, à la MF et l'AmB [487]
Surexpression de L23a	Résistance au Sb, à la MF et la PMM [526]
Mutations dans la protéine kinase dépendante au calcium 1 (CDPK1)	Résistance au Sb et la PMM [513]
Modulation positive de la métacyclogénèse	Résistance au Sb et à la MF [597]

**Tableau 2.** Exemple de mécanismes de résistance croisée chez *Leishmania*.

### 4.4.9. « L'évolution » dans la résistance aux médicaments

#### 4.4.9.1. Notion de « Fitness »

Selon la théorie de l'évolution, la « **fitness** » d'un hôte (aussi connue sous le terme « d'aptitude ») correspond à sa capacité à transmettre ses gènes aux générations suivantes, et par conséquent, le succès de reproduction et la survie sont deux composantes majeures de l'aptitude de l'hôte [600]. Chez les pathogènes, la fitness correspond à l'interaction complexe de différents facteurs qui permettent leur survie, leur reproduction et leur transmission entre hôtes dans un environnement donné [601] et revu par [602]. Plus précisément, chez *Leishmania* la fitness parasitaire est associée à la « **compétence** » et peut être définie comme la capacité du parasite à se multiplier dans son hôte et à y transmettre la maladie avec succès [603].

## Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez *Leishmania*

De plus, chez le parasite, la **virulence** est utilisée comme le principal marqueur de compétence, c'est-à-dire comme l'élément fondamental nécessaire à sa survie et à sa pathogénèse [604].

### 4.4.9.2. Notion de « Coût »

Dans le cas de la résistance aux médicaments, plusieurs études ont montré que son acquisition engendre généralement un « **coût** » qui affecte la fitness du pathogène et qui s'exprime en termes de croissance, de virulence ou de transmission réduite (revu par [483]). A titre d'exemple, le coût a été observé sous forme d'altérations de la réplication virale chez des virus résistants [605] et par une moindre capacité de croissance et de compétition inter-espèces chez des bactéries résistantes [606, 607]. Chez *Leishmania*, le coût est souvent associé à l'impact engendré lors de la mise en place de mécanismes de résistance/survie dans des conditions de stress [603]. Plus précisément, la sélection *in vitro* de parasites résistants au Sb a un impact sur la fitness du protozoaire en termes de prolifération et de différenciation [608] et une telle sélection sur une population de diverses souches peut être associée à un coût compétitif (compétition entre les souches) [609]. Plus généralement, la perte de fitness dépendrait notamment du patrimoine génétique du pathogène et des modifications génétiques conférant la résistance [547, 610]. Toutefois, dans certains cas, les pathogènes résistants génèrent des mutations dites « compensatoires », afin de rétablir (partiellement ou totalement) le coût engendré par la résistance [606, 607]. Ce phénomène a été décrit chez divers pathogènes, tels que *Escherichia coli* [611], *Schistosoma mansoni* [612], *Toxoplasma gondii* [613], *Plasmodium falciparum* [614], et bien d'autres encore. De même, chez *Leishmania*, le coût sur la compétence parasitaire n'est pas systématiquement observé [603] et revu par [483]. Des travaux ont en effet montré que des souches de *Leishmania* résistantes au Sb présentaient une meilleure fitness que les souches sauvages [615].

### 4.4.9.3. Transfert horizontal de gènes

À plus large échelle et en s'intéressant de nouveau à l'évolution, plusieurs études ont démontré que les réseaux métaboliques des cellules organiques présentent globalement un niveau élevé de conservation évolutive, des bactéries jusqu'aux eucaryotes. D'après Whitaker et *al.*, [616], cette conservation pourrait s'expliquer par l'existence de transferts de gènes endosymbiotiques (« EGT », pour « *Endosymbiotic Gene Transfers* ») et de **transferts de gènes horizontaux** (« HGT », pour « *Horizontal Gene Transfers* ») ayant un rôle clé dans la survie de l'organisme. Plus précisément, les HGTs sont un mécanisme grâce auquel un organisme acquiert du matériel génétique issu d'un autre organisme, sans en être le descendant. Chez les

## Chapitre 4. Résistance aux médicaments chez *Leishmania*

bactéries, la notion d'HGT entre deux espèces différentes a été décrite pour la première fois en 1959 [617], mais ces travaux sont longtemps restés dans l'ombre. Ce n'est qu'à partir des années 1980 que les HGTs ont été considérés comme un processus clé de l'évolution [618] et que leur étude a augmenté. Chez *Leishmania*, des chercheurs ont ainsi proposé une origine bactérienne de diverses enzymes ayant un rôle important dans l'adaptation métabolique du protozoaire et dont les gènes auraient été supposément acquis par des HGTs [112]. De plus, l'acquisition de ces enzymes permettrait au protozoaire d'avoir une meilleure résistance au stress oxydatif, et donc une meilleure pathogénicité. Toutefois, l'acquisition de ces gènes par HGTs serait également associée à un coût [616], comme présenté précédemment. Dans le contexte de la résistance aux médicaments, bien que le rôle potentiel des HGTs ait été proposé par plusieurs auteurs, l'information disponible à ce sujet reste limitée. Toutefois, grâce à des études récentes, le rôle clé des HGTs chez des bactéries résistantes a pu être démontré à plusieurs reprises [619-621]. Chez *Leishmania* (et plus largement, chez les parasites), il n'y a cependant à ce jour aucune preuve de l'implication des HGTs dans la résistance aux médicaments.





## Chapitre 5. Quels nouveaux traitements contre la résistance ?



[5.1. Cibles médicamenteuses](#)

[5.2. La « Pathogen Box »](#)

[5.3. Composés synthétiques](#)

[5.4. Composés d'origine végétale et plantes médicinales](#)

[5.5. Peptides antimicrobiens \(PAM\)](#)

[5.6. Traitements combinés](#)

[5.7. Repositionnement des médicaments](#)



## 5.1. Cibles médicamenteuses

Pour empêcher la résistance aux médicaments dans les futurs traitements, il est nécessaire d'identifier de nouvelles cibles médicamenteuses puissantes. Pour cette raison, il est important de connaître et de comprendre les voies biologiques et les substances organiques essentielles à la survie du parasite, telles que les voies biochimiques, les voies métaboliques ou les protéines et enzymes ayant un rôle crucial (revu par [622]). Afin de permettre l'inhibition sélective d'une potentielle cible médicamenteuse, il est également nécessaire de s'assurer que celle-ci soit inexistante ou suffisamment diversifiée chez l'hôte mammifère. Finalement, les principaux mécanismes de résistance constituent des connaissances fondamentales et indispensables afin d'assurer la validité de la cible choisie (notamment sa capacité à surmonter la résistance). Basés sur ces différentes conditions, plusieurs travaux ont ainsi permis d'identifier des cibles médicamenteuses prometteuses, à privilégier dans le développement des futurs traitements.

### 5.1.1. Importance des études *in silico*

L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques ayant une efficacité maximale et des effets secondaires minimes est un défi que beaucoup de scientifiques tentent d'accomplir. Ces recherches utilisent de nombreuses données, c'est pourquoi les méthodologies de conception de médicaments assistée par ordinateur (« CADD » pour « *Computer-Aided Drug Design* », aussi nommées méthodes « *in silico* ») y jouent un rôle important. Ces méthodes de calculs permettent notamment de réduire les risques d'erreur liés au facteur humain, de diminuer le temps de recherche, d'être plus rentable, de limiter l'utilisation de modèles animaux, de faciliter la conception et le repositionnement des médicaments, et de faciliter la prédiction et la validation de nouvelles cibles médicamenteuses [623-625]. Au cours de ces dernières années, plusieurs approches computationnelles de découvertes de médicaments ont ainsi été suggérées ([Annexe 7](#)). De plus, en Mars 2019, le sujet de recherche « *In silico Methods for Drug Design and Discovery* » a été lancé dans le journal « *Frontiers in Chemistry* », pour valoriser l'importance de cette nouvelle approche. Cela a d'ailleurs suscité l'intérêt de nombreux scientifiques et a permis la publication de travaux innovants (revu par [624]).

En ce qui concerne la leishmaniose, des travaux récents ont utilisé une approche *in silico* pour identifier des cibles médicamenteuses potentielles contre *L. donovani*. Les auteurs ont réalisé une simulation de la voie de récupération des purines du protozoaire et ont analysé les interactions protéine-protéine (« PPI », pour « *Protein-Protein Interactions* »). Cette méthode a ainsi permis de cibler des nœuds protéiques spécifiques,



## Chapitre 5. Quels nouveaux traitements contre la résistance ?

dont la destruction pourrait entraîner une perte de connexions et de fonctions biologiques cruciales à la survie du parasite [626]. Par ailleurs, l'analyse d'amarrage moléculaire a été bénéfique dans l'étude de la maladie et a permis d'identifier des alcaloïdes antiparasitaires ciblant des protéines spécifiques du parasite [627]. De même, l'utilisation du criblage virtuel basé sur les ligands et les structures chimiques a servi à identifier des composés multi-cibles potentiels pour le traitement contre *Leishmania* [628].

Plus généralement, les études *in silico* génèrent efficacement des données cruciales dans la compréhension des mécanismes biologiques complexes. Sans surprise, des chercheurs ont d'ailleurs montré que la connaissance approfondie des mécanismes des maladies, ainsi que l'identification de cibles/biomarqueurs clés contribuaient de manière significative au développement de nouveaux traitements thérapeutiques [629]. De plus, contrairement aux études expérimentales (*in vitro* et *in vivo*), les méthodes informatiques CADD offrent la possibilité de déterminer systématiquement toutes les interactions médicament-cibles possibles et donc de visualiser clairement les schémas pharmacologiques importants [630]. La combinaison d'approches omiques et de méthodes CADD semble donc avoir un avenir prometteur dans l'identification de cibles médicamenteuses pour les maladies infectieuses (tels que la leishmaniose, comme vu précédemment), mais également pour d'autres maladies telles que le VIH, le cancer [631] ou même la maladie d'Alzheimer [632].

### 5.1.2. Nouvelles cibles médicamenteuses chez *Leishmania*

#### 5.1.2.1. Les polyamines

**Rôle chez *Leishmania*** | Les polyamines sont cruciales pour la survie et la croissance du parasite. Ils jouent également un rôle clé dans la régulation de la peroxydation lipidique (dégradation des acides gras), causée par le système immunitaire et les traitements médicamenteux) [633, 634]. **Intérêt thérapeutique** | Au cours de l'infection chez l'hôte, des enzymes impliquées dans la biosynthèse des polyamines sont produites en grande quantité afin de palier à la réduction de l'absorption des polyamines [635, 636]. Plusieurs enzymes de cette voie sont uniques et ne se trouvent pas dans le système des mammifères. Ainsi, l'inhibition de ces enzymes (par exemple, la S-adénosyl méthionine décarboxylase (AdoMetDC) [637], la spermidine synthase [638] ou l'ornithine décarboxylase [639]) a été décrite comme pouvant entraîner la mort du parasite.

#### 5.1.2.2. La L-Asparaginase

**Rôle chez *Leishmania*** | Les voies métaboliques liées à l'asparagine ont un rôle important dans le maintien

## Chapitre 5. Quels nouveaux traitements contre la résistance ?

de l'homéostasie cellulaire du parasite [640]. **Intérêt thérapeutique** | L'inhibition de la L-Asparaginase favorise la mort du parasite [641].

### 5.1.2.3. L'ergostérol

**Rôle chez *Leishmania*** | L'ergostérol est un composant important du parasite *Leishmania* [642]. **Intérêt thérapeutique** | Des enzymes uniques impliquées dans la synthèse de l'ergostérol ont été identifiées, notamment la squalène synthase, l'époxyde de squalène et la 24,25-stérol méthyltransférase [467]. Leur inhibition s'est montrée efficace *in vitro* chez différentes espèces de *Leishmania*, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques tels que les acides zaragoziques, la terbinafine [643], le triazole SCH 56592 [644], les azastérols [645], les quinuclidines [646], et le tolnaftate [647]. La voie de synthèse de l'ergostérol étant différente de celle du cholestérol de l'homme, ces résultats sont prometteurs pour la recherche thérapeutique.

### 5.1.2.4. Les métacaspases

**Rôle chez *Leishmania*** | Elles médient la séparation chromosomique et la survie du parasite [648]. **Intérêt thérapeutique** | Ces molécules sont absentes chez les mammifères [648] et leur modulation et/ou perturbation peut favoriser la mort du parasite [648, 649].

### 5.1.2.5. DHFR et PTR1

**Rôle chez *Leishmania*** | DHFR et PTR1 sont impliquées dans la production de thymidine et dans le métabolisme des folates et des ptéridines [650, 651]. **Intérêt thérapeutique** | L'inhibition de la DHFR arrête la biosynthèse de la thymidine et par conséquent de l'ADN, ce qui entraîne la destruction du parasite (revu par [622]). De même, l'inhibition de l'expression du gène *PTR1* entraîne la mort du protozoaire [652, 653].

### 5.1.2.6. Les transporteurs ABC

**Rôle chez *Leishmania*** | Ils ont un rôle important chez le parasite et ils sont notamment impliqués dans la résistance aux médicaments (revu par [515]) ([Chapitre 4, section 4.3.1.3.](#)). **Intérêt thérapeutique** | L'inhibition et/ou la modulation de ces pompes à efflux ont été étudiées en laboratoire et ont montré des résultats prometteurs dans la lutte contre la résistance [654]. Par exemple, des antagonistes de la calmoduline, des bloqueurs de canaux calciques, des peptides hydrophobes, des flavonoïdes, ou encore des

## Chapitre 5. Quels nouveaux traitements contre la résistance ?

inhibiteurs de protéine kinase, constituent des inhibiteurs/modulateurs capables d'inverser la multirésistance aux médicaments dans les cellules de mammifères [655]. Toutefois, l'efficacité clinique de certains d'entre eux (notamment le vérapamil) est limitée par leur toxicité [656]. Ainsi, une autre alternative serait l'utilisation de certains excipients pharmaceutiques polymères, (tels que Tweens® ou Pluronic®), ou de polymères thiolés (thiomères) [657], qui sont également capables d'inhiber les pompes à efflux.

### 5.1.2.7. La Trypanothione Réductase (TR)

**Rôle chez *Leishmania*** | La TR participe à la synthèse du trypanothione, une importante molécule qui protège *Leishmania* contre le stress oxydatif [202, 203, 425]. **Intérêt thérapeutique** | Une mutation de la TR diminue l'infectiosité du parasite [658] et son inhibition favorise l'élimination du parasite (revu par [659]).

### 5.1.2.8. Les topoisomérases

**Rôle chez *Leishmania*** | Elles sont impliquées dans des processus biologiques indispensables à la survie du parasite [660]. **Intérêt thérapeutique** | Leur inhibition, favorise la mort du parasite [661].

## 5.2. La « Pathogen Box »

Pour favoriser la découverte de nouveaux traitements, l'initiative « *Drugs for Neglected Diseases* » met à disposition depuis quelques années la « [Pathogen Box](#) » (inspirée de la « [Malaria Box](#) », de l'initiative *Medicines for Malaria Venture* (MMV)). Cette boîte contient près de 400 molécules médicamenteuses connues et actives contre un ou plusieurs pathogènes de maladies négligées. Diverses études ont ainsi montré que certaines de ces molécules ont une excellente activité contre *Leishmania*, et par conséquent qu'elles pourraient être utilisées comme point de départ pour le développement de nouveaux traitements contre la leishmaniose [662-666]. Plus précisément, certains composés ont exercé un effet inhibiteur dose-dépendant significatif sur la prolifération du parasite (composés MMV676388, MMV690103, MMV022029, MMV022478 et MMV021013), ou induit la mort du protozoaire par apoptose (composés MMV676388 et MMV690103) [665]. Un autre composé (MMV688262) a quant à lui présenté un rôle potentiel pour la thérapie combinée, notamment en montrant un effet synergique avec l'AmB [664]. Finalement, le composé MMV676477 et ses dérivés sont capables d'affecter la division cellulaire de *Leishmania* et d'entraîner des changements dans sa morphologie, en favorisant la polymérisation de la tubuline [666]. Ainsi, étant donné

## Chapitre 5. Quels nouveaux traitements contre la résistance ?

qu'aucun médicament actuel ne favorise la polymérisation de la tubuline chez *Leishmania*, cette découverte pourrait constituer une nouvelle stratégie prometteuse dans le développement d'un futur médicament [666].

### 5.3. Composés synthétiques

#### 5.3.1. Inhibition de l'activité des transporteurs ABC

La résistance aux médicaments chez *Leishmania* implique fréquemment une réduction de l'accumulation intracellulaire de ceux-ci, et peut être engendrée par des transporteurs ABC ([chapitre 4, section 4.3.1.3.](#)). Dans ce contexte, des recherches sont menées sur des composés synthétiques afin d'explorer leur potentiel thérapeutique et leur capacité à surmonter la résistance. Ainsi, plusieurs composés synthétiques (la sitamaquine, le vérapamil, les antagonistes de la calmoduline, les dérivés de la phénothiazine, et les statines) ont efficacement inhibé l'activité de transporteurs ABC (revu par [667]). Plus précisément, la sitamaquine augmente l'accumulation intracellulaire de MF et surmonte la résistance médiée par LMDR1 [668]. La lovastatine inhibe la protéine de résistance multidrogues (« MRP1 » pour « *Multidrug resistance protein 1* ») et la glycoprotéine de perméabilité (P-gp), permettant l'accumulation du Sb dans le parasite, et par conséquent la réduction de la résistance [669]. De même, des flavonoïdes synthétiques surmontent la résistance à la PTD et au Sb, en augmentant la concentration intracellulaire des médicaments [670].

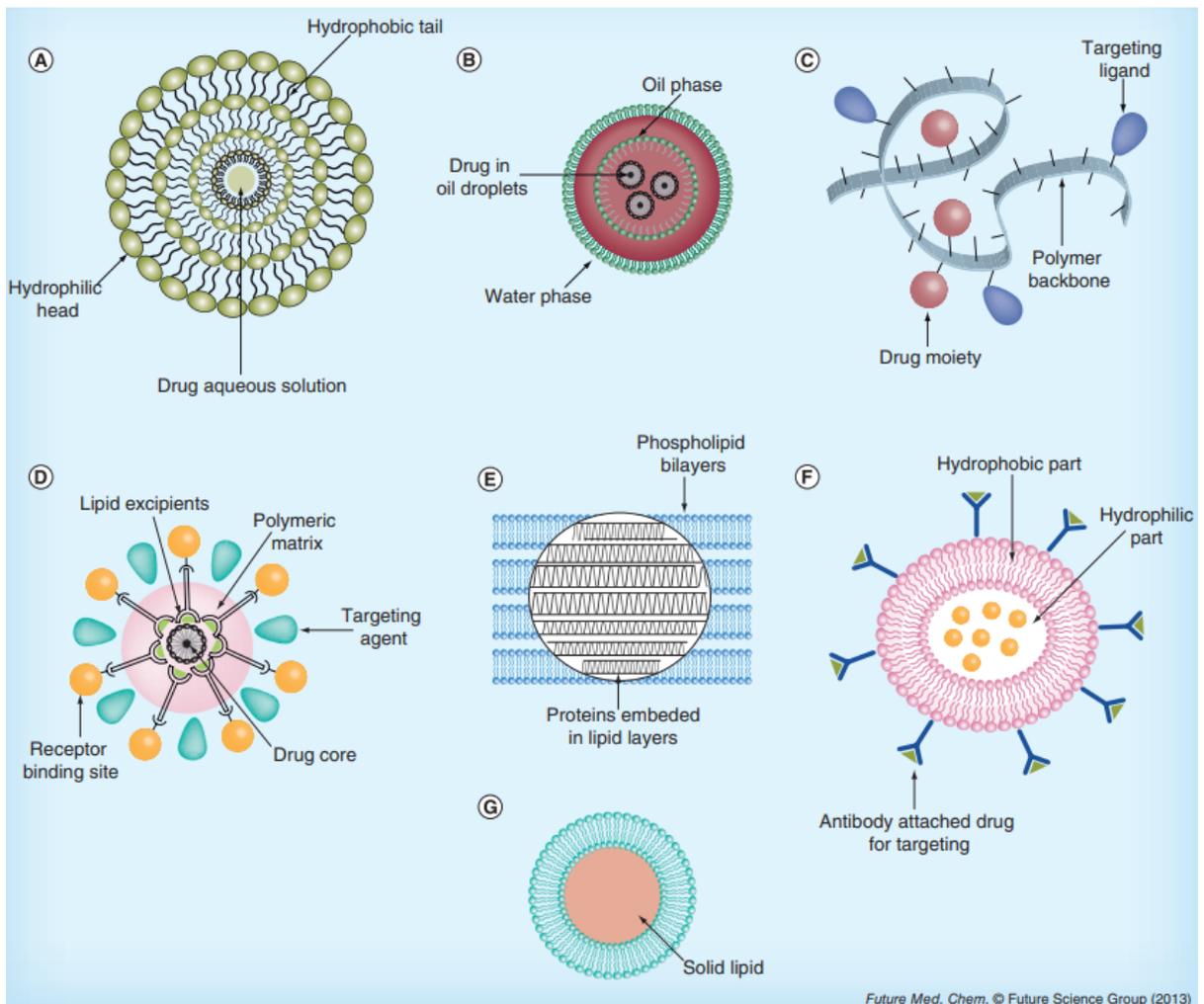
#### 5.3.2. Amélioration de l'administration des médicaments

L'amélioration de l'administration des médicaments est une autre stratégie envisagée pour empêcher la résistance. Pour cela, des composés nanométriques (**nanoporteurs**) sont synthétisés pour encapsuler les médicaments et mieux les délivrer à leur site d'action (revu par [667]) (Figure 10). Ces nanoformulations permettraient aussi de réduire la toxicité de l'antimicrobien (revu par [671]) et d'appliquer une thérapie combinée en synergie (lors du transport de plusieurs médicaments) (revu par [672]). Dans le cas de la leishmaniose, plusieurs composés ont été étudiés, tels que *les liposomes, les niosomes, les nanoémulsions, les nanodisques, les transfersomes, les nanoparticules lipidiques solides, et les nanoparticules polymères et métalliques* (revu par [667]). Même si peu d'études se sont intéressées à leur utilisation comme moyen précis pour surmonter la résistance aux médicaments, certains nanoporteurs se sont montrés efficaces contre des souches résistantes de *Leishmania*. Il s'agissait par exemple de formulations de transfersomes chargées en AmB [673], et de nanoparticules chargées en Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) [674] ou en



## Chapitre 5. Quels nouveaux traitements contre la résistance ?

Andrographolide (AG) [675] ; l'HP- $\beta$ -CD et l'AG étant deux composés efficaces contre le parasite [674, 675]. Plus précisément, les nanoparticules d'AG ont été conçues avec le polymère PLGA et la vitamine E TPGS [675], leur petite taille permettant une entrée rapide dans les macrophages infectés par *Leishmania* [676]. Le pH acide de la cellule favorise ensuite la dégradation du PLGA (revu par [677, 678]), ce qui libère la charge thérapeutique et y assure un effet localisé. La vitamine E TPGS inhibe la glycoprotéine P (P-gp) (revu par [657]) et agit en synergie avec l'effet leishmanicide de l'AG [675]. Ainsi, même si ces recherches doivent être approfondies, elles soulignent le potentiel des nanoporteurs dans la lutte contre la résistance.



**Figure 10.** Exemples de nanoformulations d'administration de médicaments [515]

(A) Liposome, (B) émulsion, (C) polymère-médicament conjugué, (D) nanoparticules polymères, (E) nanodisques, (F) niosomes et (G) nanoparticules lipidiques solides.

## 5.4. Composés d'origine végétale et plantes médicinales

Depuis longtemps, les composants végétaux sont utilisés pour leurs propriétés thérapeutiques. Selon la *Food and Drug Administration* (FDA) des Etats-Unis, près de 35% des médicaments mondiaux actuels seraient dérivés de produits naturels [679] et diverses plantes sont utilisées pour des soins préventifs et/ou curatifs. C'est notamment le cas dans les pays dépourvus de moyens et d'établissement de santé, où la majorité de la population dépend des plantes médicinales pour les soins de santé primaires (revu par [680]). Dans certains pays, ces plantes s'utilisent aussi contre des maladies négligées, comme la leishmaniose et le paludisme [681, 682].

En raison du problème majeur de santé publique lié à la résistance aux médicaments, d'avantage d'études sont menées pour identifier de nouvelles substances végétales (extraits bruts de plantes, fractions, composés isolés et huiles essentielles) biologiquement actives contre les pathogènes des MTNs, tels que *Leishmania* (revu par [683-685]). Une étude récente a ainsi montré que les **plantes Asteraceae** et les **produits naturels de l'olivier** possèdent des propriétés efficaces contre le parasite (inhibition de sa croissance par apoptose) et jouent un rôle ethnopharmacologique important [686, 687]. D'autres travaux ont montré que les **flavonoïdes** (composés présents dans les légumes, les fruits et certains produits d'origine végétale (revu par [688])) modulent les protéines P-gp et MRP1, et inversent la résistance médiée par ces protéines [689]. Certains composés sont aussi connus pour détenir des cibles importantes impliquées dans la survie, la virulence et la résistance de *Leishmania*, telles que l'enzyme arginase [690], le trypanothione [691], la GP63 [692] et la tyrosine aminotransférase [693]. Dans ce contexte, la **quercétine** inverse la résistance à la MF, en réduisant la synthèse de la P-gp [522]. De plus, les multiples cibles cellulaires lui permettent de fonctionner comme un médicament de promiscuité ; un atout clé qui pourrait réduire le risque d'émergence d'une résistance médicamenteuse [690]. D'autres produits naturels, tels que les **sesquiterpènes**, ont montré une forte efficacité à surmonter la multirésistance chez *Leishmania*, y compris la résistance à la MF [593]. Dans ce cas précis, il a été constaté que le sesquiterpène C3 empêchait la résistance et sensibilisait une souche multirésistante, en augmentant la concentration intracellulaire du médicament grâce à la modulation du transporteur P-gp [593]. Finalement, il est intéressant de préciser que l'**andrographolide (AG)**, mentionné précédemment ([section 5.3.2.](#)), est un composé extrait de feuilles d'*Andrographis paniculata*, une plante médicinale indienne. Ces éléments soulignent ainsi que la combinaison de différentes approches (dans ce cas-ci, les nanopORTEURS synthétiques chargés d'AG) peuvent, ensembles, constituer une stratégie précieuse pour lutter contre la résistance.



## 5.5. Peptides antimicrobiens (PAMs)

### 5.5.1. Peptides uniques

Ces dernières années, les peptides antimicrobiens (PAMs) ont suscité un intérêt croissant pour le développement de nouveaux médicaments (revu par [694]), dépassant même parfois l'intérêt porté sur les anticorps et les protéines thérapeutiques (revu par [695]). L'explication se trouve notamment dans les bénéfices supplémentaires qu'ils permettent par rapport à d'autres petites molécules (faible toxicité, forte sélectivité) et les progrès de leur synthèse (revu par [696]). Par ailleurs, étant donné que les PAMs sont capables de perturber et/ou de déstabiliser les membranes biologiques, y former des canaux transmembranaires et exercer un rôle immunostimulant (renforcement de l'immunité de l'hôte), ils seraient alors moins enclins à sélectionner des souches résistantes ; un bénéfice supplémentaire non négligeable [697] et revu par [698]. C'est notamment pour l'une de ces raisons que leur utilisation apparaît comme une stratégie avantageuse pour le développement de nouveaux traitements antileishmaniens et la lutte contre la résistance. Bien que de nombreux travaux aient révélé diverses propriétés antibactériennes, antifongiques, ou anticancéreuses, les effets contre les protozoaires, et plus précisément contre *Leishmania*, n'ont été que peu explorés (revu par [699]).

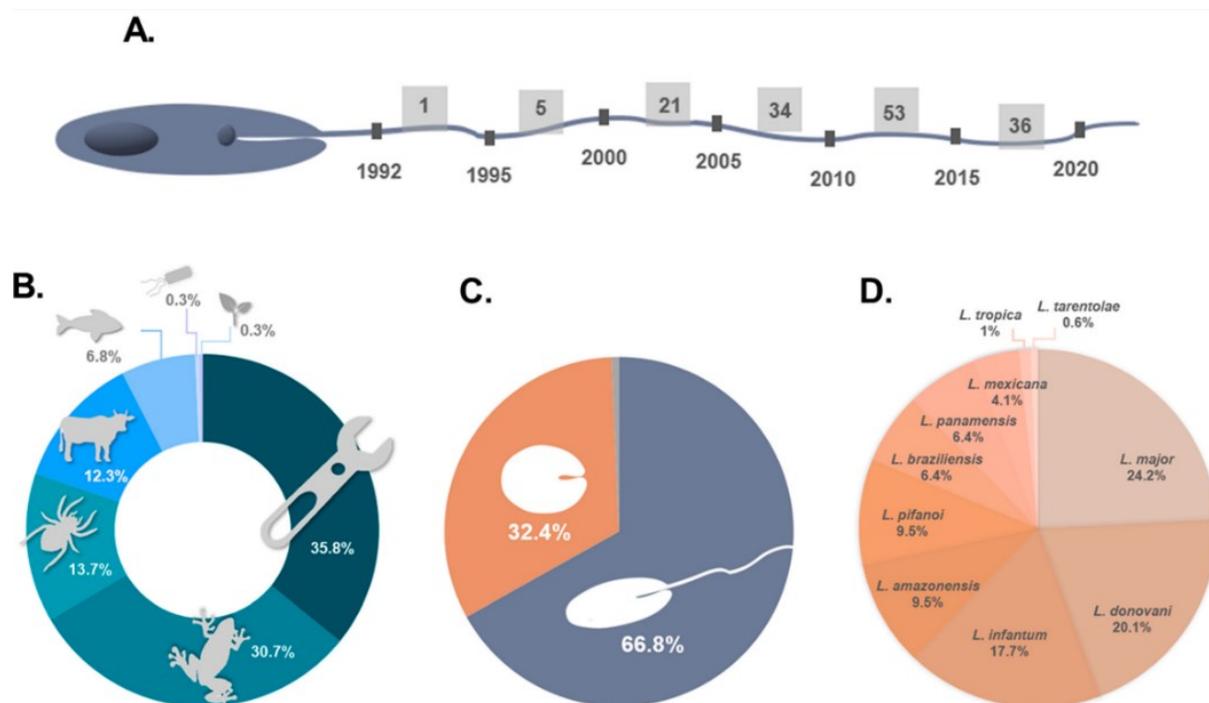
Toutefois, près de **150 peptides uniques** (qui n'existent que dans une seule protéine du protéome d'intérêt [700]) pouvant affecter la croissance de *Leishmania*, ont pu être identifiés jusqu'à présent (Figure 11) (revu par [699]) ; ceux dérivés de plantes étant parmi les plus efficaces [701]. La première découverte date du début des années 1990 et le peptide (la dermaseptine) fut isolé de sécrétions de peau de grenouille [702]. Depuis, différents organismes ont suscité l'intérêt pour ces recherches (revu par [703]) et avec l'avancement des connaissances et des technologies, des progrès considérables ont été réalisés dans la synthétisation de peptides (dont la conception s'inspire par exemple de toxines ou de protéines naturelles (revu par [704, 705])).

D'autre part, l'étude de la structure et de la composition des peptides antileishmaniens a montré que la présence d'un fort pourcentage d'arginine permet une meilleure activité inhibitrice contre *Leishmania* (revu par [699]). Ces résultats s'expliquent notamment par la grande capacité des résidus d'arginine à interagir avec les membranes cellulaires, et par conséquent à induire des modifications qui nuisent d'avantage à la viabilité du parasite [706] ; un phénomène également observé lors de l'étude de d'autres PAMs et de peptides anticancéreux [706, 707].



## Chapitre 5. Quels nouveaux traitements contre la résistance ?

Finalement, des travaux ont révélé que la leucine joue également un rôle fondamental dans l'amphipathicité des PAMs et dans leur efficacité à perturber les membranes du pathogène [708] ; des aspects clés pour l'efficacité *in vivo* des peptides. Cependant un grand nombre de peptides antileishmaniens riches en leucine ont révélé une toxicité élevée, limitant leur utilisation clinique (revu par [699]). Pour pallier ces difficultés de conception et d'évaluation *in silico* des PAMs ou des peptides anticancéreux, des outils informatiques ont été développés, tels que [Pepdraw](#), [AMPA](#), [DBSAASP](#), et [PEP-FOLD](#) (revu par [699]). Cependant, malgré l'importance considérable de ces outils, à l'heure actuelle, aucun d'entre eux n'est spécifique aux peptides ciblant *Leishmania*.



**Figure 11.** Aperçu général des peptides antileishmaniens actuels [699]

(A) Chronologie. (B) Origine. (C) Pourcentage d'activité leishmanicide des peptides pour chacune des deux formes de vie du parasite. (D) Espèces de *Leishmania* utilisées pour les études.

### 5.5.2. Combinaisons peptide-médicament

Pour améliorer l'efficacité de la destruction du parasite, des **combinaisons peptide-médicament** ont également été proposées. Comme décrit précédemment ([chapitre 4, section 4.4.6.](#)) la résistance à la MF est majoritairement associée à une diminution de l'entrée du médicament. Dans ce contexte, Luque-Ortega et al. [709] ont lié un **peptide de pénétration cellulaire** (« CPP », pour « *Cell-Penetrating Peptide* ») (un court

## Chapitre 5. Quels nouveaux traitements contre la résistance ?

peptide pouvant traverser les membranes biologiques) à la MF. La conjugaison **CPP-MF** a ainsi permis d'inverser la résistance au médicament chez les souches résistantes possédant le transporteur LdMT non fonctionnel (mutations dues à la résistance), en permettant l'internalisation de la MF grâce au CPP. En complément, des travaux ont montré que la conjugaison du **CPP-PMM** permettait l'obtention d'effets synergiques, améliorant ainsi l'activité leishmanicide, et par conséquent la destruction du parasite [710]. Dans le même ordre d'idées, la combinaison entre un conjugué polypeptide ramifié et le **méthotrexate (MTX)** a permis d'augmenter l'effet du MTX contre l'infection de *L. donovani* chez la souris [711]. Pour ces raisons, les combinaisons peptide-médicament constituent une approche prometteuse dans l'inversion de la résistance associée à un dysfonctionnement des systèmes d'administration du médicament.

### 5.6. Traitements combinés

En raison de la liste très limitée de médicaments actuellement disponibles pour lutter contre la leishmaniose, la combinaison de traitements est utilisée depuis plusieurs années. Cette pratique, également proposée pour lutter contre d'autres maladies (par exemple le paludisme et le VIH [712]), fait partie des méthodes thérapeutiques vues comme une alternative possible pour lutter contre l'émergence de parasites résistants. En effet, l'utilisation de deux médicaments possédant des mécanismes d'action différents semblent offrir une meilleure efficacité d'attaque contre *Leishmania*, et diminue ainsi les chances de survie du parasite. Dans cette pratique, le premier médicament est généralement utilisé à de fortes doses afin de détruire un maximum de parasites ; tandis que le second médicament (dont le temps de demi-vie est généralement plus long) sert souvent à éliminer les parasites résistants au premier antiparasitaire [713]. Cependant, bien que les thérapies combinées réalisées chez des patients atteints de la leishmaniose aient montré des résultats efficaces (quelques exemples sont présentés en [Annexe 8](#)), il est important de préciser qu'un nombre considérable de patients est souvent exclu de ces types de traitement, en particulier ceux souffrant d'insuffisance rénale ou de formes trop sévères de la maladie (revu par [714]). D'autres facteurs clés peuvent également influencer la mise en place d'une thérapie combinée, en particulier le rapport bénéfice/risque des médicaments utilisés, l'infrastructure du service de santé en charge du traitement, les disponibilités locales des médicaments, ou encore les enjeux épidémiologiques [715, 716]. Ainsi, pour tenter de surmonter ces difficultés, de nouvelles combinaisons sont étudiées, et certaines d'entre elles offrent des résultats prometteurs. Il s'agit notamment d'une thérapie orale combinée constituée d'un nano-assemblage complexe de Sb et de MF [717], d'une combinaison entre l'antimoniote de méglumine (AM) et des dérivés d'oxiranes [718], ou encore de l'utilisation

## Chapitre 5. Quels nouveaux traitements contre la résistance ?

combinée d'amiodarone (antiarythmique) et de voriconazole (antifongique) [719-722]. Finalement, en raison des problèmes mondiaux de santé publique également liés aux patients souffrant d'une co-infection leishmaniose-VIH, des études ont proposé des approches basées sur l'utilisation combinée d'un médicament anti-VIH avec un médicament antileishmanien. A titre d'exemples, des résultats prometteurs ont pu être observés pour les combinaisons comprenant le nelfinavir et la MF ou l'AmB [723], ou le lopinavir (LPV) et la MF [724].

### 5.7. Repositionnement des médicaments

Le développement d'un nouveau médicament a un coût très élevé (plus de 2 milliards de dollars américains) et nécessite de nombreuses années d'études (environ une quinzaine d'années) [725]. De plus, parmi les composés testés en laboratoire, seulement 5% des molécules candidates sont finalement approuvées [479]. Pour ces raisons, le repositionnement des médicaments prend de plus en plus d'importance en recherche [726, 727]. Plus précisément, le **repositionnement des médicaments** (parfois appelé la « **réorientation des médicaments** ») consiste à identifier de nouvelles utilisations de médicaments déjà commercialisés. Plusieurs thérapies existantes pour la leishmaniose étaient d'ailleurs initialement destinées à d'autres maladies (AmB (antifongique), PMM (antibiotique aminoglycoside utilisé pour traiter les infections intestinales), MF (anticancéreux)), soulignant l'importance des propriétés multifactorielles de certaines molécules. Dans ce contexte, Charlton RL et *al.*, ont récemment révisé plus de 50 médicaments présentant un intérêt dans le développement de nouvelles thérapies anti-leishmaniennes [728]. Il s'agissait notamment d'anticancéreux, d'antifongiques, d'antiparasitaires, d'antibactériens, d'antiviraux, et d'antihistaminiques, [728]. Une autre étude a démontré que des dérivés antitumoraux de la camptothécine et des indenoisoquinoléiniques (composés expérimentaux) avaient une activité leishmanicide prometteuse dans des modèles *in vitro* et *in vivo* [729, 730]. L'auranofine (un composé d'or oral utilisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde) a quant à lui montré une activité inhibitrice de la croissance de *Leishmania*, et a ouvert la voie sur l'utilisation potentielle de complexes à base d'or (I), en tant qu'outils chimiques [731]. Finalement, une étude à plus large échelle visant à réduire l'incidence des maladies à transmission vectorielle a démontré que l'utilisation de deux isoxazolines (classe de composés autorisés depuis quelques années en tant que médicaments vétérinaires pour la protection des animaux de compagnie contre les tiques et les puces [732, 733]) avait un avenir prometteur dans le traitement contre la leishmaniose et d'autres maladies vectorielles chez l'homme [734].



## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires : généralités



[6.1. Découverte et évolution des connaissances des EVs](#)

[6.2. Biogénèse et nomenclature](#)

[6.3. Composition des EVs](#)

[6.4. Tris régulés des cargaisons d'EVs](#)

[6.5. Interactions EVs-cellules réceptrices](#)

[6.6. Principales fonctions des EVs](#)



## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités

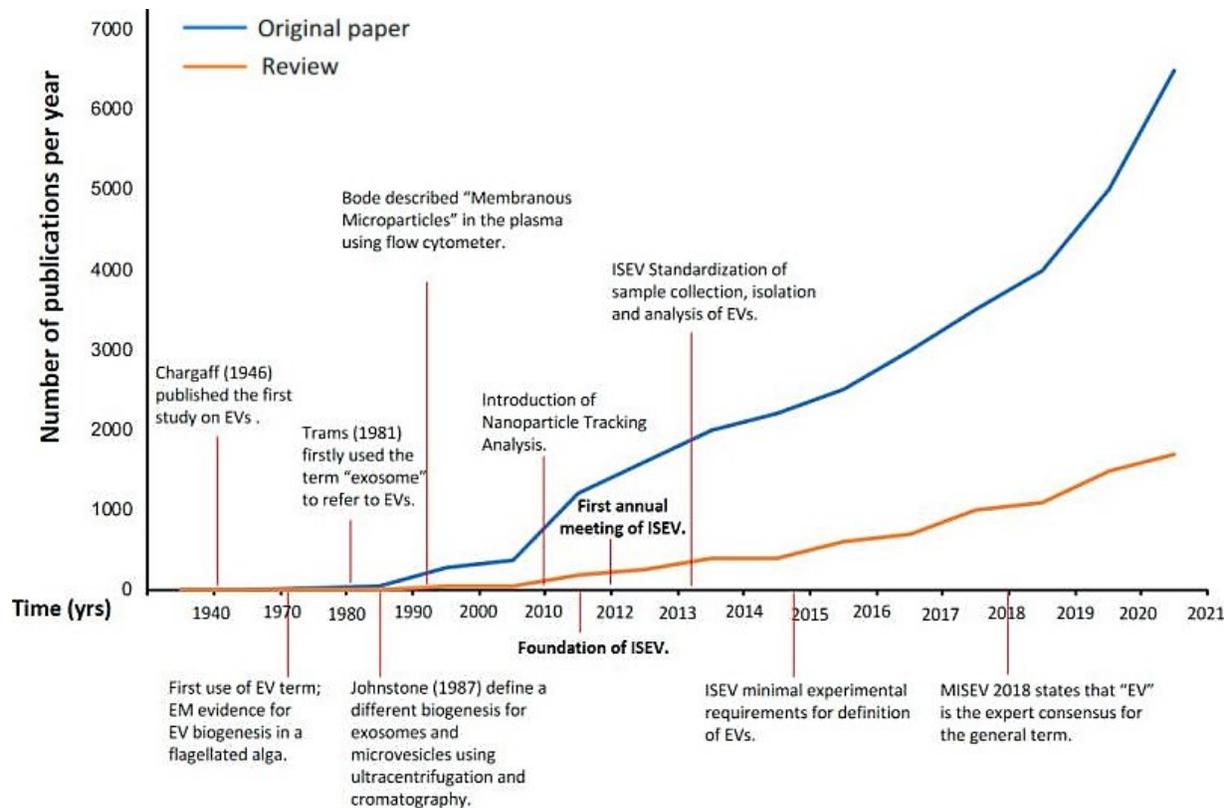
*Par définition, les vésicules extracellulaires (« EVs », pour « Extracellular Vesicles »), sont des microparticules dotées d'une bicouche lipidique, produites naturellement par la majorité des cellules biologiques, et qui ne peuvent pas se répliquer en raison de l'absence d'un noyau fonctionnel [735, 736].*

### 6.1. Découverte et évolution des connaissances des EVs

La découverte des EVs date des années 1940, lors des premières recherches menées sur la coagulation sanguine. A l'époque, leur identification n'était pas claire, et ces particules ont d'abord été vues comme une « **fraction particulière** » (1946) [737], puis comme de la simple « **poussière cellulaire** » (1967) [738] et revu par [739]. Ce n'est qu'en 1971 que leur première description en tant que « microparticules » a été réalisée [740]. Ces travaux ont ainsi constitué les premiers écrits à décrire la présence de composants à l'intérieur des EVs (en particulier des protéines et des lipides) et à mentionner l'importance biologique potentielle de ces particules. Au cours des années suivantes, diverses études se sont intéressées aux EVs, ce qui a permis d'obtenir de nouvelles connaissances à leur sujet, notamment en termes de taille, de forme, de composition et de formation (revu par [741]). Par exemple, en 1983, certaines de ces microparticules ont été définies pour la première fois comme des « exosomes » (EXOs) [742, 743] et l'existence d'une nouvelle voie de tri et de trafic intracellulaire (appelée aujourd'hui « voie de sécrétion des EXOs ») a été révélée [742]. Toutefois, à l'époque, l'importance des EVs n'était pas reconnue par tous les scientifiques et beaucoup d'entre eux ont longtemps considérés que les EVs n'étaient que des « **mécanismes d'élimination des déchets** », présents uniquement pour permettre aux cellules de se débarrasser de protéines « obsolètes » [744].

Malgré tout, les recherches sur les EVs se sont maintenues et les premières avancées majeures dans la compréhension de la nature fondamentale de ces microparticules ont eu lieu, notamment au cours des années 1990. A titre d'exemple, en plus des diverses études des EVs de mammifères qui ont apporté de nombreuses connaissances, des travaux ont montré la présence de ces EVs chez les bactéries [745-747], et leur interaction avec des cellules humaines [747]. L'étude de diverses maladies a ensuite permis d'identifier des modifications du nombre d'EVs entre des patients sains et des patients malades [748, 749], et les premières descriptions physiques et biochimiques des EVs ont fait leur apparition [750, 751]. Ces révélations, suivi de la première réunion de la société internationale pour les vésicules extracellulaires (« ISEV », pour « [International Society for Extracellular Vesicles](#) »), ont entraîné un accroissement fulgurant et exponentiel de l'intérêt des EVs en recherche, dès le début du 21<sup>ème</sup> siècle. Ceci c'est notamment vu par l'augmentation du nombre de demandes de subventions, de brevets, et de publications (revu par [752, 753]) (Figure 12).

## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités



**Figure 12.** Articles et revues sur les EVs publiés dans PubMed, de 1946 à 2021 [753]

Abréviations : **(EM)** microscopie électronique ; **(ISEV)** Société Internationale des Vésicules Extracellulaires ; **(MISEV)** informations minimales pour les études sur les vésicules extracellulaires.

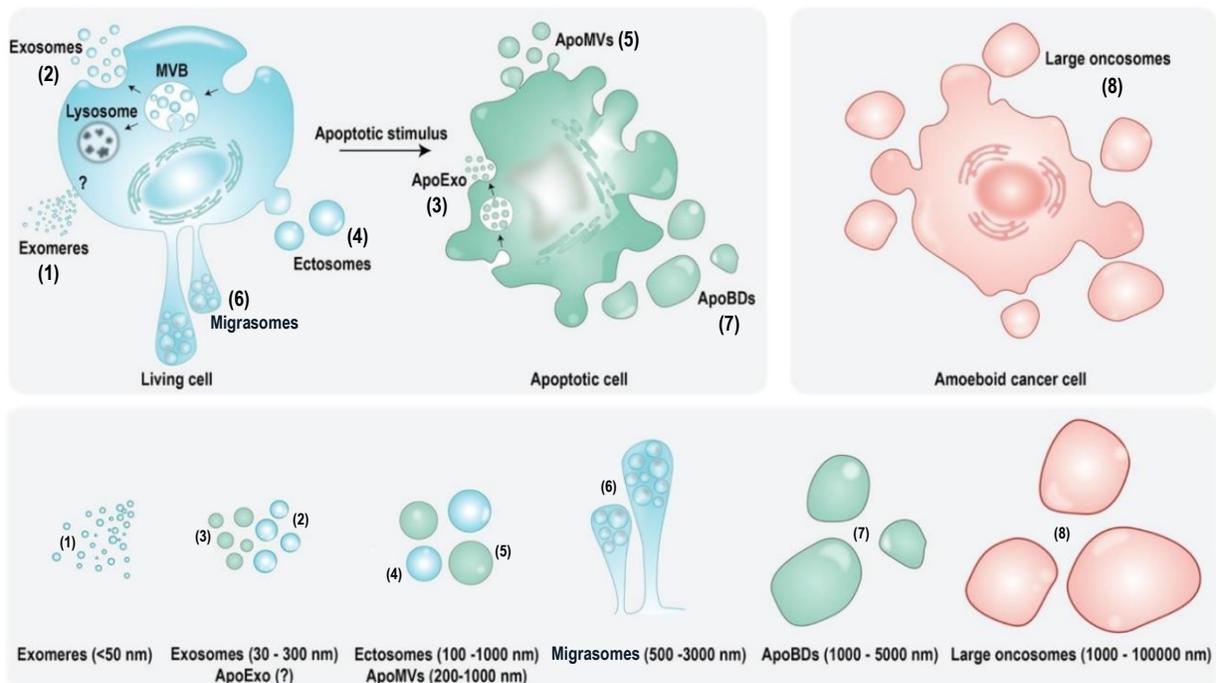
Ainsi, dès le début du 21<sup>ème</sup> siècle, les premières revues sur la biologie des EVs ont été publiées [754, 755], ainsi que les premières études -omiques (par exemple sur le protéome des EVs [756]). Des travaux ont également montré que les EVs sont des médiateurs clés de la communication intercellulaire, capables de transporter un large éventail de molécules, et ayant un rôle fondamental dans divers processus biologiques importants (revu par [753]). Les EVs sont aussi considérées comme une source prometteuse de biomarqueurs pour le diagnostic des maladies ([chapitre 7, section 7.1.](#)) car elles reflètent la cellule d'origine en termes de composition (protéines, acides nucléiques, lipides). Par conséquent, étant donné leur présence dans la majorité des fluides corporels (la salive, le sang, l'urine, le liquide céphalo-rachidien, etc.), les « biopsies liquides » contenant des EVs apparaissent comme une alternative prometteuse aux biopsies régulières, notamment en raison de leur obtention relativement simple et peu invasive (revu par [757]). Outre ce potentiel diagnostique, l'utilisation thérapeutique des EVs ([chapitre 7, section 7.2.](#)) (de même que leurs homologues synthétiques ([chapitre 5, section 5.3.2.](#))) en tant que nouveau système amélioré (ciblé) de délivrance de médicaments, fait aussi partie des études actuelles dans le domaine, cela pour une grande

## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités

variété de maladies [758], et revu par [741, 759]. Un guide pour l'étude des EVs a d'ailleurs été réalisé, le « MISEV » (pour « *Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles* » [760]) et mis à jour plusieurs fois, afin d'orienter les chercheurs dans leur méthodologie d'étude [736, 761]).

Finalement, il est important de préciser qu'au cours du temps, divers travaux ont également montré que des structures similaires aux EVs pouvaient être sécrétées par différents pathogènes, en particulier les bactéries Gram-négatives (chez les bactéries, les vésicules sont surtout nommées « OMVs », pour « *Outer Membrane Vesicles* »), les champignons, et les parasites eucaryotes (revu par [762]). Les premières données proposant la libération de microvésicules par des parasites protozoaires eucaryotes datent d'ailleurs de 1912, et correspondent à l'observation « d'appendices » chez *Trypanosoma brucei* [763]. Toutefois, il aura fallu attendre plusieurs années pour obtenir des données plus précises sur la sécrétion de vésicules par la membrane plasmique de ce pathogène, ainsi que d'autres. Même si à l'époque ces vésicules étaient mal connues, rapidement des travaux ont montré que les EVs semblaient pouvoir jouer un rôle important dans les processus d'interactions de ces organismes avec leur hôte ; ce qui fit grandir l'intérêt pour l'étude des EVs dans le domaine des maladies infectieuses.

### 6.2. Biogénèse et nomenclature des différents types d'EVs



**Figure 13.** Représentation des différentes vésicules extracellulaires [764]

## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités

De façon générale, les EVs sont souvent classées en trois grandes catégories, en fonction de leur biogénèse : (i) les exosomes ([section 6.2.1.1.](#)), (ii) les microvésicules ([section 6.2.1.2.](#)), et (iii) les corps apoptotiques ([section 6.2.1.3.](#)) [736, 765]. Toutefois, les EVs constituent un univers très dense, qui comprend également d'autres vésicules ([section 6.2.2.](#)). Un aperçu des différents types d'EVs est présenté dans la Figure 13.

### 6.2.1. Principales catégories d'EVs

#### 6.2.1.1. Les exosomes (EXOs)

Les **exosomes (EXOs)** (Figure 13, (2)) sont des vésicules de 30 à 150 nm de diamètre, sécrétées par la majorité des cellules vivantes (revu par [766, 767]). Ils sont générés dans des compartiments endosomaux et libérés dans l'espace extracellulaire sous forme de vésicules intraluminales (« ILVs » pour « *Intraluminal Vesicles* »). Plus précisément, ces ILVs se trouvent dans des corps multivésiculaires (« MVBs » pour *Multivesicular Bodies* »), et leur fusion avec la membrane plasmique de la cellule permet la sécrétion extracellulaire des EXOs (revu par [766, 768]).

Pour mieux comprendre, la biogénèse des EXOs se déroule en plusieurs étapes. Elle commence tout d'abord par un processus d'endocytose (Figure 14, (1)), qui, par bourgeonnement vers l'intérieur de la membrane cellulaire, englobe diverses molécules bioactives et permet la formation d'un endosome précoce (Figure 14, (2)). Après maturation, cet organe va devenir un endosome tardif (Figure 14, (3)), puis finalement des MVBs (Figure 14, (4)). Les protéines et les lipides présents à la surface de ces MVBs vont ensuite se réorganiser et se regrouper sous la forme de microdomaines membranaires, riches en tétraspanines [769]. Après le recrutement des composants solubles (tels que les protéines cytosoliques et les acides nucléiques) (Figure 14, (5)) destinés au tri des ILVs [770], ces microdomaines favorisent le bourgeonnement membranaire des MVBs vers leur lumière, suivi d'un processus de fission qui permet la formation des ILVs (Figure 14, (6)). À ce stade, il est important de préciser qu'il existe deux grands types de MVBs : les MVBs « sécrétoires » qui libéreront les futurs EXOs (Figure 14, (7)), et les MVBs « dégradatifs » qui fusionnent avec les lysosomes pour la dégradation de leur contenu (Figure 14, (8)) (revu par [766, 771]). Ces deux voies (sécrétoire/exosomale et dégradative/lysosomale) sont minutieusement régulées par deux familles de protéines : les syndécans et les tétraspanines [771]. Bien que ces deux types de MVBs soient morphologiquement identiques, leur finalité semble fortement orientée selon la tétraspanine impliquée (tétraspanine CD63 : MVBs sécrétoires ; tétraspanine-6 : MVBs dégradatifs) (revu par [771]) et la teneur en cholestérol (les MVBs sécrétoires sont plus riches en cholestérol que les MVBs dégradatifs) [772]. La formation

## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités

des EXOs à partir des MVBs sécrétoires se déroule ensuite selon des mécanismes dépendants ou indépendants des sous-unités du complexe de tri endosomal requis pour le transport (« ESCRT » pour « *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport* »). La voie dépendante de l'ESCRT (Figure 14, (9)) fait intervenir les quatre grands complexes de cette machinerie, à savoir ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II et ESCRT-III, ainsi que des protéines associées, telles que ALIX ; chacun d'entre eux possédant des fonctions bien précises [773]. Les mécanismes indépendants de l'ESCRT (Figure 14, (10)) reposent quant à eux principalement sur la génération de céramide, qui permet la formation de sous-domaines membranaires responsables du bourgeonnement des MVBs [774, 775].

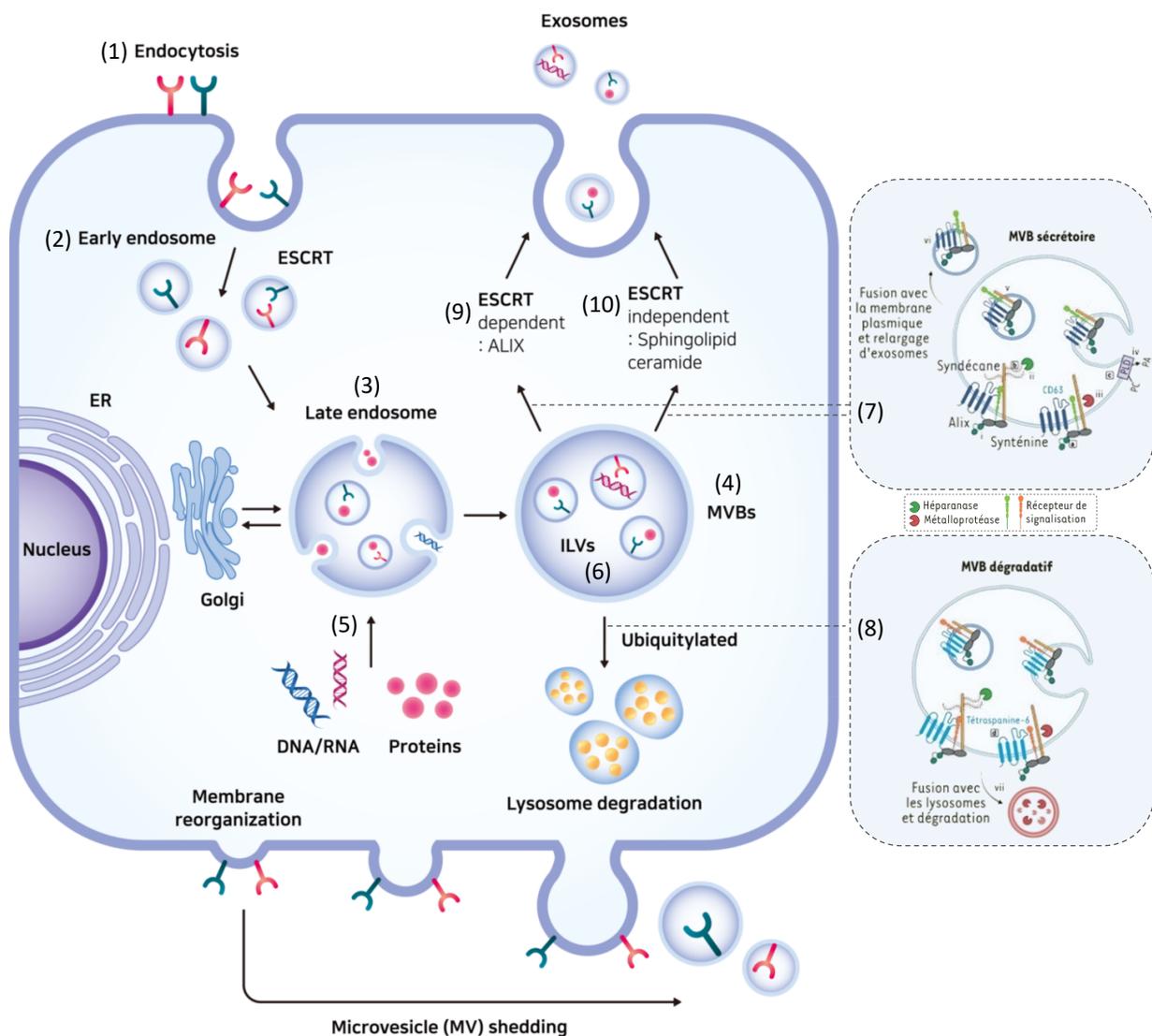


Figure 14. Biogénèse des exosomes (créée à partir de [771, 776]).

## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités

Finalement, une étude récente a souligné la complexité des micro-organismes pathogènes, en particulier chez *Giardia lamblia*, en montrant que même en l'absence de certains composants réputés clés pour la biogénèse des EXOs, le protozoaire était malgré tout capable de produire des vésicules de type exosomes (revu par [777]). Plus précisément, *Giardia lamblia* est connu pour détenir une machinerie ESCRT réduite, un manque de tétraspanines, un système endomembranaire élémentaire par rapport aux autres parasites (puisqu'il est dépourvu de la voie endo-lysosomale classique) et pour être incapable de synthétiser du céramide *de novo* [778, 779]. Toutefois, le protozoaire possède des composants cellulaires spécialisés [780] qui prennent le rôle des composants manquants et qui lui permettent d'avoir un mécanisme unique de formation de vésicules de type EXOs ([Annexe 9](#)) (revu par [777]). Un bon exemple d'adaptation évolutive de ce parasite.

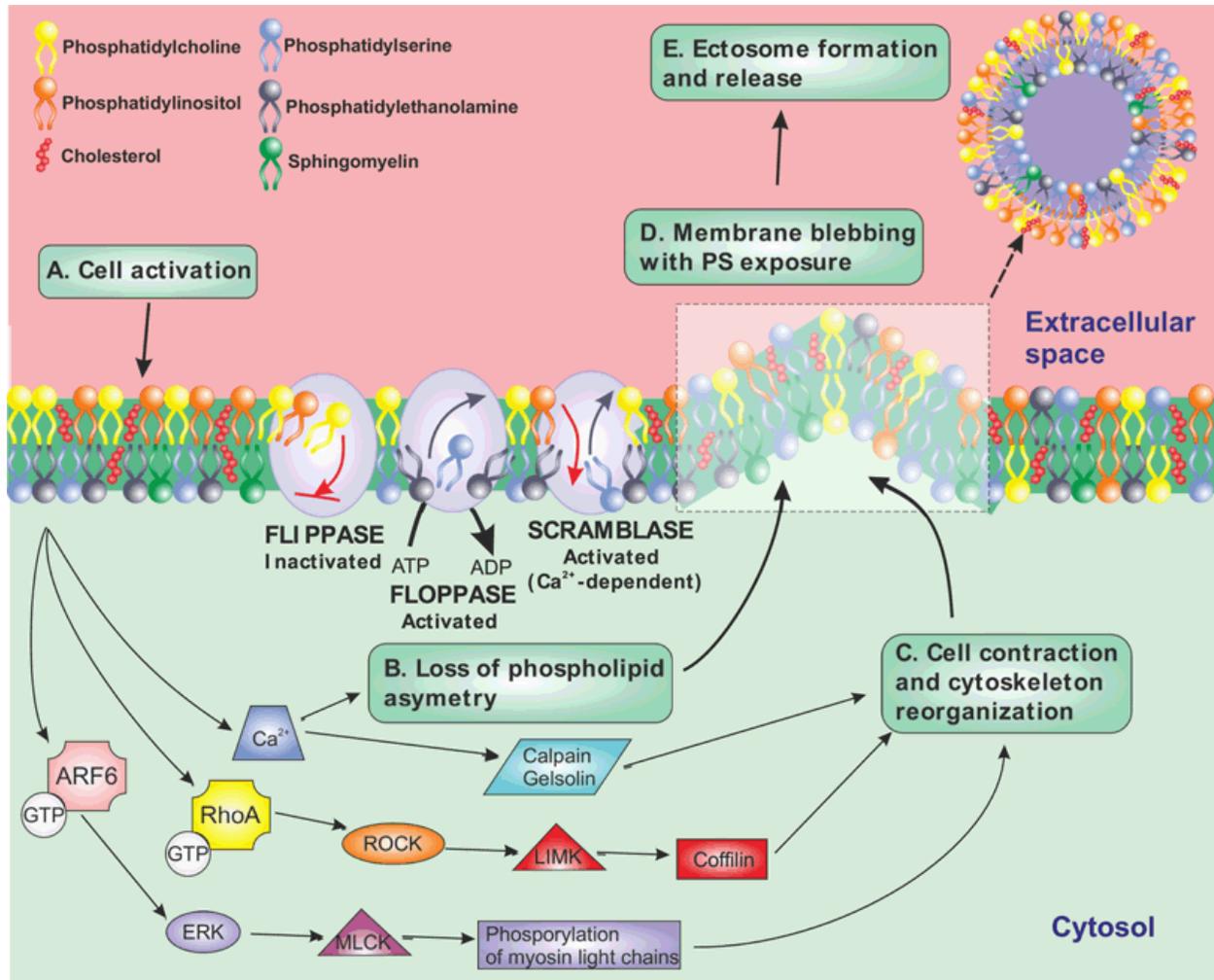
### 6.2.1.2. Les microvésicules (MVs)

Les **microvésicules (MVs)**, également appelées ectosomes (Figure 13, (4)), sont des vésicules hétérogènes de 100 à 1000 nm de diamètre [767, 781]. Elles sont libérées de la surface de nombreux types de cellules (tels que les cellules sanguines, endothéliales, neuronales, et les cellules souches embryonnaires (revu par [782])) et sont formées par bourgeonnement direct de la membrane plasmique de la cellule (revu par [783]).

Plus précisément, la biogénèse des MVs commencent par une activation de la cellule (Figure 15, (A)), suivi du déroulement de plusieurs modifications moléculaires, lipidiques, et protéomiques de la membrane plasmique de la cellule (revu par [768, 784, 785]). À ces modifications s'ajoutent également des changements dans la teneur en calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), ce qui provoque le recrutement et l'activation d'enzymes dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  (telles que les translocases aminophospholipidiques (flipases et floppases), les scramblases et la calpaïne) (revu par [784, 786]). Ces enzymes vont à leur tour engendrer d'autres réarrangements dans la membrane plasmique de la cellule et, plus précisément, altérer l'asymétrie des phospholipides membranaires (Figure 15, (B)) (revu par [785, 787]). Ces perturbations vont ainsi provoquer une flexion physique de la membrane de la cellule et exposer la PS à la surface cellulaire (Figure 15, (D)) (une modification d'ailleurs considérée comme l'une des principales caractéristiques des MVs) [788] et revu par [789]. La flexion physique de la membrane de la cellule est notamment due à une restructuration du cytosquelette d'actine sous-jacent (Figure 15, (C)), engendrée par diverses protéines responsables du maintien de la forme cellulaire, telles que les petites GTPases de la famille Rho et la protéine kinase associée à Rho (« ROCK » pour « *Rho*-

## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités

associated protein kinase »)) [790, 791]. L'ensemble de ces modifications favorise ensuite le bourgeonnement membranaire, et donc la formation des MVs (Figure 15, (E)) (revu par [785, 787]).



**Figure 15.** Biogénèse des microvésicules (ectosomes) [792]

Abréviations : ARF6, facteur 6 d'ADP-ribosylation ; ERK, kinase régulée par le signal extracellulaire ; LIMK, kinase du domaine LIM ; MLCK, kinase de la chaîne légère de la myosine ; RhoA, membre A de la famille des gènes homologues de Ras ; ROCK, protéine kinase associée à Rho

Finalement, même si la formation des MVs est bien distincte de celle des EXOs, des travaux ont montré que ce processus utilise la machinerie endosomale, incluant le facteur 6 de ribosylation de l'ADP GTPase (« ARF6 » pour « ADP-ribosylation factor 6 ») lié à Ras, ainsi que les composants du système ESCRT [793]. Toutefois, une étude a montré qu'il existerait un autre mécanisme par lequel des protéines pourraient entraîner une flexion de la membrane plasmique aboutissant à la formation des MVs : l'encombrement

## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités

protéine-protéine [794]. Dans ce processus, la flexion serait notamment possible grâce à une pression cellulaire latérale, générée par les interactions entre les protéines [794]. À la suite de cette découverte, il a ainsi été proposé que l'enrichissement de la cargaison en protéines sur les sites de formation des MVs naissantes, pourrait à lui seul, être suffisant pour favoriser la formation de MVs *de novo* (revu par [787]).

### 6.2.1.3. Les corps apoptotiques (ApoBDs)

Les **corps apoptotiques** (« **ApoBDs** », pour « *Apoptotic bodies* ») (Figure 13, (7)) (aussi parfois appelés « apoptosomes ») mesurent entre 1  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$ , et ils sont libérés par bourgeonnement membranaire lors de la mort cellulaire programmée des cellules (revu par [767, 795]). Plus précisément, lorsque les cellules sont en apoptose, elles subissent plusieurs modifications morphologiques qui aboutissent à leur dégradation et à la libération de grosses vésicules : les ApoBDs (revu par [796]). Pour ces raisons, ces EVs sont perçues comme « *le produit du désassemblage des cellules apoptotiques* » (revu par [782]). Cette clairance est notamment médiée par le biais d'interactions spécifiques entre les récepteurs de reconnaissance des phagocytes et la membrane modifiée de la cellule apoptotique [797, 798]. Par ailleurs, la plupart des ApoBDs ne perdurent pas et sont phagocytés par les macrophages afin d'être éliminés (revu par [799, 800]). Finalement, des travaux récents ont découvert que les ApoBDs participent également à la sécrétion de d'autres EVs, physiologiquement distinctes des ApoBDs. Ces EVs dérivées des ApoBDs comprennent des microvésicules apoptotiques (« ApoMVs », pour « *Apoptotic Microvesicles* ») (Figure 13, (5)) et des exosomes apoptotiques (« ApoExos », pour « *Apoptotic Exosomes* ») (Figure 13, (3)) (revu par [801]). Bien que les connaissances actuelles sur l'origine et les fonctions des ApoMVs et des ApoExos soient encore limitées, plusieurs aspects amènent à penser qu'ils seraient d'importants messagers des cellules apoptotiques (revu par [801]).

## 6.2.2. Autres vésicules et particules extracellulaires

Bien que les EXOs ([section 6.2.1.1.](#)), les MVs ([section 6.2.1.2.](#)) et les ApoBDs ([section 6.2.1.3.](#)) semblent être les EVs les plus étudiées, il existe d'autres EVs et particules connues et/ou récemment découvertes. [802]. Par exemple, les **exomères** (Figure 13, (1)) sont définies comme des structures non membraneuses d'environ 35 nm de diamètre [803-805] et revu par [806]. Cette absence de membrane laisse d'ailleurs quelques hésitations quant à la nomination de ces structures ; certains auteurs les qualifient d'EVs, tandis que d'autres marquent la différence en les classant parmi les « particules » extracellulaires [807]. D'autres

## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités

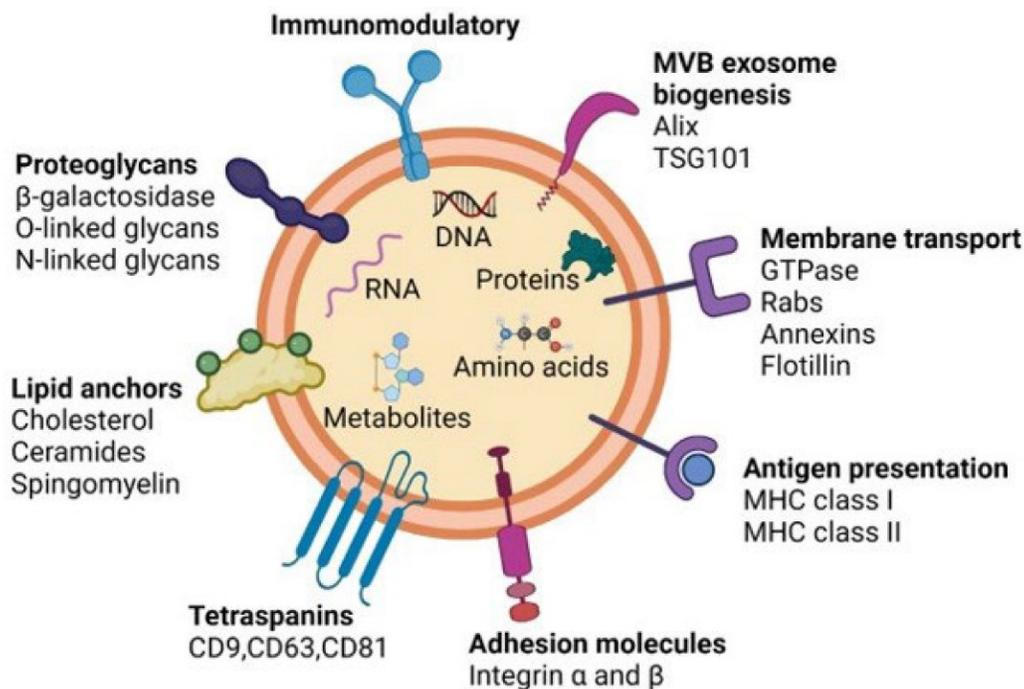
travaux ont découvert des organites en forme d'anneaux, appelés « **migrasomes** » (Figure 13, (6)), dont la taille est comprise entre 500 nm et 3000 nm de diamètre [808]. Ces grandes EVs dérivent des fibres de rétraction (longues structures tubulaires, libérées par différents types de cellules migrantes) et sont formées lors du processus de « migracytose » [809, 810] et revu par [767]. Par ailleurs, étant donné leur importance grandissante en recherche, il convient de préciser que d'autres sous-ensembles d'EVs peuvent aussi être produits, tels que les **grands oncosomes** (Figure 13, (8)) [811] (et revu par [784]) et les **sphèresomes** [812]. Bien que les grands oncosomes partagent des similitudes avec les MVs (en termes de biogénèse), ils présentent tout de même des caractéristiques uniques permettant de les distinguer. L'exemple le plus connu est leur production spécifique par les cellules cancéreuses [811]. Les sphèresomes sont quant à eux des EVs de 40 à 125 nm de diamètre, et leur biogénèse semble bien distincte de celle des EXOs et des MVs. Brièvement, ces vésicules seraient libérées dans l'espace extracellulaire sous forme de clusters enveloppés par des sphères multivésiculaires (grandes sphères dotées d'une membrane bicouche lipidique de 0,5 à 1,5  $\mu\text{m}$  de diamètre), revu par [813]. Finalement, dans les travaux récents de Zhang et *al.*, une autre catégorie de particules a été mise en évidence : les **supermères** (« surnageant d'exomères ») [814]. Les auteurs ont d'ailleurs précisé que la composition en protéines et en acides nucléiques des supermères était bien distincte de celle des exomères et des autres EVs, et que ces nouvelles particules semblaient contenir de multiples cargaisons impliquées dans diverses maladies chroniques [814].

### 6.2.3. Nomenclature

En raison d'un chevauchement important de la taille des EVs, de similitudes dans leur composition ([section 6.3.](#)) et d'un manque actuel de marqueurs spécifiques, il est difficile de réellement attribuer chaque EV à l'une des voies de la biogénèse, à moins que leur libération ne soit visualisée en direct par des techniques d'imagerie [736, 757]. Pour ces raisons, et afin d'éviter des confusions sur la nomenclature des EVs, la société ISEV (énoncée précédemment) recommande d'utiliser le terme plus large de « Vésicules Extracellulaires (EVs) » à moins que la biogénèse des vésicules ne soit clairement démontrée [736]. Par ailleurs, de nombreux sous-types d'EVs spécialisées ont également été décrits (revu par [815]). La société ISEV a ainsi précisé que ces sous-types peuvent être identifiés selon leurs caractéristiques physiques, telles que la taille (« petites EVs » (< 100 nm ou < 200 nm) ; « moyennes/grandes EVs » (> 200 nm) [736]), la densité (faible, moyenne, ou élevée), la composition biochimique (validation de la présence de certains marqueurs protéiques, tels que CD63, CD81, et l'Annexine), et/ou la description des conditions d'obtention des EVs ou des cellules dont elles sont issues [736].

### 6.3. Composition des EVs

Bien qu'à l'heure actuelle il soit toujours difficile d'identifier des marqueurs uniques pour des biotypes d'EVs précis (revu par [816]), divers composants associés aux EVs sont bien documentés et peuvent être utilisés pour définir les sous-types d'EVs étudiés. L'étude de ces composants est cruciale en recherche car la nature et l'abondance des cargaisons d'EVs sont spécifiques au type de la cellule sécrétrice et peuvent être influencées par différents facteurs. Parmi ceux-ci ont notamment été identifiés les mécanismes moléculaires qui permettent la biogénèse des EVs ([section 6.2.](#)) et surtout l'état physiologique ou pathologique des cellules dont sont issues les vésicules (revu par [784]). Pour ces raisons, les cargaisons des EVs ne sont pas un simple reflet de la composition des cellules donneuses, mais représentent aussi le résultat des mécanismes de tri régulés ([section 6.4.](#)) qui permettraient de « sélectionner » les molécules destinées à être incluses/exclues dans le message cellulaire que les EVs délivrent [817]. Ainsi, le consensus actuel est que la cargaison des EVs est très hétérogène et caractérisée par une combinaison variée de **protéines**, de **lipides**, et d'**acides nucléiques** (Figure 16) (revu par [765, 818]).



**Figure 16.** Aperçu de la composition générale des vésicules extracellulaires [819]

Les principaux composants des vésicules extracellulaires sont les protéines, les acides nucléiques et les lipides. Toutefois, étant donné que leur biogénèse diffère, des variations dans leur composition peuvent être observées.

### 6.3.1. Les protéines

Les protéines couramment identifiées dans les EVs comprennent des protéines du **cytosquelette**, des protéines du **cytosol**, des protéines de la **membrane plasmique**, des protéines de **choc thermique**, et des protéines qui s'associent aux **radeaux lipidiques** (notamment les protéines qui sont ancrées au glycosylphosphatidylinositol et la flotilline) [820-822] et revu par [765]. Auparavant spécifiques des EXOs, il est maintenant admis que les tétraspanines (telles que CD9, CD63, CD81 et CD82) sont aussi présentes dans les MVs et les ApoBDs [820, 823]. Plus précisément, les **tétraspanines** CD9 et CD81 font actuellement partie des 200 protéines d'EVs les plus souvent identifiées [824]. Chez le parasite *Trichomonas vaginalis*, les tétraspanines semblent d'ailleurs d'une grande importance puisqu'il est possible que leur présence dans les EVs du protozoaire favorise l'adhérence et la colonisation du tissu urogénital [825]. À l'inverse, des travaux récents ont montré que ces protéines étaient absentes dans les EVs du parasite *Entamoeba histolytica* [826].

La membrane des EVs contient aussi diverses **protéines glycosylées** ayant un rôle clé dans l'activation des voies de signalisation intracellulaire, et par conséquent, dans la délivrance des cargaisons des EVs [827, 828] et revu par [829]. Plus précisément, des protéines de liaison aux glycanes qui définissent les cellules cibles des EVs ont été identifiées dans divers travaux [830] et revu par [765]. Un exemple bien connu est la sélectine P de type C (CD62), présente à la surface des EVs dérivées de plaquettes activées, qui permet aux EVs de cibler les cellules par le ligand classique de CD62 : le PSGL-1 (« *P-Selectin Glycoprotein Ligand 1* ») [831] et revu par [829].

Par ailleurs, il arrive que certaines protéines soient enrichies dans une sous-population d'EVs par rapport à une autre [832, 833]. Par exemple, en raison de leur origine spécifique, les EXOs sont enrichis en protéines endosomales, telles que les **Rab**, les **GTPases**, les protéines **SNAREs** (« *Soluble N-éthylmaleimide sensitive factor Attachment protein Receptor* »), les **annexines** et des protéines impliquées dans la biogenèse des MVBs (telles que **Alix** et **Tsg101**) (revu par [834]). Les **argonautes** (AGO) (d'importantes protéines de traitement des miARNs) et des protéines de **liaison à l'ARN** (« RBP », pour « *RNA-binding protein* »), aux rôles potentiels dans le tri de l'ARN ([section 6.4.](#)), sont aussi fortement présentes dans les EXOs [835-837].

Plus généralement, les protéines le plus souvent enrichies dans les sous-populations d'EVs et utilisées comme **marqueurs de détection** sont les protéines de choc thermique, la famille des protéines « 14-3-3 », les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), la protéine Tsg101, la protéine Alix et les tétraspanines énoncées précédemment [820, 823]. Finalement, bien que l'identification de marqueurs



## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités

spécifiques à chaque type d'EVs soit difficile, il semblerait que l'annexine 1 constitue un marqueur spécifique des MVs [838].

### 6.3.2. Les acides nucléiques

#### 6.3.2.1. L'acide ribonucléique (ARN)

Les EVs contiennent également une **grande variété d'ARNs**, tels que des ARNs messagers (ARNm), des micro-ARNs (miARNs), des ARNs structurels, des fragments d'ARNs de transfert (ARNt), des petits ARNs interférents, et des ARNs de voûte [817, 839-842]. Leur découverte a constitué une avancée majeure dans la caractérisation des EVs car elle a permis de comprendre que ces acides ribonucléiques peuvent être transmis de manière fonctionnelle aux cellules cibles et y affecter la synthèse des protéines [817, 843, 844] et revu par [845]. De plus, de nombreux ARNs d'EVs sont enrichis (voire exclusivement présents) dans certaines EVs, suggérant qu'ils y sont sélectivement intégrés [817, 840, 846, 847] et revu par [845]. À titre d'exemple, des travaux ont montré que les EXOs de cellules métastatiques ont un enrichissement en miARNs plus élevé que les EXOs de cellules saines, soutenant que les cellules cancéreuses profitent des mécanismes de tri régulés [848]. Par ailleurs, bien que l'ARNm des mammifères ait une taille d'environ 400 à 12 000 nucléotides (nt) [849], des études ont montré que l'ARNm des EVs a généralement une taille inférieure à 700 nt et qu'il peut s'agir de sections fragmentées d'ARNm et non de transcrits de pleine longueur [850]. Ces observations ont d'abord été expliquées par le fait que les EVs étaient enrichies en ARNm codant pour des protéines très courtes, mais les travaux de Frith et *al.* [851] ont apporté des preuves contraires. En effet, l'analyse des tailles d'ARNs de diverses catégories de protéines d'EVs a révélé que la longueur moyenne des transcrits était de 2 100 nt, autant pour les grosses protéines (> 300 acides aminés) que pour les petites (< 100 acides aminés), indiquant que les EVs seraient donc enrichies en ARNm tronqués [851].

Plus généralement, les miARNs des EVs ont souvent été étudiés pour mieux comprendre le cancer (revu par [829]) et ils sont maintenant connus pour y avoir divers rôles clés (notamment dans la progression de la maladie et dans le développement des métastases et des phénotypes tumoraux agressifs). Les miARNs sont également connus pour être des agents de silençage génique des ARNm complémentaires et pour jouer un rôle clé dans la régulation de l'expression génique (revu par [852, 853]). Ainsi, grâce à ces informations et à leur stabilité dans les fluides corporels, les miARNs des EVs en circulation sont actuellement considérés comme des biomarqueurs potentiels du cancer (revu par [853]). Plus largement, étant donné que de nombreux types d'ARNs d'EVs ont été associés à diverses pathologies (et qu'ils ont tous un rôle +/- important



## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités

dans la régulation génique), les différents ARNs des EVs constituent tous des biomarqueurs potentiels importants pour la gestion de diverses maladies (revu par [829]).

### 6.3.2.2. L'acide désoxyribonucléique (ADN)

Contrairement à l'ARN, la présence d'ADN dans les EVs a fait l'objet de moins d'études, malgré le concept précoce de sa présence dans les ApoBDs [854]. À ce jour, il existe peu de travaux qui ciblent précisément l'ADN des EVs ; la plupart généralisant leur intérêt à l'**ADN acellulaire circulant** (« cfDNA » pour « *circulating cell-free DNA* »), malgré le fait que l'ADN des EVs constitue une entité bien distincte (revu par [855, 856]). De plus, même si divers rapports suggèrent que la majorité du cfADN est surtout associé aux EVs de grande taille (telles que les MVs et les ApoBDs), l'analyse comparative récente entre l'ADN extrait du plasma sanguin et celui extrait des EXOs plasmatiques a démontré que plus de 90% du cfDNA était associé aux EXOs, soit aux EVs de petite taille [857].

Plus généralement, les différents travaux réalisés sur l'ADN des EVs (surtout depuis les années 2010) ont permis de détecter la présence de **différents types d'ADN** (autre que le cfDNA) associés aux EVs [858], tels que l'ADN simple brin (ADNsb) [859], l'ADN double brin (ADNdb) [860, 861] et l'ADN mitochondrial (ADNmt) [862]. De plus, en accord avec les propos précédents selon lesquels les cargaisons des EVs sont le reflet des cellules donneuses et des mécanismes de tri régulés, des études ont montré que (i) les EVs dérivées de tumeurs contiennent de l'ADN génomique (ADNg) et de l'ADN complémentaire (ADNc) qui reflètent le statut génétique de la tumeur [859], et que (ii) la teneur en ADNg diffère selon les catégories et les sous-types d'EVs (validant ainsi le possible conditionnement sélectif de l'ADN dans les EVs) [863, 864] ([section 6.4.](#)). En complément, d'autres travaux ont confirmé la présence de fragments d'ADNdb (d'une taille variant de 100 pb à 20 kpb) dans les EXOs et ont montré qu'ils pouvaient transporter des génomes entiers de cellules parentales ; soutenant le potentiel de l'ADN des EVs à être un biomarqueur [860, 865].

Dans le même contexte, plusieurs études ont montré que certains types d'EVs transportaient un ADN intra-vésiculaire capable de résister à la DNase (notamment en raison d'une protection par une membrane (bicouche phospholipidique)) et dont le statut mutationnel était comparable à celui des cellules d'origine (revu par [781]). Finalement, plusieurs travaux ont porté leur intérêt exclusivement sur l'ADN intra-vésiculaire, en effectuant une digestion à la DNase afin de détruire l'ADN extra-vésiculaire potentiellement contaminant [861, 866, 867]. Cependant, dans leurs échantillons d'EXOs, Cai et *al.*, ont soutenu n'avoir trouvé aucun ADN externe sensible à la DNase [868], soulevant plusieurs questions quant à l'existence et l'association externe



## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités

potentielle de l'ADN avec la surface des EVs. Toutefois, diverses preuves ont permis d'apporter des réponses et de valider la présence d'un ADN externe associé aux EVs, et dont le rôle s'avérait fondamental dans l'absorption des EVs ou dans l'activation de réponses immunitaires [858, 869, 870].

### 6.3.3. Les lipides

Les premières recherches menées sur la composition lipidique des EVs datent de plus de 30 ans et ont permis de découvrir la présence de différents lipides, avec une teneur particulièrement élevée en cholestérol et en acides gras saturés [871, 872]. La forte teneur en cholestérol provient notamment des MVBs sécrétoires, qui comme décrits précédemment, se distinguent des MBVs dégradatifs en partie par la richesse de ce lipide [772] ([section 6.2.1.1.](#)). Même si peu de travaux ont succédé ces découvertes, il a été démontré que les EVs peuvent aussi être enrichies en **sphingomyéline**, **PS**, **ganglioside GM3**, et en **céramides** [774, 873, 874]. Étonnement, l'acide lysobisphosphatidique (« LBPA », pour « *Lysobisphosphatidic acid* », un lipide présent dans les ILVs des lysosomes impliqués dans la biogénèse des EXOs [875]) n'était que faiblement présent [822, 874]; supposant que le conditionnement sélectif des composants des EVs semble également s'appliquer aux lipides. D'autres travaux ont complété ces informations en montrant que la composition lipidique des EVs pouvait être représentative des cellules d'origines, mais aussi très hétérogène selon le type d'EVs isolées (revu par [876]). Finalement, il semblerait que l'externalisation de la PS soit l'une des principales caractéristiques des MVs [788] et revu par [789], et que la formation de ces vésicules soit dépendante de la teneur en cholestérol [877].

### 6.3.4. Bases de données

Pour faciliter l'accès aux connaissances acquises sur la composition des EVs, des bases de données ont été développées, telles qu'[ExoCarta](#) [878] (qui a finalement été intégrée à une base de données plus complète : [Vesiclepedia](#) [879, 880]), [EVpedia](#) [824], [ExoBCD](#) [881], [EV-TRACK](#) [882, 883] et [miRandola](#) [884]. Ces bases de données sont des ressources clés, régulièrement mises à jour et qui contiennent une vaste quantité d'informations sur les protéines, les lipides et/ou les ARNs. La base de données EVpedia a également l'avantage de regrouper des informations sur les EVs des procaryotes et des eucaryotes. Toutefois, comme mentionné précédemment, les études de la composition des EVs se sont jusqu'à présent essentiellement intéressées aux protéines, aux lipides et aux ARNs, laissant l'ADN associé aux EVs largement inexploré. Par conséquent, ce « manque » d'intérêt se fait fortement ressentir à travers les différentes bases de données

## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités

énoncées ci-avant, puisqu'aucune information concernant l'ADN n'y est disponible. A quand la mise à jour ?! Justement, une nouvelle base de données spécialisée sur l'ADN associé aux EVs d'échantillons de biopsie liquide humaine a récemment été créée. Il s'agit d'[EV-ADD](#) [885].

### 6.4. Tris régulés des cargaisons d'EVs

Comme évoqué précédemment, les cargaisons des EVs sont le reflet de la composition des cellules d'origine, et le résultat de mécanismes de tri hautement régulés, qui permettraient de « sélectionner » les molécules destinées à être incluses/exclues dans le message cellulaire [817]. Bien que la complexité de ces mécanismes ne soit que partiellement démêlée, il est tout de même reconnu qu'ils nécessitent l'implication minutieuse de différentes molécules capables d'envoyer des cargaisons précises et particulières dans les EVs.

#### 6.4.1. Tri des cargaisons exosomales

Une revue récente [813] a proposé que les mécanismes de tri des EXOs (notamment le tri des protéines) pouvaient être regroupés en quatre grandes catégories : **(i) la machinerie de tri liée à l'ESCRT** (constituée de divers composants clés des voies de recyclage endocyttaire et qui participent également à la biogénèse des EXOs ([section 6.2.1.1.](#)) [886] et revu par [887]), avec en particulier l'implication du complexe ALIX-ESCRT qui permet l'intégration du syndécan dans les EXOs [888, 889]) ; **(ii) le tri lié aux protéines membranaires**, qui est notamment sous l'influence des protéines de la famille des tétraspanines (telles que CD81 et CD9 qui seraient impliquées dans la sélection de la protéine Rac (GTPase) et de la métalloprotéase CD10, respectivement [890, 891]) ; **(iii) le tri lié aux lipides** (avec notamment le rôle clé des radeaux lipidiques de la membrane des endosomes dans le recrutement de diverses protéines dans les ILVs, telles que les protéines ancrées au glycosylphosphatidylinositol (GPI) [770] ; ou encore le rôle des céramides dans le tri d'AGO2 et des miARNs [774, 892]) ; et **(iv) les autres mécanismes de tri** (tels que l'implication de la ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène (« hnRNP » pour « *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* ») et de la protéine de liaison à l'ARN, qui seraient également impliquées dans le tri des miARNs, revu par [813]).

D'autres part, l'intégration des protéines cytosoliques dans les ILVs peut résulter d'un co-tri avec d'autres protéines, telles que la protéine chaperonne de choc thermique de 70 kDa (« HSP70 » pour « *Heat Shock Protein 70* ») et la protéine apparentée de choc thermique de 71 kDa (« HSC71 » pour « *Heat Shock Cognate Protein 71* »), retrouvées dans les EXOs dérivés de la plupart des cellules [756, 893]. Certaines protéines

## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités

cytosoliques modifiées par ubiquitylation [894] ou farnésylation [895] seraient aussi acheminées spécifiquement dans les ILVs et les EXOs, mais les détails des mécanismes sous-jacents restent non connus.

Concernant le **tri de l'ADN** dans les EXOs, bien que les connaissances à ce sujet aient évolué au cours des dernières années, il existe tout de même peu d'informations claires sur l'origine de l'ADN exosomal et sur la façon dont celui-ci est intégré dans ces vésicules. Une des hypothèses proposées est que le chargement de l'ADNg dans les EXOs serait en lien avec leur biogénèse. Plus précisément, il serait dû à la présence de micronoyaux (petites structures contenant de l'ADNg localisé séparément du noyau principal de la cellule (revu par [896])) qui, lors de leur dégradation, déverseraient leur contenu (autrement dit, l'ADNg) dans le cytoplasme, qui serait ensuite acheminé vers les MVBs et finalement intégré dans les EXOs (revu par [897]).

D'autres faits intéressants concernent le recrutement des acides nucléiques, et plus précisément des ARNs. Comme énoncé brièvement ci-dessus, le recrutement des miARNs peut être lié aux lipides ou à différentes protéines, mais de nombreuses autres machineries de **tri de l'ARN** ont également été proposées. Ainsi, il a été suggéré que le sous-complexe ESCRT-II puisse agir comme un complexe de liaison à l'ARN [898], que les processus de silençage de l'ARN sont médiés par le complexe de silençage induit par les miARNs (« miRISC » pour « *miRNA-induced silencing complex* ») et la protéine AGO2 [899], que les microdomaines riches en tétraspanines recrutent les protéines de liaison à l'ARN dans les sous-domaines membranaires [890], et plus généralement, que les miARNs sont triés de manière différentielle et réglementée dans les EXOs, en fonction des caractéristiques de leur séquence (notamment la présence de séquences spécifiques appelées « EXOmotifs ») [837]. À ces propositions s'ajoute aussi la description récente de nouveaux régulateurs de tri, qui impliqueraient notamment une voie de signalisation des protéines kinases [900], la protéine de liaison à la boîte Y 1 (« YBX1 » pour « *Y box binding protein 1* ») [835], et la protéine de voûte majeure (« MVP » pour « *Major Vault Protein* ») [901].

Plus généralement, bien que la compréhension détaillée du recrutement des ARNs ait suscité un grand intérêt de la part des chercheurs, ces derniers ont été confrontés à divers défis techniques qui ont fait l'objet de plusieurs débats et dont les sujets ont même été discutés lors d'un atelier spécial organisé par l'ISEV, « *l'ARN associé au EVs : y a-t-il un but ?* ». Cet événement a ainsi permis de démêler certains aspects et un rapport des discussions a proposé quelques considérations importantes pour les futures études, en liens avec l'ARN des EVs (revu par [902]).

Finalement, il apparaît évident que les mécanismes de tri sont complexes et nombreux et que l'hétérogénéité des cargaisons EXOs semble être le résultat d'un ensemble de ceux-ci. Plus précisément, l'équilibre de ces



## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités

voies peut varier au cours du processus de différenciation ou de maturation de certaines cellules [903, 904] et, par conséquent, les mécanismes de tri peuvent agir de manière concomitante ou séquentielle ; permettant ainsi le recrutement sélectif et étalé dans le temps des cargaisons d'EXOs (revu par [768]).

### 6.4.2. Tri des cargaisons microvésiculaires

Grâce aux différentes connaissances acquises sur les régulateurs du trafic membranaire endocyttaire et sur la biogenèse des MVs ([section 6.2.1.2.](#)), il est également possible de mieux comprendre certaines caractéristiques en lien avec le mouvement, le tri et l'enrichissement de la cargaison des MVs. Par exemple, il a été découvert qu'en plus de son implication dans la libération des MVs, l'**ARF6** jouerait également un rôle clé dans l'enrichissement sélectif de la **cargaison en protéines** [905], tel que l'intégration du syndécan dans les MVs [906, 907]. Par ailleurs, même si le rôle exact des protéines ESCRT dans le recrutement de la cargaison des MVs reste mal connu, une sous-population de MVs (dont la formation dépend du complexe **ESCRT** [793]) suggère l'existence d'un mécanisme de tri de cargaison lié à l'ESCRT, commun et partagé entre les EXOs et les petites MVs (revu par [908]). Dans ce contexte, des travaux antérieurs ont démontré que l'intégration des protéines et des lipides semblaient se faire essentiellement lors de la courbure de la membrane, avec notamment l'intervention du complexe ESCRT (revu par [765]). Ce complexe favorisait la région du cou du bourgeon et se désintégrerait une fois le pincement de la vésicule effectué [909-911] et revu par [912]. Les constituants de la membrane seraient +/- libres de se déplacer latéralement, et leur accumulation dans des régions énergétiquement favorables permettrait la courbure membranaire et l'intégration de protéines [913, 914] et de lipides [915] (et revu par [916]) dans les futures MVs. Et d'après certains auteurs, ce mécanisme serait non spécifique (il aurait lieu sur tous les types membranaires et s'appliquerait donc aux EVs formées par bourgeonnement de la membrane plasmique (MV) mais également dans les MVB (EXOs)), et permettrait l'intégration de composants structurels partagés entre les types d'EVs (ce qui reprend la suggestion énoncée précédemment) (revu par [765]).

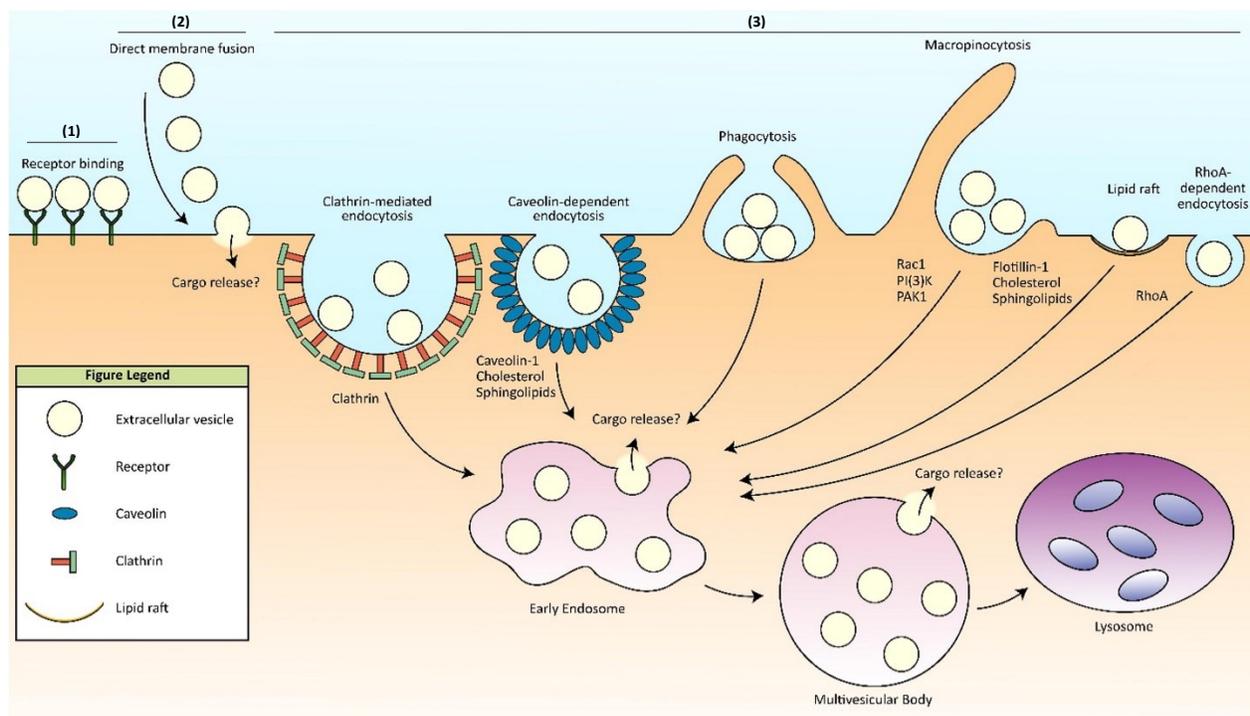
Pour ce qui est de la cargaison en acides nucléiques, bien que celle-ci soit relativement bien documentée en termes de composition, leurs mécanismes de tri restent à ce jour que partiellement compris. En effet, ce n'est que récemment que la compréhension de l'intégration des miARNs dans les MVs a commencé à être élucidée. Une étude a ainsi proposé que le **tri des miARNs** dans les MVs serait en lien avec la **machinerie endocyttaire**. Plus précisément, il existerait une voie de transport reliant l'exportine-5 (le récepteur de transport indispensable pour les micro-ARNs précurseurs (pré-miARN)) aux voies de trafic régulées par



l'ARF6 [917]. À la sortie du noyau, l'exportine-5 et la cargaison de pré-miARNs seraient ainsi acheminées vers un des complexes de trafic d'ARF6 pour être incorporées dans des MVs excrétées (revu par [908]).

D'autres travaux ont quant à eux proposé un lien entre la **phosphorylation de la cavéoline-1** (protéine membranaire impliquée dans le phénomène d'endocytose) et l'incorporation des miARNs dans les MVs, en particulier dans le cas d'un stress oxydatif [918], ou encore que l'**accumulation de l'ARNm** pouvait être favorisé grâce à la présence d'une séquence spécifique (formant une tige-boucle de 25 nucléotides) dans sa région 3' UTR [919]. Une voie de transport des miARNs liée à une **protéine de liaison à l'ARN** a également été découverte et a de nouveau souligné l'existence de mécanismes communs et partagés entre les EXOs et les MVs. Finalement, les mécanismes de **tri de l'ADN** sont moins clairs, mais ils semblent en lien avec la formation de fragments nucléaires cytosoliques (**micronoyaux**) exportés dans les MVs [920].

## 6.5. Interactions EVs-cellules réceptrices



**Figure 17.** Mécanismes par lesquels les EVs interagissent avec les cellules [921]

Une fois que les vésicules extracellulaires atteignent leur cellule cible, elles peuvent déclencher une signalisation en interagissant directement avec les récepteurs membranaires de la cellule (1), ou pénétrer à l'intérieur de celle-ci par fusion (2) ou par différents mécanismes d'internalisation (3).

## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités

D'un point de vue mécanistique, la capacité des EVs à interagir avec les cellules réceptrices et à transmettre leur contenu est primordiale pour assurer leurs fonctions dans les processus physiologiques et pathologiques des cellules cibles. Bien que les mécanismes précis qui interviennent dans les interactions EVs-cellules réceptrices ne soient pas encore tous bien élucidés, certains processus ont pu être identifiés. De plus, ces mécanismes sont complexes et semblent dépendre de l'origine des EVs, ainsi que de celle des cellules réceptrices (revu par [922]). Par ailleurs, bien que leur étude se soit majoritairement effectuée dans le cas des EXOs, les processus généraux de transfert et de trafic intercellulaire des différents types et sous-types d'EVs semblent toutefois susceptibles d'être partagés (revu par [768]). Ainsi, les EVs peuvent **(i) se lier** à la surface de la cellule réceptrice, **(ii) fusionner** avec la membrane de la cellule réceptrice, ou **(iii) être internalisées** par diverses voies (Figure 17) (revu par [768, 921]).

Plus précisément, lorsque les EVs se lient à la cellule réceptrice (Figure 17, (1)), la réussite de leur liaison est déterminée par des interactions spécifiques entre des récepteurs membranaires de la cellule réceptrice et des protéines enrichies présentes à la surface des EVs. Pour ces raisons, des travaux ont montré que les EXOs issus des lymphocytes B semblaient se lier sélectivement aux cellules dendritiques folliculaires dans les follicules lymphoïde [923], et que les EVs libérées par une lignée de cellules épithéliales intestinales humaines interagissaient préférentiellement avec les cellules dendritiques [924]. Ceci était notamment possible grâce aux interactions moléculaires spécifiques impliquant des protéines, des lipides ou des sucres, présents à la surface des EVs, tel que mentionné précédemment. Parmi ces protéines, les tétraspanines sont également connues pour influencer les fonctions des EVs ([section 6.5.](#)) en agissant au niveau du ciblage cellulaire (impact du chargement sélectif des composants des EVs), ou en perturbant la communication intercellulaire (*via* la signalisation des récepteurs de surface cellulaire) [890] et revu par [769]. La taille des EVs semble également influencer leur reconnaissance et leur interaction avec les cellules cibles, et peut favoriser d'autres processus que la liaison à des récepteurs, tels que l'**endocytose** (Figure 17, (3)) (revu par [768, 802]). Cette dernière peut d'ailleurs être médiée par différents complexes (protéiques ou lipidiques), tels que la **clathrine**, la **cavéoline**, et les **radeaux lipidiques**, ou s'exercer *via* le principe de **phagocytose**, ou de **macropinocytose**. Bien qu'ils se déroulent différemment, l'ensemble de ces processus permet aux EVs d'être internalisées dans la cellule réceptrice et de délivrer leur cargaison dans le cytosol de la cellule. À titre d'exemple, des travaux récents ont démontré que l'internalisation des EVs du parasite *Trichomonas vaginalis* se ferait par une endocytose dépendante des calvéoles et des radeaux lipidiques [925]. Les EVs dérivées de cellules de phéochromocytome (tumeur des glandes surrénales) pénétreraient quant à elles dans les cellules hôtes par macropinocytose et par une endocytose médiée par la clathrine [926]. Toutefois, au cours des

## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités

processus d'endocytose, il semblerait que les EVs doivent échapper à la voie endo-lysosomale, afin d'empêcher la dégradation lysosomale de leur cargaison. Cette procédure d'évitement a d'ailleurs été rapportée comme un facteur limitant pour la délivrance d'ARNs médiée par les nanoparticules lipidiques, dans la recherche des nouveaux systèmes d'administration des médicaments (revu par [921]). Pour ces raisons, la fusion directe des EVs avec la membrane plasmique de la cellule réceptrice (Figure 17, (2)) serait probablement la méthode la plus efficace pour assurer la transmission de la cargaison des EVs.

Finalement, même si de nombreux travaux rapportent l'internalisation des EVs par les cellules réceptrices, d'ordre général, il est souvent difficile d'en connaître le processus exact, notamment en raison de la diversité physiologique et évolutive des EVs et de leur cellules cibles (revu par [922]). Pour tenter de pallier ces difficultés, les travaux récents de Verweij et *al.*, ont élaboré un modèle de poisson zèbre *in vivo* basé sur la fluorescence afin de suivre le devenir des EVs dans le système vasculaire de l'embryon en développement [927]. Leur modèle a ainsi permis de démontrer l'absorption sélective des EVs et leur capacité à communiquer entre les cellules, et à fournir un soutien trophique au cours du développement. Cependant, même si ce modèle s'est avéré utile pour suivre les EVs *in vivo*, il n'a pas permis de différencier les populations d'EVs ; soulignant de nouveau la difficulté évoquée précédemment. D'autres études portant sur l'internalisation des EVs provenant d'organismes et de types de tissus variés sont donc nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes précis impliqués dans les interactions EVs-cellules réceptrices de chacun d'entre eux.

### 6.6. Principales fonctions des EVs

Dans les années 80, la première et principale fonction décrite des EXOs était que leur sécrétion par les réticulocytes servait à éradiquer les molécules obsolètes [743, 928]. Toutefois, les études qui ont suivi ont permis de révéler diverses fonctions associées aux EXOs (et plus largement aux EVs), en particulier leur rôle clés dans la **communication intercellulaire**, le maintien de l'**homéostasie cellulaire** et le **transfert de biomolécules fonctionnelles** [742, 929, 930] et revu par [765, 931]. A titre d'exemple, il a été proposé que les EVs issues de cellules nerveuses participent à la formation de la myéline [932], à la croissance des neurites [933] et à la survie neuronale [933]. Par ailleurs, depuis la découverte des EVs dans la plupart des fluides biologiques et depuis l'acquisition de données cruciales sur leur riche composition, l'intérêt des scientifiques et des médecins pour l'étude des fonctions associées aux EVs n'a cessé d'augmenter. Ainsi, les EVs sont maintenant connues pour avoir d'autres fonctions, telles que la **signalisation**, la **modulation du métabolisme et des réponses immunitaires**, et la **propagation de maladies** [934] et revu par [818,

## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités

935]. Pour faire suite aux exemples précédents, des travaux ont ainsi montré chez des patients souffrant de maladies neurologiques, que (i) les changements physiopathologiques dus à la maladie modifiaient le chargement associé aux cargaisons d'EVs ([section 6.3.](#)) et, par conséquent, influençaient leurs fonctions, et que (ii) les EVs issues de cellules nerveuses « malades » pouvaient également participer à la diffusion de la maladie, *via* la transmission de protéines pathogènes (revu par [766]). Ce dernier point amène justement à un aspect important qui est que bien que les fonctions exercées par les EVs soient toutes autant importantes les unes que les autres, la transmission de molécules (plus précisément de récepteurs et/ou d'information génétique) est une fonction des EVs qui suscite un intérêt grandissant, en raison des conséquences potentielles engendrées, notamment dans un contexte pathologique.

Le « **transfert horizontal** » d'acides nucléiques par l'intermédiaire des EVs a d'ailleurs été rapidement considéré comme un nouveau mécanisme d'échange entre les cellules [817] et a souligné la complexité par laquelle les cellules peuvent communiquer. Plusieurs études ont ainsi complété les précédentes et montré le rôle des EVs dans la progression tumorale, notamment grâce à la livraison de différents composants [859, 934], tels que de l'ARN [846]. Dans le cas des maladies infectieuses, plusieurs travaux ont démontré que les agents pathogènes avaient eux aussi la capacité d'exploiter les EVs pour transférer des molécules spécifiques aux cellules hôtes, afin d'induire une évasion immunitaire et d'assurer leur propagation (revu par [936]). Plus précisément, le transfert horizontal d'ARNs *via* les EVs a été mis en évidence chez des parasites, tels que des nématodes [937] et des protozoaires [938, 939], et les effets engendrés étaient bénéfiques pour les pathogènes (notamment la modulation de leur cycle de vie et/ou de l'immunité innée de leur hôte) [937-939] et revu par [940]. Bien que la plupart des travaux s'intéressant à ce nouveau concept se soient essentiellement concentrés sur les ARNs, le transfert horizontal de l'ADN des EVs a également été abordé et confirmé par divers travaux (revu par [897]). De plus, outre la capacité des EVs à transférer de l'ADN aux cellules réceptrices, il a également été démontré que l'ADN transféré pouvait entraîner une augmentation de la production de l'ARNm codant pour l'ADNg d'intérêt, ainsi que de l'expression des protéines [868]. La présence d'ADNmt dans les EVs et son transfert horizontal à d'autres cellules a ensuite été prouvé pour la première fois, et les résultats de l'étude ont amené les auteurs à émettre l'hypothèse selon laquelle son transfert pouvait potentiellement être impliqué dans certaines maladies dues à des altérations mitochondriales, telles que la maladie d'Alzheimer [862]. Par ailleurs, l'étude de l'ADNmt dans les EVs a également permis une autre découverte fortement intéressante (mais également préoccupante). Il s'agit de l'implication du transfert horizontal de l'ADNmt dans le développement de la résistance aux médicaments, dans le cancer du sein [941]. Ce phénomène a d'ailleurs été soutenu par différents travaux portant sur



## Chapitre 6. Les vésicules extracellulaires (EVs) : généralités

d'autres types de cancer [942-944], soulignant ainsi le potentiel des EVs à transférer la résistance aux médicaments. Dans le cas des maladies infectieuses, des découvertes toutes autant intéressantes ont été obtenues et ont complété les observations faites chez le cancer. Par exemple, chez les bactéries, la présence de gènes de résistance aux antibiotiques dans leurs vésicules et leur potentielle transmission ont été démontrées [945]. Chez *P. falciparum*, des travaux ont démontré que les EVs permettaient la communication et le transfert d'ADN entre les parasites, assurant ainsi la survie des parasites, auparavant sensibles aux médicaments [946]. Par ailleurs, même s'il ne s'agit pas d'ADN, il convient de préciser que des travaux ont montré que les EVs de *Trypanosoma brucei* permettent le transfert de la protéine associée à la résistance sérique (« protéine SRA », pour « *Serum Resistance-Associated protein* »), donnant ainsi la capacité au parasite d'échapper à la réponse immunitaire innée de l'hôte [947].

Par ailleurs, des travaux récents ont démontré que les EVs pouvaient également servir d'**enveloppe virale**, permettant ainsi le transport et la transmission d'un virus. Plus précisément, le parasite *Trichomonas vaginalis* peut héberger un virus à ARN endosymbiotique, le virus *Trichomonas vaginalis* (« TVV », pour « *Trichomonas vaginalis virus* »), qui modifie la cargaison des EVs du parasite et s'y loge à leur surface, altérant ainsi la réponse immunitaire de l'hôte lors des interactions EVs-cellules réceptrices [948, 949]. Comme nous le reverrons plus tard, ce phénomène a également été observé chez *Leishmania* [950].

Finalement, du fait de l'hétérogénéité globale des EVs, l'isolation et la caractérisation des sous-populations de ces vésicules sont d'une grande importance, notamment car les fonctions des EVs semblent étroitement liées à leur composition [951]. Ces raisons ont également amené les immunologistes à s'intéresser à l'utilisation potentielle des EVs en clinique (revu par [952, 953]), surtout pour leurs fonctions soupçonnées dans la détection précoce et le traitement des maladies (chapitre 7, [section 7.1.](#) et [section 7.2.](#)) [954, 955].





## Chapitre 7. Utilisation médicale des EVs et méthodes d'étude



[7.1. Potentiel diagnostic des EVs](#)

[7.2. Potentiel thérapeutique des EVs](#)

[7.3. Principales méthodes utilisées pour l'étude des EVs](#)



## 7.1. Potentiel diagnostique des EVs

Les EVs sont de plus en plus étudiées dans la recherche de **biomarqueurs** potentiels pour diverses maladies, en raison de leur « précieuse » cargaison ([section 6.3.](#) et Figure 16) (revu par [956-958]). En effet, en plus de transporter de nombreux composants, un des avantages des EVs qui en font de bons candidats pour la recherche de biomarqueurs est que, contrairement à diverses molécules solubles dans le sang (telles que les hormones et les cytokines), leur cargaison est protégée de la dégradation et reste intacte et fonctionnelle (revu par [829]). De plus, comme discuté précédemment, la présence d'EVs dans les fluides corporels (revu par [959]) permet l'obtention simple et non invasive de « biopsies liquides » (telles que l'urine (revu par [960]), la salive [961], le liquide céphalo-rachidien (LCR), le lavage broncho-alvéolaire (LBA) [962] et le sang [961]) contenant ces EVs ; ce qui constitue une alternative prometteuse aux biopsies régulières (revu par [757]). Par ailleurs, comme cela a aussi été évoqué précédemment, les changements physiopathologiques dus aux maladies peuvent modifier le chargement associé aux cargaisons d'EVs, et par conséquent, « *la compréhension des profils moléculaires des EVs peut aider à fournir une empreinte digitale pour la médecine de précision* » (revu par [829]).

Depuis les années 2000, la recherche de biomarqueurs de maladies utilisant des EVs a favorisé les dépôts de brevets et les essais cliniques, principalement dans le domaine de la biologie du cancer (revu par [741]). Dans ce cadre, un test diagnostique a d'ailleurs été approuvé par la [CLIA](#) (*Clinical Laboratory Improvement Amendments*). Il s'agit de la [plateforme ExoDx](#), qui permet, grâce à l'utilisation des EVs, de déterminer si les patients sont positifs pour des marqueurs spécifiques du cancer [963]. Bien que de nombreux travaux s'intéressent au cancer, les EVs ont également été étudiés en tant que biomarqueurs pour diverses autres maladies, telles que les maladies du cerveau (accident vasculaire cérébral) [964], du système nerveux central (revu par [965]), des poumons (asthme) [966], du foie (hépatite virale, alcoolique, médicamenteuse ou inflammatoire) (revu par [967]), des reins [968], ou des artères (athérosclérose) (revu par [969]). De même, l'analyse des EVs d'échantillons sanguins de patients atteints de la maladie de Chagas ont révélé la présence d'antigène de *Trypanosoma cruzi* dans les vésicules [970].

Finalement, en termes d'applications, il existe deux principales manières d'utiliser les EVs comme biomarqueurs de maladies. La première, consiste en une utilisation des EVs comme marqueurs pour le « **diagnostic** », pour par exemple déterminer si le patient est atteint d'une maladie et si oui laquelle. La seconde, repose sur l'utilisation des EVs dans le cadre d'un « **pronostic** », pour aider à déterminer et/ou à suivre la progression d'une maladie (revu par [741]).

## 7.2. Potentiel thérapeutique des EVs

Le potentiel des EVs pour une utilisation thérapeutique est relativement vaste et constitue un domaine en pleine croissance. Diverses stratégies ont été proposées, dont certaines ont montré des résultats prometteurs chez les animaux, donnant ainsi l'espoir de les utiliser chez l'humain (revu par [971]). Des essais cliniques utilisant les EVs à des fins thérapeutiques pour diverses pathologies sont d'ailleurs en cours et répertoriées dans la base de données « [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) ». Plus précisément, le potentiel thérapeutique des EVs peut être étudié à travers quatre grandes approches : (i) l'utilisation des EVs endogènes pour leurs avantages thérapeutiques « innés » ([section 7.2.1.](#)), (ii) les EVs en tant que cible thérapeutique ([section 7.2.2.](#)), (iii) les EVs en tant que nanoporteurs ([section 7.2.3.](#)), et (iv) les EVs en tant que vaccins ([section 7.2.4.](#)).

### 7.2.1. Avantages thérapeutiques « innés » des EVs

Les EVs issues de **cellules souches mésenchymateuses (CSMs)** sont connues pour détenir naturellement une extraordinaire capacité à induire la régénération de nombreux tissus, tels que les os et le cartilage [972], le tissu cardiaque [973], le tissu rénal [974], et le tissu hépatique [975]. De plus, d'autres types d'EVs seraient capables de moduler les réponses immunitaires afin d'engendrer indirectement une régénération tissulaire [976], et/ou de favoriser la cicatrisation [977]. Étant donné le nombre important de rapports démontrant les effets régénérants des EVs dérivés de CSMs, les EVs sont considérées par plusieurs groupes comme des outils thérapeutiques ayant des capacités de régénération égales aux thérapies cellulaires actuelles [974]. Cette approche éviterait ainsi de faire face à différentes difficultés qui accompagnent les thérapies basées sur l'utilisation directe de CSMs, telles que les contraintes immunogènes, tumorigènes et celles en liens avec la durée de conservation des cellules (revu par [978]). Dans le même contexte, les EVs apparaissent comme une alternative plus sûre et plus fiable que d'autres thérapies, en particulier la greffe de cellules. En effet, cette pratique peut entraîner une stimulation immunitaire dommageable, et l'obtention de cellules à greffer possède également des défis éthiques et techniques qui limitent parfois la mise en place de la thérapie. Une étude récente a ainsi prouvé que les EVs pouvaient fournir des effets bénéfiques dans des modèles de lésions rénales [979]. Finalement, des études ont démontré que les EVs issues de CSMs de la moelle osseuse [973, 980-982] ou de cellules embryonnaires du cordon ombilical humain [983, 984] pouvaient également engendrer des effets thérapeutiques et/ou protecteurs contre différents troubles physiologiques, soulignant les capacités thérapeutiques innées plus larges des EVs.



### 7.2.2. Potentiel des EVs en tant que cible thérapeutique

Comme vu précédemment, des études démontrent les effets bénéfiques et thérapeutiques innés des EVs, dans plusieurs pathologies. Pour permettre ces effets, les EVs doivent atteindre avec succès les cellules cibles, afin d'y déverser leur cargaison et/ou d'activer des mécanismes. Ainsi, des stratégies ont été explorées pour augmenter l'affinité des EVs pour les cellules cibles, et celles-ci reposaient principalement sur la modification de la composition externe des vésicules afin d'induire un ciblage spécifique (revu par [985, 986]).

Toutefois, divers travaux ont également rapporté la capacité des EVs à favoriser la propagation de maladies (comme évoqué précédemment), ce qui va donc à l'encontre des objectifs thérapeutiques. Pour remettre en contexte, dans le cas du cancer, les EVs sont notamment capables de produire des effets pro-tumorigènes, en transférant des acides nucléiques et des protéines oncogènes aux cellules cibles (revu par [987]). Plus précisément, les EVs peuvent contribuer à de nombreux processus pathogènes, tels que l'angiogenèse [988, 989], la diaphonie stromale-tumorale [990], l'établissement de niches pré-métastatiques [991, 992] et l'acquisition d'une résistance médicamenteuse [941, 993, 994]. Par conséquent, bloquer de manière exogène la signalisation intracellulaire nocive induite par les EVs et restaurer une signalisation protectrice, sont des stratégies envisagées par plusieurs groupes de chercheurs. Plus précisément, **l'inhibition de la production, de la libération ou de l'absorption des EVs** impliquées dans des processus pro-tumorigènes spécifiques ont été proposées comme cibles thérapeutiques pour stopper les métastases et prévenir les phénotypes invasifs. Ainsi, dans des modèles de tumeurs murines, l'inactivation de Rab27 (une Rab-GTPase clé impliquée dans la biogenèse des EVs) a permis de réduire la croissance tumorale et les métastases [991, 995].

Dans le cas des maladies infectieuses, des travaux ont montré que les EVs du parasite protozoaire *Trypanosoma brucei* peuvent promouvoir l'érythrophagocytose et engendrer une anémie pendant la trypanosomiase aiguë [996]. De nouvelles études ont démontré que les EVs de *Plasmodium falciparum* jouent un rôle important dans le développement des parasites résistants à l'artémisinine [997]. De même, **bloquer la synthèse et la libération des EVs** de pathogènes, ou modifier leur cargaison afin d'empêcher la survie des parasites chez l'hôte, constituent des stratégies thérapeutiques potentielles pour les parasites protozoaires. Des recherches récentes ayant cet objectif ont ainsi été réalisées chez *Giardia* et ont suggéré qu'en l'absence de cholestérol, les EVs du protozoaire n'étaient pas sécrétées et son adhérence aux cellules intestinales de l'hôte était affectée, et que l'utilisation d'inhibiteurs des radeaux lipidiques pouvait induire une altération de la taille et du profil protéomique des EVs du parasite [998]. L'utilisation d'inhibiteurs



## Chapitre 7. Utilisation des EVs et méthodes d'études

pharmacologiques pour empêcher l'absorption des EVs a également été explorée à plus large échelle, mais leur non-spécificité et leurs effets hors cibles soulignent le manque de connaissances actuelles sur les mécanismes d'absorption spécifiques des sous-populations d'EVs (revu par [802, 922, 999]).

Ainsi, le ciblage des EVs peut être utilisé à des fins thérapeutiques opposées : augmenter l'absorption des vésicules ayant des avantages thérapeutiques innés ou, au contraire, bloquer l'action de celles pouvant induire des effets nocifs qui favorisent la propagation de la maladie.

### 7.2.3. Potentiel des EVs en tant que « nanopORTEURS »

De nombreux effets secondaires peuvent survenir après l'utilisation des médicaments, et ceux-ci résultent souvent d'effets hors cible dus à une application systémique du traitement. Afin de réduire ces désagréments, l'amélioration de l'administration des médicaments ([chapitre 5, section 5.3.2.](#)) fait partie des stratégies étudiées dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements, visant à augmenter le nombre de médicaments disponibles, mais aussi pour lutter contre la résistance. Dans ce contexte, des travaux ont proposé d'utiliser des nanoparticules capables de délivrer spécifiquement leur chargement dans la zone cible (revu par [667, 1000]). Cependant, l'opsonisation et la clairance rapide représentent un problème potentiel pour certains de ces systèmes d'administration (revu par [1001]). Plusieurs stratégies ont été élaborées pour tenter de surmonter certains de ces problèmes, telles que l'inclusion du polymère synthétique poly-(éthylène glycol) dans la composition des liposomes (revu par [1002]).

Les EVs font parties des **nanopORTEURS** les plus prometteurs, en particulier pour les raisons suivantes : **(i)** leur origine naturelle réduit l'immunogénicité et la toxicité, **(ii)** leur taille nanométrique leur permet d'échapper à la clairance rapide par le système phagocytaire mononucléaire, **(iii)** leur haute perméabilité facilite leur acheminement jusqu'à la cible, et **(iv)** leur cargaison peut être chargée de manière sélective [979, 1003] et revu par [1004]. Ainsi, divers composants ont été étudiés en tant que cargaison thérapeutique des EVs, tels que des protéines, des ARNs (petits ARNs et ARNm), des peptides, et certaines drogues synthétiques. Dans ce contexte, les EVs ont été utilisées pour transférer des petits ARNs interférents (« siARNs », pour « *Small Interfering* » ARNs), des miARNs non codants, de l'ARNm, des protéines et des vecteurs, dans des études sur les maladies génétiques héréditaires (revu par [1005]). Par ailleurs, le rôle des miARNs dans la régulation des maladies a suscité de plus en plus d'intérêt, notamment pour leur implication déjà connue dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique. Plus généralement, la majorité des études thérapeutiques portant sur ces acides nucléiques se sont surtout intéressées au cancer (avec comme fins

## Chapitre 7. Utilisation des EVs et méthodes d'études

thérapeutiques la surexpression de miARNs, les imitateurs de miARNs ou les antagonistes de miARNs (revu par [979]), mais des études ont aussi montré leur potentiel pour d'autres pathologies.

Finalement, afin d'assurer une livraison suffisante de la cargaison, deux types d'approches sont utilisées pour le chargement de molécules thérapeutiquement actives dans les EVs : le **chargement « endogène »** et le **chargement « exogène »**. Brièvement, le chargement endogène consiste à utiliser des systèmes sur les cellules productrices d'EVs, afin de moduler le contenu intracellulaire qui formera la cargaison des EVs (revu par [1006]). L'une des stratégies les plus utilisées pour ce type de chargement (en particulier pour incorporer des acides nucléiques thérapeutiques) est la transfection cellulaire [892, 1007-1009]. Bien que moins répandues, d'autres méthodes ont également été proposées pour ce type de chargement, telles qu'une approche ciblée et modulaire du chargement des EVs [1010] et revu par [1006], l'utilisation de mécanismes d'encapsidation virale [1011], ou encore l'utilisation d'ancres membranaires [1012]. Des informations complémentaires sur le chargement endogène des EVs sont disponibles en [Annexe 10](#). Le chargement exogène des EVs est quant à lui une approche basée sur le chargement spécifique d'EVs isolées et purifiées, à l'aide de procédures contrôlables et donc plus « acceptables » sur le plan pharmaceutique (revu par [979, 1013]). Dans cette approche, les méthodes proposées sont les suivantes : la perméabilisation membranaire (par électroporation [1014-1018], à l'aide de saponine [1019-1022], par dialyse hypotonique [1022, 1023]), et la conjugaison du cholestérol à des siARNs [1024, 1025]. Des informations complémentaires sur le chargement exogène des EVs sont disponibles en [Annexe 11](#).

### 7.2.4. Les EVs en tant que vaccins

La capacité des EVs issus des cellules dendritiques (CDs) (aussi appelés « dexosomes » dans le cas des EXOs (revu par [1026])) à présenter des antigènes au système immunitaire est une caractéristique clé étudiée dans différents travaux, y compris ceux portant sur la vaccination (revu par [1027]). Plus précisément, les vaccins à base d'EVs induisent souvent des réponses de type T helper 1 (Th1), ainsi qu'une immunité à médiation cellulaire. Ceci représente un avantage clé et efficace d'un point de vue thérapeutique, en particulier pour lutter contre les infections bactériennes et virales [1028, 1029]. Par exemple, des EXOs de CDs pulsés avec de l'anatoxine diphtérique (substance préparée à partir de la toxine de la *Corynebacterium diphtheriae*) ou porteurs d'antigènes mycobactériens, induisent tous deux préférentiellement des réponses immunitaires de type Th1, alors que des vaccins comparables composés de sous-unités protéiques ont induit des réponses immunitaires de type Th2 [1028, 1029]. Cette différence n'est pas sans importance et a bien

## Chapitre 7. Utilisation des EVs et méthodes d'études

au contraire un impact considérable sur l'efficacité vaccinale : les vaccins à bases d'EVs ont protégé les souris contre l'infection à *Mycobacterium tuberculosis*, contrairement aux vaccins à base d'antigène [1028, 1029]. De même, la vaccination de souris gravides avec des EVs de CDs pulsées avec des antigènes dérivés de *Toxoplasma gondii* a permis d'augmenter la survie des ratons exposés ultérieurement au parasite [1030].

Par ailleurs, grâce à de nombreux résultats prometteurs et concluants, plusieurs essais cliniques ont été autorisés pour tester l'innocuité des vaccins antitumoraux et antibactériens à base d'EVs. Il s'agissait notamment de plusieurs essais cliniques de phase I (par exemple, l'utilisation de dexosomes comme vaccins thérapeutiques antitumoraux chez des patients atteints de mélanome malin [1031] d'un cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) [1032], ou d'un cancer colo-rectal [1033] ; et la combinaison de deux vaccins à base de vésicules de la membrane externe (« OMV ») de deux souches bactériennes pour lutter contre la méningococcie du sérogroupe B [1034]) et d'un essai clinique de phase II qui visait à évaluer l'efficacité de dexosomes dans l'immunothérapie d'entretien après une chimiothérapie de première ligne dans le CPNPC [1035]. De façon générale, les résultats obtenus lors de ces essais ont suggérés que les vaccins à base de dexosomes peuvent être sûrs et favoriser les réponses des LT et des cellules tueuses naturelles chez les patients (revu par [1036]). Depuis, d'autres études thérapeutiques sont en cours, avec une utilisation de différents types d'EVs (allant des EVs autologues, aux EVs dérivées de plantes), pour diverses pathologies (allant du cancer à l'accident vasculaire cérébral (AVC)) [1037] et revu par [1005, 1013]). Même s'il reste des défis à surmonter, le potentiel thérapeutique des EVs, notamment en termes de vaccination, est de mieux en mieux maîtrisé et suscite beaucoup d'espoir pour les travaux futurs.

### 7.3. Principales méthodes utilisées pour l'étude des EVs

#### 7.3.1. Isolement des EVs

Afin d'analyser de façon optimale la cargaison des EVs, il est important de les isoler avec une grande pureté et des rendements élevés. Actuellement, diverses méthodes ont été développées, et celles-ci sont basées sur les caractéristiques biophysiques et/ou biochimiques des EVs, telles que la forme, la taille, la densité, et des marqueurs de surface spécifiques (revu par [829, 1038]). Lors du choix de la technique d'isolement utilisée, il est important et nécessaire de prendre en compte les exigences d'inspection ou de recherche, ainsi que la complexité des fluides biologiques dans lesquels se trouvent les EVs. En effet, des travaux ont montré que le choix de la méthode d'isolement pouvait affecter l'intégrité structurelle et l'activité fonctionnelle des EVs

## Chapitre 7. Utilisation des EVs et méthodes d'études

[1039] et que d'autres particules pouvaient également être co-isolées et, par conséquent, influencer la pureté des échantillons obtenus [802, 1040]. Plus concrètement, d'un point de vue technique les approches utilisées pour l'isolement des EVs peuvent être réparties en deux groupes : **(i)** les méthodes dites « conventionnelles », qui comprennent par exemple les approches basées sur l'ultracentrifugation, la précipitation, la filtration, ou sur l'affinité, et **(ii)** les nouvelles méthodes d'isolement, basées sur la microfluidique.

L'**ultracentrifugation** (UC) est la méthode la plus populaire pour l'isolement des EVs et constitue la technique de choix dans environ 56% des laboratoires (revu par [1041]). Elle permet d'isoler les EVs en accélérant leur vitesse de sédimentation naturelle, basée sur la différence de leur densité par rapport au milieu environnant. Plusieurs techniques basées sur l'UC ont été développées, telles que l'UC différentielle et l'UC à gradient de densité (« DGUC » pour « *Density Gradient Ultracentrifugation* »). Brièvement, l'UC différentielle est une technique qui utilise des étapes séquentielles de vitesse de centrifugation (force  $g$  variables) et permet la séparation des particules en fonction de leur densité de flottabilité [1042] et revu par [1043, 1044]. Cette technique a d'ailleurs été la première méthode utilisée pour isoler les EVs [930] et elle continue d'être couramment choisie, que ce soit pour isoler des EVs à partir de fluides corporels ou de milieux cellulaires [1045-1047]. La DGUC est quant à elle une variante de l'UC, développée pour isoler des fractions d'EVs spécifiques (revu par [1048]). Elle comprend une étape supplémentaire à l'UC dans laquelle un gradient de densité est utilisé, tel que le saccharose [1049, 1050] et revu par [1044]. Les particules en suspension ayant une densité plus élevée que le solvant utilisé sont sédimentées, tandis que celles ayant une densité plus faible flottent dans la partie supérieure. Les EVs sont ainsi séparées des particules non vésiculaires, telles que les protéines.

La **précipitation** est une méthode de séparation basée sur la dispersion du tampon où se trouvent les EVs, et constitue la seconde approche la plus populaire après l'UC (revu par [1051]). Techniquement, ces méthodes reposent sur l'utilisation de polymères hydrophiles qui forment une toile en forme de maille et qui capturent les EVs de petite taille (généralement entre 60 et 180 nm) [1052] qui sont ensuite granulées à de faibles vitesses centrifuges. Plusieurs kits commerciaux basés sur la précipitation sont actuellement disponibles, tels que ExoGAG (NasaBiotech), Exoprep (HansaBioMed), Exoquick TM (System Biosciences), la solution de précipitation des EXOs (Immunostep), le kit Total EXO Isolation (Invitrogen), miRCURRY (QIAGEN), ou encore Pure Exo (101 Bio) [1053-1055] et revu par [1056]. Toutefois, plusieurs travaux ont montré qu'il est parfois difficile de séparer les polymères des EVs, ce qui peut donc affecter les résultats des recherches ultérieures.



## Chapitre 7. Utilisation des EVs et méthodes d'études

D'autres approches, telles que les **méthodes de filtration**, sont également largement utilisées pour l'isolement des EVs. Parmi celles-ci, on peut distinguer l'ultrafiltration, la chromatographie d'exclusion de taille [1057], la filtration à flux tangentiel (aussi connue sous le nom de « filtration à flux croisés ») [975, 1058] et la dialyse par filtration hydrostatique [1059] ; toutes permettent l'isolement des EVs par leur taille.

Par ailleurs, des **méthodes de capture par affinité** ont également été développées afin d'isoler les EVs de façon spécifique. Plus précisément, l'immunoprécipitation (IP) (une méthode couramment choisie et aussi connue sous le nom « d'immuno-capture »), utilise des anticorps pour cibler des marqueurs de surface des EVs, tels que les protéines de choc thermique, les tétraspanines (CD9, CD63 et CD81), les annexines, et les antigènes du CMH [1060]. Une étude récente a d'ailleurs développé une nouvelle approche IP en combinant des anticorps avec des nanoparticules afin de générer des « *nanoparticules superparamagnétiques immunoaffinitives* » [1061]. Cette innovation a permis la capture efficace des EVs (en particulier des EXOs) présents dans le surnageant de cultures cellulaires et de fluides corporels [1061]. Il existe aussi d'autres méthodes de capture par affinité qui ciblent la PS, les protéoglycanes, les glycoprotéines ou les glycolipides, mais la plupart de ces approches nécessitent une pré-isolation des EVs, ce qui les rend plus longues et plus complexes [1062] et revu par [1051]. Dans le même ordre d'idée, une étude a développé une technologie d'immuno-affinité par chromatographie liquide haute performance qui offre plusieurs avantages, en particulier la haute efficacité, le suivi en temps réel et la possibilité de pouvoir utiliser la technique à petite échelle [1063]. D'autres méthodes chromatographiques sont également disponibles, telles que la chromatographie d'échanges d'anions qui utilise une matrice chargée positivement afin d'attirer les EVs de charge opposée, et la chromatographie d'interaction hydrophobe qui utilise une phase fibreuse polymère à canaux capillaires en polyester et qui permet l'isolement efficace des EXOs de diverses matrices [1064-1066] et revu par [1067]. De façon plus générale, les méthodes de capture par affinité permettent d'isoler les sous-populations d'EVs avec une spécificité élevée (quelle que soit leur taille), mais le rendement en EVs est beaucoup plus faible que les méthodes basées sur les propriétés physiques des EVs, telles que celles citées précédemment (revu par [1048, 1068]). De plus, il est également important de préciser que ces méthodes peuvent entraîner une liaison spécifique difficile à inverser, ce qui peut donc affecter les expériences ultérieures.

Finalement, grâce aux progrès récents dans l'élaboration de dispositifs à microsystème, de nombreuses méthodes d'isolement d'EVs basées sur la **microfluidique** ont été développées (ou sont en cours de développement). En plus de permettre l'isolement, la détection et l'analyse des EVs dans des puces miniaturisées (revu par [1069]), la technologie microfluidique présente divers avantages. En effet, des travaux ont montré que ces méthodes nécessitent peu de réactifs, présentent un faible coût de fabrication, sont



relativement rapides, et permettent un tri précis et sensible des différentes sous-populations d'EVs [1070, 1071] et revu par [1072]. Différents dispositifs sont ainsi disponibles, tels que les microfluidiques centrifuges, acoustiques, d'immunoaffinité, hydrodynamiques, filtrants, et viscoélastiques (revu par [1038, 1073]).

### 7.3.2. Caractérisation des EVs

Afin d'identifier les caractéristiques biologiques et les interactions des EVs, il est primordial de pouvoir récolter des informations approfondies sur leurs **propriétés physiques et biochimiques**, telles que leur morphologie, leur taille, leur densité, leur charge de surface, et leur composition. Pour cela, de nombreuses technologies ont été développées, et celles-ci comprennent des approches moléculaires, biophysiques et microfluidiques. Parmi les techniques disponibles, les plus couramment utilisées sont brièvement abordées ci-dessous.

#### 7.3.2.1. Analyses physiques des EVs

Les principales **méthodes d'imagerie électronique** qui permettent de visualiser et de caractériser des EVs de divers échantillons biologiques (en particulier, la morphologie et la taille), sont la microscopie électronique à transmission (« TEM », pour « *Transmission Electron Microscopy* ») [1074], la microscopie électronique à balayage, la microscopie à force atomique [1075, 1076], la cryo-microscopie électronique (revu par [1077]), et la microscopie confocale à fluorescence. Cette dernière est d'ailleurs très avantageuse pour l'étude des interactions entre les EVs et les cellules cibles [1078, 1079]. Par ailleurs, **l'analyse de suivi des nanoparticules** (« NTA », pour « *Nanoparticle Tracking Analysis* ») et la **détection d'impulsion résistives accordable** (« TRPS », pour « *Tunable Resistive Pulse Sensing* »), font parties des méthodes les plus utilisées pour obtenir des informations sur la quantification et la distribution par taille des EVs [1080]. Plus précisément, le NTA est une technique basée sur la capacité de suivre le mouvement brownien des particules en suspension, et est particulièrement efficace pour l'analyse de EXOs [1081, 1082]. Si nécessaire, la fluorescence peut être détectée par le système NTA, ce qui est important lors de la surveillance des changements de phénotype des EVs de certaines pathologies [1083]. La méthode TRPS est basée sur l'impédance (principe Coulter) et est utilisée pour caractériser les propriétés physiques des EVs (en particulier les MVs [1082]), telles que la taille absolue, la concentration et la charge de surface (potentiel  $\zeta$ ) [1084, 1085]. Finalement, la **cytométrie en flux** est une autre méthode utilisée pour la quantification et la caractérisation des EVs, notamment depuis le développement des nouvelles technologies basées sur la fluorescence (revu par [1086, 1087]). Plus précisément, étant donné la grande hétérogénéité des EVs, la cytométrie en flux qui



## Chapitre 7. Utilisation des EVs et méthodes d'études

utilise des anticorps dirigés contre des marqueurs de surface est une méthode idéale pour distinguer certaines (sous)-populations d'EVs. Toutefois, les vésicules de petite taille (qui ont un diamètre < 500 nm) ne permettent qu'une faible diffusion de la lumière et des signaux de fluorescence, et peuvent donc rester sous les limites de détections de l'appareil (revu par [1088]). Pour tenter de surmonter cette limite (et plus particulièrement pour réussir à détecter les petites particules d'environ 100 nm de diamètre), des instruments de cytométrie en flux très sensibles ont été développés, tels que le système de **cytométrie en flux vésiculaire** [1086]. Ce système intègre et optimise systématiquement les paramètres de l'instrument et permet ainsi d'énumérer, de dimensionner et de caractériser les EVs de façon individuelle.

### 7.3.2.2. Analyses biochimiques des EVs

#### 7.3.2.2.1. Cargaison en protéines

L'approche la plus couramment utilisée pour caractériser les EVs est la détermination de leur composition protéique. La teneur totale en protéines des EVs peut être facilement évaluée grâce à des **dosages colorimétriques** (en particulier, la méthode BCA (« *BiCinchoninic acid Assay* ») ou la méthode de Bradford [1089] et revu par [769]), effectués après leur isolation. Toutefois, avant la réalisation de ces dosages, il est nécessaire de disposer d'échantillons d'EVs hautement purifiés afin d'éviter que d'éventuels contaminants protéiques ne compromettent les résultats. Les protéines membranaires d'intérêt présentes à la surface des EVs isolées peuvent être détectées par **immuno-affinité**, notamment grâce à l'utilisation du test classique du dosage d'immunoabsorption enzymatique (« ELISA », pour « *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* »), ou grâce à de nouvelles techniques d'immuno-affinité, telles que le kit d'exosomes MACSPlex (Miltenyi) [1090]. Toutefois, le Western Blot reste actuellement l'approche la plus utilisée pour identifier et/ou vérifier la présence de certaines protéines des EVs. L'ISEV recommande d'ailleurs d'utiliser des anticorps pour les protéines spécifiques, notamment CD63, CD9, CD81, TSG101, HSP70, et Alix (revu par [876]). Par ailleurs, pour les EVs isolées de biofluides (plasma, urine, etc.), l'ISEV recommande également d'effectuer une quantification supplémentaire des contaminants protéiques couramment co-isolés avec les vésicules (albumine, apolipoprotéines, etc.) afin de vérifier la pureté des échantillons. La technique conventionnelle de **chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem** (« LC-MS/MS », pour « *Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry* »), permet quant à elle d'obtenir l'inventaire de la composition protéique des EVs [1091]. Par ailleurs, les plateformes analytiques multidimensionnelles, telles que la **spectrométrie de mobilité ionique couplée à la chromatographie liquide et à la spectrométrie**

## Chapitre 7. Utilisation des EVs et méthodes d'études

**de masse** (« LC-IMS-MS », pour « *Liquid Chromatography-Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry* »), ont l'avantage d'offrir des améliorations considérables, en particulier en termes de résolution et de qualité des spectres de masse obtenus [1092, 1093]. Finalement, les méthodes basées sur la **microfluidique** constituent un autre type d'approches aussi utilisées pour la caractérisation protéomique des EVs [1094].

### 7.3.2.2.2. Cargaison en acides nucléiques

Différentes techniques sont disponibles pour l'étude du contenu en acides nucléiques des EVs. Ces méthodes comprennent des **techniques « classiques »** de laboratoire (PCR, RT-PCR, ...), ainsi que des approches plus avancées, telles que la PCR digitale en gouttelettes (« ddPCR », pour « *Digital Droplet PCR* »), l'analyse de **puces à ADN**, et le **séquençage à haut débit** (« HTS », pour « *High Throughput Sequencing* »). À titre d'exemple, des informations clés ont été obtenues sur les miARNs des EXOs issus de cellules leucémiques, grâce aux puces à ADN [1095], et sur l'expression de ces acides nucléiques dans les cellules souches humaines, grâce au HTS [1096]. De même que pour la protéomique, les méthodes basées sur la **microfluidique** sont d'autres approches aussi utilisées pour la caractérisation des acides nucléiques des EVs (revu par [1073]).

### 7.3.3. Défis encore non résolus

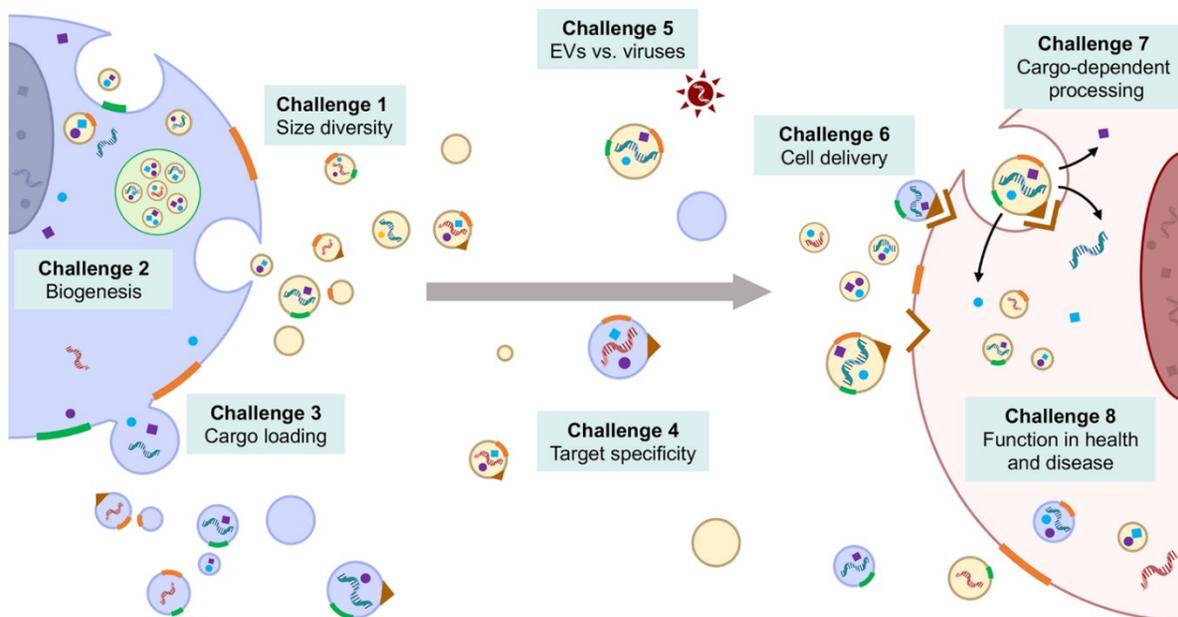
Au cours de ces dernières années, un grand nombre de méthodes d'étude pour l'isolement et la caractérisation des EVs ont été développées et décrites dans la littérature, mais beaucoup d'entre elles révèlent des faiblesses en termes de normalisation [1045]. Ce manque d'accord universel concernant la méthodologie utilisée pour l'étude des EVs a soulevé plusieurs débats et a notamment été considéré comme un problème majeur par la Société Internationale de Thrombose et d'Hémostase (« ISTH », pour « *International Society on Thrombosis and Haemostasis* ») (revu par [741]). Bien que cette discussion ait permis d'initier les premières normalisations d'étude des microparticules (revu par [741]), une enquête récente a montré que le protocole d'isolement des EVs utilisé continue de varier considérablement d'une étude à l'autre [1045]. Plus précisément, un rapport récent a révélé que sur 1742 études analysées, 190 méthodes d'isolement différentes et 1038 protocoles uniques d'isolement d'EVs ont été utilisés (revu par [882]). De plus, il semblerait que le choix du protocole puisse être influencé par différents critères, tels que le type de biofluides, la nature de la recherche (fondamentale ou clinique), la question expérimentale, et bien d'autres encore (revu par [1097]). Étant donné que chaque méthode peut produire des EVs et des sous-



## Chapitre 7. Utilisation des EVs et méthodes d'études

fractions d'EVs d'homogénéité variable, l'extrapolation des résultats entre différentes études est parfois difficile (revu par [765]). Dans ce contexte, il a par exemple été démontré que les profils protéiques des EVs obtenus dans différents travaux étaient fortement dépendant de la méthodologie utilisée pour l'isolement des EVs (revu par [765]). Bien que plusieurs initiatives récentes (telles que les bases de données sur les EVs [878, 879, 882] et les recommandations MISEV [736, 760, 761]) tentent de générer des lignes directrices et des matériaux de référence [1098], la **normalisation de la méthodologie** ainsi que la **transparence des informations** dans les études, restent actuellement deux grands défis encore non résolus (revu par [741]).

Par ailleurs, l'intérêt accru pour la recherche portant sur les EVs a entraîné une forte augmentation des publications disponibles et des informations dévoilées. Toutefois, outre le manque de normalisation généralisée concernant les méthodologies utilisées pour l'étude des EVs, il est également parfois difficile de faire la distinction entre les connaissances acquises (issues de caractéristiques bien établies) et les hypothèses encore non vérifiées. Récemment, une étude a d'ailleurs fourni une synthèse de l'état actuel de la recherche, en mettant notamment en avant les principaux mystères encore non résolus (revu par [1099]). Un aperçu de ces derniers est présenté dans la Figure 18.



**Figure 18.** Principaux "mystères non résolus" (revu par [1099]).



## Partie 2 - [Présentation du projet de recherche de doctorat]

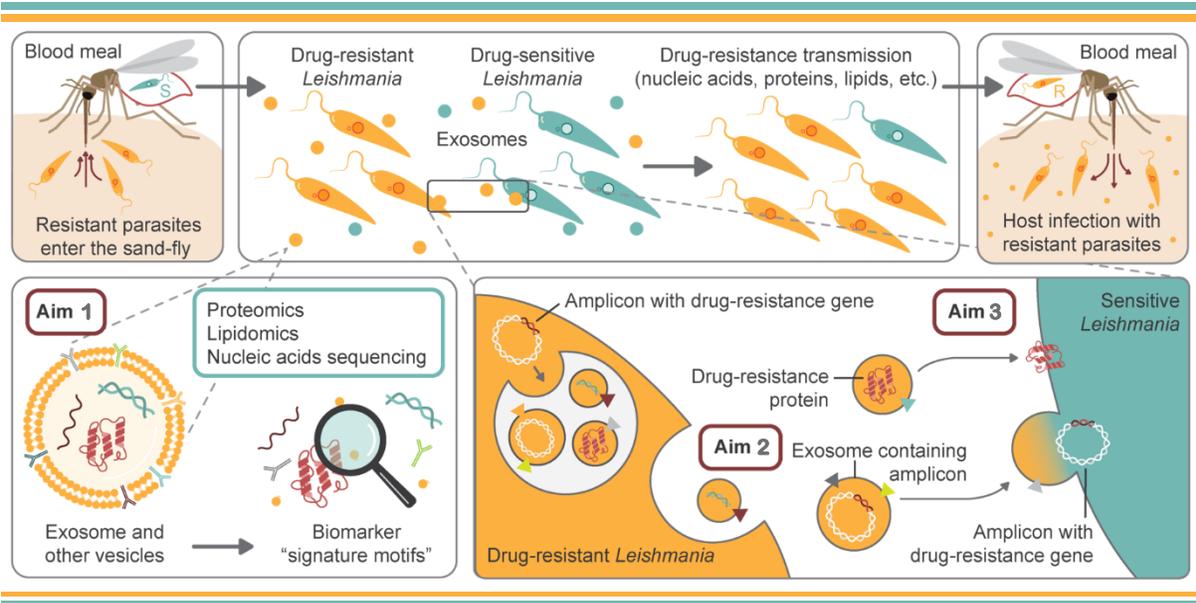


Figure 19. Présentation du projet de recherche de doctorat.

### 1. Problématique

### 2. Mise en contexte et orientation du projet de recherche

### 3. Hypothèses de recherche

### 4. Objectifs de recherche



## 1. Problématique

Comme beaucoup d'autres maladies négligées, en l'absence de vaccins efficaces actuels ([chapitre 3, section 3.1.2.](#)) le contrôle de la leishmaniose ([chapitre 1](#)) repose sur la lutte antivectorielle ([chapitre 3, section 3.1.1.](#)) et sur un petit arsenal de médicaments ([chapitre 3, section 3.2.](#)), dont les inconvénients ne sont pas négligeables. De plus, bien que les dérivés de l'antimoine (Sb) aient constitué pendant plus d'un demi-siècle le traitement de première intention de la maladie [356], ce succès a vite été ralenti, notamment en Inde où l'émergence de parasites résistants aux Sb<sup>v</sup> a été constatée à plusieurs reprises [1100]. Au fil du temps, la résistance aux médicaments chez *Leishmania* s'est étendue à d'autres agents chimiothérapeutiques. Étant donné que la majorité des médicaments antileishmaniens actuels sont utilisés à la fois pour le traitement de la leishmaniose chez l'humain et chez le chien, cette utilisation commune est, sans aucun doute, un des facteurs clés qui favorisent l'émergence et la propagation de parasites résistants.

Par ailleurs, la vitesse de propagation de la résistance dépasse largement le rythme de développement de nouveaux médicaments, ce qui représente un problème majeur de santé publique. Plusieurs facteurs ont été identifiés dans cette difficulté à développer de nouveaux traitements antileishmaniens et malheureusement les problèmes se trouvent à différents niveaux, tels que le manque de financements adéquats, les politiques de contrôles en termes de santé publique, l'accès difficile aux technologies, ainsi que les différences de besoins et/ou d'efficacité des médicaments selon les régions du monde (revu par [1101]).

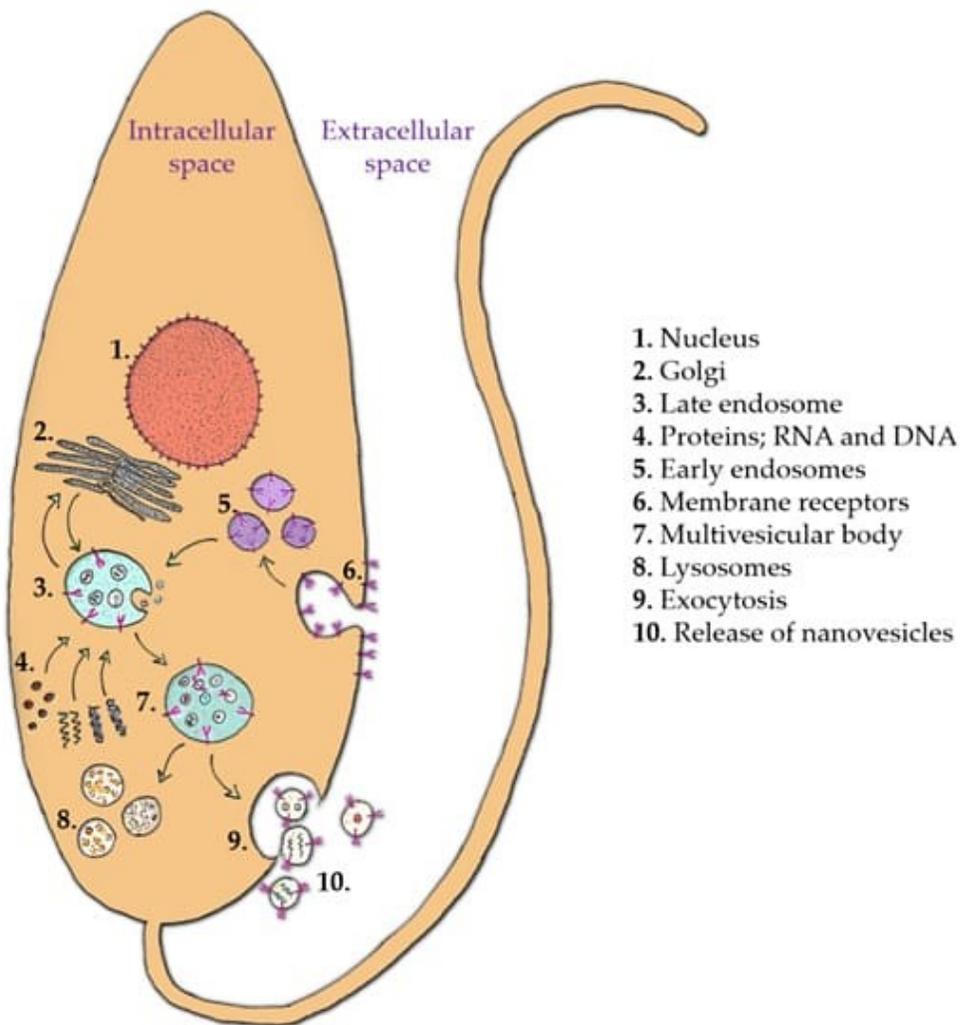
La complexité de la génétique fonctionnelle de *Leishmania* et notamment ses incroyables particularités génomiques ([chapitre 2, section 2.3.](#)), rendent également difficile l'identification de marqueurs de la résistance aux médicaments. Nombreuses sont les études qui tentent de mieux comprendre ces mécanismes, et même si les études -omiques ([chapitre 4, section 4.1.](#)) ont permis d'améliorer nos connaissances et d'identifier (partiellement) certains mécanismes de résistance ([chapitre 4, section 4.4.](#)), beaucoup de phénomènes restent encore inexpliqués.

Pour ces raisons, la situation actuelle liée à la résistance aux médicaments rappelle sans cesse l'urgente nécessité de **mieux comprendre les mécanismes de résistance**, et surtout de **développer de nouveaux traitements adaptés** ([chapitre 5](#)).



## 2. Mise en contexte et orientation du projet de recherche

Dans la recherche pour la lutte contre les maladies, les vésicules extracellulaires (chapitres 6 et 7) suscitent de plus en plus l'intérêt des chercheurs, notamment en raison de leur précieuse cargaison ([chapitre 6, section 6.3.](#)) et de leurs rôles connus dans différents phénomènes biologiques importants ([chapitre 6, section 6.5.](#)). Chez *Leishmania*, la capacité du protozoaire à sécréter des EVs (y compris les EXOs (Figure 20)) a été supposée après avoir constaté la présence de vésicules intra-macrophagiques regroupées autour de la metalloprotease GP63 [1102, 1103], et celle-ci a été confirmée dans d'autres travaux, peu de temps après [1104]. À la suite de cette découverte, différentes études ont été réalisées et ont permis d'obtenir des informations clés sur les EVs du protozoaire.



**Figure 20.** Biogénèse des EXOs chez *Leishmania* (revu par [1105])

Quelques exemples de découvertes sont présentés ci-après (de manière chronologique).

**2010** Les EVs de *Leishmania* constituent un nouveau mécanisme de **sécrétion de protéines**, qui permet leur libération dans le cytoplasme des cellules infectées [1104]. Trois mécanismes potentiels de livraison ont été décrits : **(i)** fusion directe avec la membrane phagolysosomale, **(ii)** trafic rétrograde des EVs au sein du système de trafic des vésicules hôtes, et **(iii)** transport de cargaison à travers la membrane exosomale, par un complexe protéique de transport [1104]. Une fois libérées, les protéines des EXOs sont capables de **moduler la régulation et les propriétés fonctionnelles des macrophages** [1104]. Les EVs de *Leishmania* peuvent également moduler les réponses immunitaires innées et adaptatives, en agissant sur les monocytes et les cellules dendritiques [1106].

**2011** Lors du repas sanguin du phlébotome sur l'hôte mammifère, le changement de température auquel fait face *Leishmania* (phlébotome ~25°C → hôte mammifère ~37°C) entraîne une augmentation considérable du nombre d'EVs sécrétées par le parasite [1107]. Une fois sécrétées, les EVs sont capables de **moduler la signalisation des macrophages** (notamment en provoquant le clivage/l'activation de la protéine tyrosine phosphatase (PTP) des macrophages), et d'**inhiber la translocation des facteurs de transcription vers le noyau** [1107]. Ceci serait notamment possible grâce à la libération de leur cargaison qui est riche en protéines clés, telles que le **facteur de virulence GP63** [1107]. Certaines protéines des EVs de *Leishmania* permettraient également d'**inhiber la production de NO**, en réponse à des stimuli externes qui imitent l'infection, tels que le LPS [1107].

**2014** Les EVs de *Leishmania* déficients en GP63 ont des **capacités immunomodulatrices** très réduites, soulignant que la modulation des PTPs et des facteurs de transcription des macrophages est dépendante de GP63 [1108]. De plus, l'analyse comparative des protéines des EVs d'une souche de *Leishmania* WT et d'une souche de *Leishmania gp63<sup>-/-</sup>* a montré le rôle clé de **GP63** dans le **tri des protéines** [1108]. Par ailleurs, des travaux ont révélé que les EVs dérivés de macrophages infectés par *Leishmania* pouvaient moduler la réponse immunitaire en faveur de l'hôte et ainsi potentiellement créer un **effet protecteur** contre le parasite [1109].

**2015** *Leishmania* secrète des **EVs dans l'intestin moyen du phlébotome** et ces vésicules sont rejetées, avec les parasites, dans l'inoculum de la mouche des sables, lors de son repas

sanguin. De plus, les EVs sont capables d'**augmenter la production de cytokines inflammatoires** et d'**aggraver les lésions de la maladie** [1110].

**2019** Les EVs peuvent servir d'**enveloppes virales** en transportant le virus à ARN 1 de *Leishmania* (« LRV1 », pour « *Leishmania* RNA virus 1 »)) et la **transmission** de ce dernier augmente l'infectiosité chez l'hôte mammifère [950].

**2021** Des travaux s'intéressant à un modèle d'immunisation ont montré que les EVs de *Leishmania* pouvaient **potentiellement jouer un rôle protecteur** pour la leishmaniose cutanée [1111]. Ces observations complètent celles faites en 2014 et montrent que les EVs peuvent être des **candidats potentiels** pour le développement de protocoles de **vaccination**.

Bien que diverses caractéristiques clés aient été découvertes sur les EVs du protozoaire, aucune étude n'a encore été effectuée sur les EVs libérées par des souches résistantes aux médicaments. Ainsi, cet aspect constitue le cœur de mon projet de recherche de doctorat, à savoir « **l'étude des EVs de *Leishmania* et de leur rôle dans le phénomène de la résistance aux antimicrobiens** ».

### 3. Hypothèses de recherche

Différents travaux ont mis en évidence l'importance et l'utilité des analyses du protéome de *Leishmania* dans l'identification des souches sensibles et résistantes aux médicaments [1112, 1113]. Étant donné que la composition des EVs ([chapitre 6, section 6.3.](#)) peut varier selon la cellule parentale [804] et que les parasites *Leishmania* sont des eucaryotes qui ont conservé la capacité d'en produire, nous avons émis comme première hypothèse que **les EVs libérées par les parasites *Leishmania* résistants aux médicaments pourraient contenir des protéines uniques et différemment enrichies selon les mécanismes de résistance aux médicaments impliqués dans la survie de leur lignée cellulaire parentale.**

Par ailleurs, *Leishmania* dépend principalement des CNVs pour la régulation de l'expression des gènes de résistance aux médicaments [256, 260], et comme vu précédemment, leur augmentation est majoritairement causée par l'accumulation d'amplicons circulaires extrachromosomiques (contenant des gènes de résistance aux médicaments, tels que le gène *mrpA*) [256, 260, 521] ([chapitre 2, section 2.3.3.2.](#)). De plus, les

## Partie 2 - [Présentation du projet de recherche de doctorat]

connaissances récemment obtenues sur les EVs de *Leishmania* (en particulier leur rôle clé dans la survie du protozoaire et dans l'exacerbation de la maladie [1104, 1108, 1110], et leur capacité à servir d'enveloppe virale pour le virus LRV1 afin de faciliter sa transmission [950]), nous ont amené à émettre une seconde hypothèse. Plus précisément, nous pensons qu'au vu des découvertes actuelles, **les EVs des parasites *Leishmania* résistants aux médicaments pourraient être impliqués dans l'acquisition de gènes de résistance aux médicaments, en constituant un mécanisme de HGT.**

Finalement, pour assurer au complet le cycle de vie de *Leishmania* ([chapitre 2, section 2.2.](#)), les altérations génétiques du parasite permettant la résistance aux médicaments doivent être efficaces contre les facteurs de stress environnementaux, autant chez l'hôte mammifère que chez le phlébotome vecteur. Ainsi, dans la continuité de nos deux premières hypothèses, nous avons émis comme troisième hypothèse que **les EVs des parasites *Leishmania* résistants aux médicaments pourraient potentiellement être impliqués dans la modulation du contrôle redox et dans la tolérance au stress des parasites naïfs.**

#### 4. Objectifs de recherche

Afin de répondre aux hypothèses de recherche, plusieurs objectifs ont été fixés.

Hypothèse 1 : Les EVs libérées par les parasites *Leishmania* résistants aux médicaments pourraient contenir des protéines uniques et différemment enrichies selon les mécanismes de résistance aux médicaments impliqués dans la survie de leur lignée cellulaire parentale. **Objectifs** : **1)** Isoler les EVs de différentes souches de *L. infantum* (la souche sauvage et 3 souches résistantes aux médicaments (Sb, MF et AmB)). Pour chaque échantillon : **2)** étudier la production, la taille, la morphologie et la teneur en protéines des EVs, et **3)** identifier le protéome des EVs. **4)** Identifier les protéines uniques et enrichies des EVs des parasites résistants au Sb, à la MF et à l'AmB.

Hypothèse 2. Les EVs des parasites *Leishmania* résistants aux médicaments pourraient être impliqués dans l'acquisition de gènes de résistance, en constituant un mécanisme de HGT. **Objectifs** : **1)** Isoler les EVs de différentes souches sensibles et résistantes aux médicaments de *L. infantum* et de *L. major*. **2)** Isoler et caractériser l'ADN associé aux EVs de *L. infantum* de type sauvage (Ldi-WT) et de *L. infantum* Sb2000.1 résistant au Sb (Ldi-Sb), cette souche étant connue pour détenir des amplicons circulaires extrachromosomiques contenant le gène de résistance *mnpA* responsable de la résistance au Sb. **3)** Évaluer

## Partie 2 - [Présentation du projet de recherche de doctorat]

la capacité des EVs de Ldi-Sb à influencer le phénotype des cellules receveuses chez des souches de *L. infantum* sensibles. **4)** Évaluer l'implication potentielle des EVs dans le transfert interspécifique de gènes de résistance.

Hypothèse 3. Les EVs de *Leishmania* résistant aux médicaments pourraient potentiellement être impliquées dans la modulation du contrôle redox et dans la tolérance au stress des parasites naïfs. **Objectifs :** Évaluer l'impact des EVs libérées par différentes souches de *Leishmania* résistantes aux médicaments sur **1)** les profils de sensibilité croisée aux médicaments des cellules réceptrices naïves ; **2)** l'accumulation de ROS chez les promastigotes WT exposés aux médicaments ; et **3)** la croissance des parasites. **4)** Explorer les changements potentiels dans le protéome des promastigotes receveurs.





## Partie 3 - [Articles scientifiques]

### Article 1

# PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

## Unravelling the proteomic signature of extracellular vesicles released by drug-resistant *Leishmania infantum* parasites

Noémie Douanne<sup>1,2</sup>, George Dong<sup>3</sup>, Mélanie Douanne<sup>4</sup>, Martin Olivier<sup>3\*</sup>,  
Christopher Fernandez-Prada<sup>ID,1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada,

<sup>2</sup> The Research Group on Infectious Diseases in Production Animals (GREMIP), Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada,

<sup>3</sup> The Research Institute of the McGill University Health Centre, Montréal, QC, Canada,

<sup>4</sup> Department of Biology, Health and Ecology, "Ecole Pratique des Hautes Etudes", Paris, France

\* martin.olivier@mcgill.ca (MO); christopher.fernandez.prada@umontreal.ca (CFP)

<sup>ID</sup> <http://orcid.org/0000-0003-4834-4956/>

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008439>

Lire l'article [[dans ce document](#)], [[en ligne](#)]

### Article 2



## *Leishmania* parasites exchange drug-resistance genes through extracellular vesicles

Noémie Douanne<sup>1,2</sup>, George Dong<sup>3,7</sup>, Atia Amin<sup>4,7</sup>, Lorena Bernardo<sup>1,2</sup>, Mathieu Blanchette<sup>5</sup>, David  
Langlais<sup>4,6</sup>, Martin Olivier<sup>3,6,\*</sup> and Christopher Fernandez-Prada<sup>1,2,6,8,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, 626 CIMIA Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada

<sup>2</sup>The Research Group on Infectious Diseases in Production Animals (GREMIP), Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada

<sup>3</sup>IDIGH, The Research Institute of the McGill University Health Centre, 2155 Guy Street, Montreal, QC H3H 2L9, Canada

<sup>4</sup>Department of Human Genetics, McGill University Genome Centre, Montreal, QC H3A 0G1, Canada

<sup>5</sup>School of Computer Science, McGill University, Montreal, QC H3A 0E9, Canada

<sup>6</sup>Department of Microbiology and Immunology, McGill Research Centre on Complex Traits, Montreal, QC, Canada

<sup>7</sup>These authors contributed equally 8Lead contact

\*Correspondence: martin.olivier@mcgill.ca (M.O.), christopher.fernandez.prada@umontreal.ca (C.F.-P.)

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111121>

Lire l'article [[dans ce document](#)], [[en ligne](#)]

## Article 1

## Unravelling the proteomic signature of extracellular vesicles released by drug-resistant *Leishmania infantum* parasites

Noélie Douanne<sup>1,2</sup>, George Dong<sup>3</sup>, Mélanie Douanne<sup>4</sup>, Martin Olivier<sup>3\*</sup>,  
Christopher Fernandez-Prada<sup>ID,1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada,

<sup>2</sup> The Research Group on Infectious Diseases in Production Animals (GREMIP), Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada,

<sup>3</sup> The Research Institute of the McGill University Health Centre, Montréal, QC, Canada,

<sup>4</sup> Department of Biology, Health and Ecology, "Ecole Pratique des Hautes Etudes", Paris, France

\* martin.olivier@mcgill.ca (MO); christopher.fernandez.prada@umontreal.ca (CFP)

<sup>ID</sup> <http://orcid.org/0000-0003-4834-4956>

### Résumé en français

La leishmaniose constitue la 9<sup>e</sup> plus grande charge de morbidité parmi toutes les maladies infectieuses. Le contrôle de cette maladie repose sur une courte liste d'agents chimiothérapeutiques avec en tête les antimoniés pentavalents, suivis de la miltéfosine et de l'amphotéricine B ; médicaments qui sont loin d'être idéaux en raison de la toxicité de l'hôte, du coût élevé, de l'accès limité et des taux élevés de résistance aux médicaments. Sachant que la composition des vésicules extracellulaires (EVs) peut varier en fonction de l'état de leur cellule parentale, nous avons émis l'hypothèse que les EVs libérées par les parasites *Leishmania infantum* résistants aux médicaments pourraient contenir des protéines uniques et différemment enrichies en fonction des mécanismes de résistance aux médicaments impliqués dans la survie de leur lignée cellulaire parentale. Pour évaluer cette possibilité, nous avons étudié la production, la taille, la morphologie et la teneur en protéines des EVs de trois lignées cellulaires de *L. infantum* résistantes aux médicaments bien caractérisées et d'une souche de type sauvage. Nos résultats sont les premiers à démontrer que les mécanismes de résistance aux médicaments peuvent induire des changements dans la morphologie, la taille et la distribution des vésicules extracellulaires de *L. infantum*. De plus, nous avons identifié le protéome central des EVs de *L. infantum*. Ce protéome est hautement conservé parmi les souches, à l'exception d'une poignée de protéines qui sont enrichies différemment selon le médicament responsable de l'induction de la résistance antimicrobienne. De plus, nous avons obtenu le premier instantané de protéines enrichies des EVs libérées par des parasites résistants à l'antimoine, à la miltéfosine et à l'amphotéricine. Ceux-ci comprennent plusieurs facteurs de virulence, des facteurs de transcription, ainsi que des protéines codées par des gènes de résistance aux médicaments. Cette étude détaillée des véhicules électriques de *L. infantum*



jette un nouvel éclairage sur les rôles potentiels des vésicules extracellulaires dans la biologie de *Leishmania*, en particulier en ce qui concerne la survie du parasite dans des conditions stressantes. Ce travail décrit une première étape cruciale vers la découverte de profils basés sur les EVs et capables de prédire la réponse aux agents antileishmaniens.

## Abstract

Leishmaniasis constitutes the 9th largest disease burden among all infectious diseases. Control of this disease is based on a short list of chemotherapeutic agents headed by pentavalent antimonials, followed by miltefosine and amphotericin B; drugs that are far from ideal due to host toxicity, elevated cost, limited access, and high rates of drug resistance. Knowing that the composition of extracellular vesicles (EVs) can vary according to the state of their parental cell, we hypothesized that EVs released by drug-resistant *Leishmania infantum* parasites could contain unique and differently enriched proteins depending on the drug-resistance mechanisms involved in the survival of their parental cell line. To assess this possibility, we studied EV production, size, morphology, and protein content of three well-characterized drug-resistant *L. infantum* cell lines and a wild-type strain. Our results are the first to demonstrate that drug-resistance mechanisms can induce changes in the morphology, size, and distribution of *L. infantum* EVs. In addition, we identified *L. infantum*'s core EV proteome. This proteome is highly conserved among strains, with the exception of a handful of proteins that are enriched differently depending on the drug responsible for induction of antimicrobial resistance. Furthermore, we obtained the first snapshot of proteins enriched in EVs released by antimony-, miltefosine- and amphotericin-resistant parasites. These include several virulence factors, transcription factors, as well as proteins encoded by drug-resistance genes. This detailed study of *L. infantum* EVs sheds new light on the potential roles of EVs in *Leishmania* biology, particularly with respect to the parasite's survival in stressful conditions. This work outlines a crucial first step towards the discovery of EV-based profiles capable of predicting response to antileishmanial agents.

## Author summary

Visceral leishmaniasis is a life-threatening disease caused by *Leishmania infantum* parasites, which are transmitted by sand flies. In the absence of vaccines, current control of this disease is based on chemotherapy, which is comprised of a very limited arsenal threatened by the emergence and spread of drug-resistant strains. In the shadow of growing concern and treatment failure due to resistance, the characterization of extracellular vesicles (EVs) released by drug-resistant *L. infantum* parasites could shed



some light on the complex nature of drug resistance in *Leishmania* and increase our understanding of the biology of the parasite. EVs are vesicles secreted by all eukaryotic cells whose contents (proteins, DNA/RNAs, lipids) vary as a function of their cellular origin. Our results demonstrate for the first time that EVs released by drug-resistant parasites are enriched in unique protein markers that reflect the drug-resistance mechanisms involved in the survival of parental cells. These unique proteins included several virulence and transcription factors, as well as drug-resistance genes; this offers a potential benefit for drug-resistant parasites in terms of parasite-to-parasite communication and host-parasite interactions. Collectively, our initial results could serve as a jumping-off point for the future development of novel EV-based diagnostic tools for the detection and appraisal of antimicrobial-resistant *Leishmania* populations.

## Introduction

The vector-borne protozoan parasite *Leishmania* affects 15 million people worldwide, and in the absence of effective preventive and therapeutic treatments, is spreading with  $\approx 1.5$ M new cases/year [1, 2]. Clinical disease ranges from the self-healing cutaneous manifestation to life-threatening visceral leishmaniasis (VL), a systemic disease with a fatality rate as high as 100% within 2 years, especially if left untreated [3–5]. *L. infantum* is the main causative agent of VL in both humans and dogs, the latter of which serve as the main reservoir for infection [6]. While many efforts have been employed to tackle leishmaniasis, the incidence of VL is increasing in the Americas [7], as well as re-emerging in the form of epidemic outbreaks in Europe, India, and Eastern Africa [8–11]. Control of the disease is based on a very short list of chemotherapeutic agents headed by pentavalent antimonials (Sb), followed by miltefosine (MF) and amphotericin B (AmB). These drugs are far from ideal due to host toxicity, elevated cost, and limited access, but in particular due to the high rates of drug resistance [2]. The latter should be not neglected, especially when both humans and dogs are treated with the same molecules [1, 12].

Extracellular vesicles (EVs) are particles formed by a lipid bilayer containing proteins and nucleic acids; EVs originate from and are released by many types of cells, including eukaryotic cells [13–16]. Although EVs can be separated into numerous subclasses, these particles are often categorized as exosomes, microvesicles or apoptotic bodies, according to their size, origin, and components [13, 15, 17]. During EVs biogenesis, different cellular components are loaded into the vesicles, while specific proteins are integrated into their lipid bilayer. Consequently, EVs' content varies as a function of their cellular origin [18]. EVs have been the focus of numerous studies due to their implication in intercellular communication [19]. There is growing evidence that EVs play a major role not only in parasite-to-parasite communication, but also in host-parasite interactions



[20–28]. Of note, it has been determined that *Leishmania* exosomes (a subclass of EVs formed from late endosomes) isolated from *in vitro* cultures are as effective in modulating some early macrophage and host inflammatory responses as whole *Leishmania* parasites [29–31]. Additionally, *Leishmania* exosomes have recently been shown to serve as an envelope and shuttle for complete LRV1 viruses, facilitating virus transmission and increasing infectivity in the mammalian host [32]. Exosomes and other EVs are reported to be involved in cell stress responses and resistance to chemotherapeutic agents in eukaryotic cells [33]. Drug-resistance in *Leishmania* relies on a number of mechanisms, and different key players have been identified in the last decade. For example, *Leishmania* resists Sb by altering its detoxifying pathways, drug uptake, and efflux, and sequestering Sb-thiol complexes into intracellular vesicles using ABC transporter MRPA [34–36]. Both MF and AmB affect the integrity of different membranes (cell, mitochondria, etc.), and resistance to these drugs induces important changes in specific subsets of the proteome of the parasite [35, 37].

While several studies have demonstrated the utility of whole-parasite proteomics in differentiating sensitive and resistant isolates and in *in vitro*-generated strains [35, 37], the composition of EVs released by drug-resistant *Leishmania* parasites remains unexplored. Knowing that the composition of EVs can vary according to the parental cell [38–40], we hypothesized that EVs released by drug-resistant *L. infantum* parasites contain differently enriched proteins that could serve as proxy for the different drug-resistance and compensatory mechanisms deployed by the releasing cell line. To assess this possibility, we used quantitative label-free proteomics to study EVs production, size, morphology, and protein content of three drug-resistant *L. infantum* cell lines and a wild-type strain. These experiments lead to the identification of key proteins within EVs issued from drug-resistant parasites, which are essential to understanding how drug-resistant EVs may interact and modulate not only other parasites, but also host cells and the sand fly vector. Moreover, our powerful insights open the door for further exploration of *Leishmania* EV-profiles as potential biomarkers for the identification and evaluation of drug-resistant parasites.

## Methods

### *Leishmania* cultures

The *Leishmania infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) wild-type strain (WT) and the *in vitro* generated resistant mutants Sb2000.1, AmB1000.1 and MF200.5 [41–46], which are resistant to 2000  $\mu$ M of Sb, 1000 nM of AmB and 200  $\mu$ M MF, respectively, were grown in M199 medium at 25°C supplemented with 10% fetal bovine serum, 5  $\mu$ g/mL of haemin at pH 7.0 and 2000  $\mu$ M Sb (Potassium antimonyl tartrate, Sigma-Aldrich), 200  $\mu$ M of MF (Miltefosine, Cayman Chem.) or 1  $\mu$ M AmB (Amphotericin B solution, Sigma) . 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 antimony concentrations, by measuring A600 using a Cytation 5 machine (BioTek, USA). EC50 values were calculated based on dose-response curves analyzed by non-linear regression with GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, La Jolla California, USA). An average of at least three independent biological replicates was performed for each determination.

### Purification of *Leishmania* extracellular vesicles

The purification of *Leishmania* EVs was performed as we previously described [29, 32]. Briefly, 1 L of *Leishmania* parasites ( $2.5\text{--}5.0 \times 10^7$  parasites/mL) was grown in drug-free M199 at 25°C (supplemented with 10% FBS, 5 µg/mL of haemin at pH 7.0), and left to divide in 10 non-ventilated 75 cm<sup>2</sup> culture flasks (Corning, USA) until they reached late-log phase. Next, parasites were washed twice in PBS and resuspended in 5 mL RPMI-1640 medium without FBS and phenol red (Life Technologies) at a final concentration of  $2.5\text{--}5.0 \times 10^8$  parasites/mL, in non-ventilated 25 cm<sup>2</sup> culture flasks (Corning, USA) at 37°C. Parasites were then incubated for 4 h at 37°C to stimulate the release of EVs in the medium [21]. The viability of parasites was evaluated by propidium-iodide staining before and after incubation at 37°C. Only cultures with a viability > 95.0% were submitted to subsequent EV-purification steps. After the 4-h incubation, samples were centrifuged twice to eliminate parasites (10 min at 3 000 g) and clear out debris (10 min at 8 500 g), followed by two subsequent filtrations using 0.45 µm and 0.20 µm syringe filters. EVs were then recovered by a 1-h centrifugation at 100 000 g and resuspended in the EVs buffer (137 mM NaCl, 20 mM Hepes, pH 7.5). EVs' proteins were then dosed using the Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, USA). EVs were conserved in aliquots in EVs buffer at -80°C for subsequent analyses. Aliquots were slowly thawed on ice before being used. Once thawed, EVs were never refrozen. Three independent purifications were performed for each strain.

### Transmission Electron Microscopy (TEM)

EVs purified from the different *L. infantum* WT and drug-resistant strains were directly coated on formvar carbon grids, fixed with 1% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1 min, and stained with 1% uranyl acetate for 1 min. Formvar grids coated with isolated EVs were recorded using a FEI Tecnai 12 120 kV transmission electron microscope. The resulting images were captured with the AMT XR-80C CCD Camera System (Facility for Electron Microscopy Research, McGill University).



### Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

EVs' concentration and size distribution were characterized by NTA using a NanoSight LM 10 Instrument (Malvern Panalytical, Worcestershire, UK) available in the laboratory of Dr Janusz Rak (RI-MUCH McGill University). To determine the size and number of particles, five sequential 30-s videos were collected using the default parameter settings of the machine. EVs buffer was used as the negative control. The average size and concentration of the particles were calculated by integrating the averages of the modes from three independent records, obtained for each of three independent biological replicates.

### Protein digestion and liquid chromatography–MS/MS (LC-MS/MS)

LC-MS/MS was performed, as previously described [21, 32], at the proteomic platform of the *Institut de Recherches Cliniques de Montréal* (Montréal, Canada). Briefly, proteins derived from purified *Leishmania* EVs were precipitated with 15% TCA/acetone and processed for LC–MS/MS analysis. Protein extracts were then solubilized using a 6M urea buffer, reduced by the addition of reduction buffer (45 mM DTT, 100 mM ammonium bicarbonate) for 30 minutes at 37°C, with a final concentration of 25%, then alkylated by the addition of alkylation buffer (100 mM iodoacetamide, 100 mM ammonium bicarbonate) for 20 minutes at 24°C in the dark, with a final concentration of 25%. Subsequently, an in-solution digestion was performed by the addition of trypsin at a ratio of 1:25 protease/protein, followed by an overnight incubation at 37°C. Finally, formic acid was added to a 0.2% final concentration to quench the reaction. Samples were cleaned with C18 Zip Tip pipette tips (Millipore, USA) before MS analysis. Extracted peptides were injected into a Zorbax Extended-C18 desalting column (Agilent) and separated by chromatography on a Biobasic 18 Integragrit capillary column (Thermo Scientific, USA) on a Nano high-performance LC system (1100 series unit; Agilent). Eluted peptides were electrosprayed as they exited the capillary column and were analyzed on a QTRAP 4000 linear ion trap mass spectrometer (SCIEX/ABI).

### Protein identification

The peak list files were generated with Distiller version 2.1.0.0 software ([www.matrixscience.com/distiller](http://www.matrixscience.com/distiller)) using the following parameters: minimum mass set to 500 Da, maximum mass set to 6,000 Da, no grouping of MS/MS spectra, precursor charge set to auto, and minimum number of fragment ions set to 5. Protein database searching was performed with Mascot 2.6 (Matrix Science) against the *L. infantum* (txid5671, 16,895 proteins) protein database (RefSeq assembly accession: GCF\_000002875.2; last access November 2019). The mass tolerances for precursor and fragment ions were set to 10 ppm and 0.6 Da, respectively.



Trypsin was used as the enzyme, allowing for up to 1 missed cleavage. Cysteine carbamidomethylation was specified as a fixed modification, and methionine oxidation as variable modifications. Data analysis was performed using Scaffold (version 4.11.0). Peptide identifications were accepted if they could be established with a probability greater than 80.0%. Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 95.0% probability and contained at least 2 identified peptides. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm [47]. Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated using MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony. The final number of peptides per protein was represented by the average of the three biological replicates after normalization to the total number of peptides. Normalization of total spectrum counts (TSC) for each protein was performed automatically using Scaffold. Briefly, Scaffold calculates the total number of spectra in each replicate, as well as the average number of spectra across all replicates. The software then multiplies each spectrum count in each sample by the average count over the replicate's total spectral count, leading to normalized TSC values. Normalized TSC were subsequently used to establish the different comparisons depicted in Tables 1–5.

### Bioinformatics analysis

Shared proteins among the three replicates of each strain (WT: 152; Sb2000.1: 194; MF200.5: 264; and AmB1000.1: 70 proteins) were annotated with GO terms from goa\_uniprot\_all.gaf (UniProt GOA knowledge base; downloaded 12-Nov-2019) using the integrated functions of Scaffold version 4.11.0. Protein information was retrieved from UniprotKB (*L. infantum* reference proteome; last modified January 15, 2020) [48] and TriTrypDB v46 (last modified November 6, 2019) [49]. Presence of membrane/transmembrane domains was evaluated for retained proteins using UniprotKB (<https://www.uniprot.org/>). To this end, Gene IDs (Tables 2–5) were used to retrieve the summary page of each individual protein (last access November 2019), which includes the subcellular localization of the query protein predicted *via* InterPro [50]. Venn diagrams were constructed using the online tool <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. Heat maps of total spectral counts for the common proteins between the WT and the resistant lines were generated using the Heatmapper server [51]. Prediction of non-classical protein secretion was investigated using the SecretomeP 2.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>; last access May 2020) [52]. Briefly, the sequence of each protein was recovered from TriTrypDB v46 (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/>) using its unique Gene ID (Tables 2–5). Sequences were assembled in a bulk FASTA file and submitted to SecretomeP 2.0 server. For each input sequence, the server predicted the possibility of non-classical secretion (NN-score). Moreover, SecretomeP 2.0 server integrates SignalP5.0 [53], which allowed us to determine the potential presence of



signal peptides on the different proteins. For eukaryotic organisms, proteins with an NN score > 0.600 that are not predicted to have a signal peptide are considered non-classically secreted proteins.

### Statistical analyses of data

Statistical analyses were performed using the unpaired Student's t-test ( $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ) and Shapiro-Wilk Test for normality, followed by Kruskal-Wallis rank test ( $****p \leq 0.0001$ ) and post-hoc Nemenyi (Tukey and Kramer) test ( $**p \leq 0.01$ ,  $****p \leq 0.0001$ ). The data were analyzed using GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, La Jolla California, USA) and R 3.6.1 software [54].

## Results

### Drug resistance affects *Leishmania* EVs' quantity, size and distribution

Composition and quantity of EVs released by eukaryotic cells is known to vary according to cell stress conditions (pH, temperature, etc.) and metabolic state [38–40]. To establish whether the capacity to produce and release EVs (including their size and distribution) is altered in drug-resistant *Leishmania* parasites, we selected four well-characterized strains: *L. infantum* WT and drug-resistant mutants Sb2000.1 (antimony), AmB1000.1 (amphotericin B), and MF200.5 (miltefosine). Before proceeding to purification of EVs, the four strains were analyzed in terms of drug sensitivity to confirm their previously reported phenotypes [41–46]. As expected, the WT was sensitive to all three drugs, while all mutants were highly resistant to their respective selection drug (S1 Table). EVs were extracted and purified from temperature-stressed cultures of stationary WT and drug-resistant parasites through multiple centrifugation, wash, and filtration steps (as detailed in the materials and methods section). It is important to note that while drug-resistant cultures were maintained under drug pressure, this pressure was removed during EVs production and purification to avoid direct effects of the drug on the membrane of the parasites (e.g. MF and AmB).

Next, purified vesicles were submitted to three nanoparticle-tracking analyses (NTA) per biological replicate to accurately determine the distribution and concentration of the particles (Fig 1A). Following MISEV2018 recommendations [55], NTA analyses and total protein quantification (microBCA) were used to calculate the particle/ $\mu$ g protein ratio for the different EVs' purifications. All ratios ranged from  $10^9$  to  $10^{10}$ , with mean values of  $2.51 \times 10^{10}$  for the WT,  $7.69 \times 10^9$  for Sb2000.1,  $1.57 \times 10^{10}$  for MF200.5 and  $2.98 \times 10^{10}$  for AmB1000.1. No significant differences were observed among the strains.



EVs were also evaluated by transmission electron microscopy (Fig 1B), confirming the predominant presence of lipid bilayer-enclosed nano-sized structures compatible with exosomes (~50 to 200 nm in diameter) and other small EVs. NTA and microscopy analyses revealed probable differences in size and morphology in EVs released by drug-resistant strains. To determine the average size of EVs released by the different strains, the modes of each distribution were determined (Sb2000.1: 112.4 nm; MF200.5: 125.0 nm and AmB1000.1: 116.2 nm) and compared with the WT (97.7 nm) (Fig 1C). While all three resistant strains showed a tendency to release larger EVs, only EVs released by MF200.5 and AmB1000.1 were significantly larger (unpaired t-test;  $p \leq 0.01$  and  $p \leq 0.05$ , respectively).

The next step was to evaluate if the shift in terms of average size of EVs was affecting the global distribution, or rather specific subpopulations, of said particles. To this end, the NTA datasets corresponding to sizes ranging from 0 to 500 nm, previously identified in Fig 1A, were further analyzed. As depicted in Fig 2A (S1 Fig), the number of particles secreted per size seemed to follow a different trend depending on the strain. To verify this, the global distribution of particles released by the WT and the drug-resistant strains were compared (S2 Fig), revealing significant differences among the four strains (S2 Fig; Kruskal-Wallis rank test;  $p \leq 0.01$ ). Nemenyi post-hoc test (S2 Fig) pinpointed significant differences between WT and Sb2000.1 EV distributions ( $p \leq 0.0001$ ), as well as between Sb2000.1 and the other two resistant strains ( $p \leq 0.01$  for Sb2000.1 vs. MF200.5;  $p \leq 0.0001$  for Sb2000.1 vs. AmB1000.1).

Different quantitative analyses using NTA datasets were performed to verify the likelihood of a direct link between drug resistance and the capacity of *Leishmania* parasites to release different EV subpopulations. For all these comparisons, the number of particles was normalized to 106 parasites. Strain Sb2000.1 was the only cell line showing a strong tendency toward reduced EV secretion. However, this difference was not significant when compared with the WT (Fig 2B;  $p = 0.065$ ). As depicted in Fig 2C, particles < 100 nm accounted for approximately 32.0% of the total particles produced by the WT strain. The percentage of particles corresponding to this range was significantly decreased (approximately 13.0% in both cases,  $p \leq 0.05$ ) in MF200.5- and AmB1000.1-resistant strains. While not statistically significant ( $p = 0.057$ ), Sb2000.1 showed a tendency to produce less particles < 100 nm. Particles spanning from 100 to 200 nm represented approximately 55–70.0% of all the particles secreted by the four strains analyzed (Fig 2D). AmB1000.1 showed a significant increase in the percentage of particles within this range ( $p \leq 0.05$ ). Finally, particles > 200 nm accounted for 12–15.0% of total isolated EVs for the WT, Sb2000.1 and AmB1000.1 (Fig 2E). The percentage of particles corresponding to this range was significantly increased in MF200.5 (24.0%) when compared to the WT ( $p \leq 0.05$ ).



## Protein diversity and abundance are altered in EVs of *L. infantum* drug-resistant strains

To better understand the functions of EVs, including their potential role in cellular survival in the presence of stress (e.g. drug resistance), their molecular content (which specifically reflects the phenotype of parent cells) should be analyzed. Since proteins are a major component of EVs and the *Leishmania* proteome is specifically modified in drug-resistant strains, we decided to identify common and unique proteins present in EVs released by the WT and the three resistant strains using untargeted, label-free, shotgun LC–MS/MS proteomics. In this study, we included three independent biological replicates for each strain to minimize the any potential effect derived from EVs' heterogeneity (S1 Data). We were therefore able to identify common and unique proteins within the same strain, as well as among the different cell lines. Proteomic data was first analyzed using the Scaffold software, which was able to identify a high number of proteins and protein clusters. Subsequent analyses were performed using independent proteins rather than clusters (S1 Data).

LC–MS/MS analysis identified 152, 194, 264 and 70 proteins shared through three biological replicates for the WT, Sb2000.1, MF200.5, and AmB1000.1 mutants, respectively (Fig 3A). Moreover, we evaluated the total protein diversity of EVs belonging to each strain (Fig 3B). The global proteomic profile of the EVs released by the resistant strains showed significant differences when compared with the WT (S3 Fig). The diversity was variable depending on the replicate, especially for the WT. This variation was less important in the case of the resistant strains, for which two out of three replicates were always very similar. AmB1000.1 EVs showed a tendency to harbour less different proteins than the other three strains (Fig 3B). However, no significant differences were found between the resistant strains and the WT when comparing their average amount of proteins (unpaired t-test,  $p > 0.05$ ). Only proteins shared among the three replicates of each strain were retained for subsequent analyses.

Next, using the automated features of Scaffold 4.11, we generated a mean-deviation scatterplot to evaluate the variation of protein abundance in EVs derived from the four strains. (S4 Fig). This analysis shows an estimate of the abundance (mean value of normalized spectral counts) of proteins previously retained for each strain (shared among the three replicates). Proteins recovered from WT (152) and Sb2000.1 (194) EVs were similarly distributed. However, most of the 70 conserved proteins identified for the AmB1000.1 strain (red squares in S4 Fig) were located on the right side of the scatterplot, corresponding to higher abundance levels. High-abundance proteins detected in AmB1000.1 could be masking the detection of low-abundance proteins, leading to a lower total protein diversity. In contrast, proteins identified in MF200.5 EVs were found more frequently on the left section of the scatterplot, which corresponds to lower abundance levels.



## Identification and characterization of *L. infantum* EVs' core proteome

In order to identify and further characterize the core proteome of *L. infantum* EVs (proteins conserved among the WT and the three resistant strains), we relied only on those proteins common to all three biological replicates for each of the four cell lines (WT: 152; Sb2000.1: 194; MF200.5: 264; and AmB1000.1: 70, as depicted in Fig 3B). In this way, the Venn diagram in Fig 4A shows 31 shared proteins between the WT and the drug-resistant mutants (detailed in Table 1), as well as conserved proteins for each strain (WT: 23; Sb2000.1: 25; MF200.5: 99; and AmB1000.1: 19).

Next, and in accordance with MISEV2018 recommendations [55], we proceed to identify and quantify the abundance of specific protein markers previously reported for *Leishmania* EVs [32, 56]. As depicted in the heatmap comparing the WT with the drug-resistant mutants (Fig 4B), vesicles isolated from the four strains contained specific *Leishmania*-EV markers, such as metalloprotease GP63, enolase, heat shock proteins HSP70/HSP83 and elongation factor 1 alpha. Importantly, this heatmap revealed that these markers could be enriched differently in the different strains. In order to validate this hypothesis, we evaluated the levels of enrichment of the 31-shared proteins in the drug-resistant strains, compared with the WT (Table 1). While the levels of most of the conserved proteins remained stable among the different mutants and the WT, our results revealed punctual significant, strain-dependent differences. A fold change  $> 1.60$  was set as the up-regulation threshold, and  $< 0.60$  for down-regulation. As depicted in Table 1, Sb2000.1 EVs showed significantly decreased levels of metalloprotease GP63 (approximately 0.60-fold change depending on the gene involved) and a nucleoside diphosphate kinase (0.57-fold change). These two proteins were also downregulated in EVs released by AmB1000.1 (0.39–0.59 and 0.50-fold, respectively). EVs released by the MF200.5 strain were significantly enriched in tubulin alpha (1.73-fold increase) and tubulin beta chains (2.80-fold increase). While not statistically significant, GP63 showed a tendency toward enrichment in EVs released by MF200.5. Of note, our analyses also revealed the existence of nine proteins common to the three resistant strains but absent in the WT (Fig 4A). These proteins included ribosomal proteins, both 40S and 60S, histone H3, along with transcription factor CBF/NF-Y (S2 Table).

Finally, proteins (Table 1) were analyzed in terms of Gene Ontology (GO) annotation, including specific associations related to biological processes, cellular components, and molecular functions (Fig 5). An important limit of our GO analyses in *Leishmania* EVs is the high percentage of unknown proteins present in these particles (approximately 60.0%). Unknown proteins were not included in the GO analysis. For all four strains, EVs proteins were annotated for a wide variety of functions, including cellular and metabolic processes, cytoplasmic and ribosomal components, as well as binding functions (Fig 5A). Among the proteins



harboring domains enabling functional assignment, about 40.0% of EVs proteins were functionally ascribed to the metabolism group, approximately 40.0% assigned to the cellular process group, and 4–7.0% to biological regulation processes. The other functional classes (less than 10.0% each) were represented by proteins identified as involved in protein localization, response to stimulus and biological adhesion. Our analysis did not reveal any significant difference between WT and drug-resistant EVs in terms of GO-annotations general distributions (Fig 5B). Nonetheless, we observed specific differences between WT and AmB1000.1 EVs. Proteins found in EVs released by AmB1000.1 were more frequently ascribed to “*biological adhesion*” (biological process), “*cytoskeleton*” (cellular component) and “*motor activity*” (molecular functions) subsets. No protein belonging to AmB1000.1 EVs was annotated within the “*transporter activity*” subcategory (Fig 5A). Of note, EVs released by the 3 resistant cell lines, but not by the WT, contained variable percentages of proteins annotated for “*motor activity*”. These represented approximately 7.0% of proteins identified in AmB1000.1 EVs. With regard to the cellular compartment of origin of the different proteins, most of them belonged to organelle, cytoplasmic, and ribosomal compartments. As previously reported for EVs, very few proteins were derived from the nucleus, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum, or mitochondria [55].

### Drug-resistance leads to differently enriched profiles and unique proteins in *L. infantum* EVs

Drug-resistant *Leishmania* parasites modify their general proteome according to the drug that has been involved in the *in vitro* selection or *in vivo* treatment process [34, 35]. Our search for enriched proteins present in EVs specific to each drug-resistance background led to the identification of 23, 25, 99 and 19 proteins for WT, Sb2000.1, MF200.5 and AmB1000.1 EVs, respectively, as shown in the Venn diagram in Fig 4A.

Tables 1–4 depict the complete list of enriched proteins identified in EVs released by the WT and the three drug-resistant strains. The total number of hypothetical conserved proteins and uncharacterized proteins varied for each strain: 0/23 for the WT, 7/25 for Sb2000.1, 11/99 for MF200.5 and 4/19 for AmB1000.1. MF200.5 was the strain showing the greatest diversity, as well as the highest enrichment in terms of total spectrum count (TSC) for the most enriched proteins, which were headed by an ATP-dependent 6-phosphofructokinase (LinJ.29.2620; TSC: 69.3) and a glycosome phosphoenolpyruvate carboxykinase (LinJ.27.1710; TEC: 66.3) (Table 3). The most enriched unique protein in WT EVs was a putative cytoskeleton associated protein CAP5.5 (LinJ.31.0450; TSC: 21.3) (Table 1). An enrichment of different ribosomal proteins (S14 and L37), a hypothetical protein (LinJ.07.0960; TEC: 17.3), a SPRY-domain ubiquitin ligase protein (LinJ.13.1510; TEC: 14.3), and an Ecotin-like protein (LinJ.15.0540; TSC: 10.0) were identified in EVs isolated from Sb2000.1 (Table 2). AmB1000.1 EVs were characterized by a high abundance of a hypothetical



conserved protein (LinJ.27.1630; TSC: 37.7), followed by actin (LinJ.04.1250; TSC: 15.3), and a C2 domain protein LinJ.29.0110; TSC: 14.0).

Proteins summarized in Tables 2–5 constitute the conserved proteomic profile of EVs released by the different strains studied. These proteins were shared by the three replicates of one specific strain but were not shared by the three replicates of any of the other strains. While these profiles point to drug-dependent enrichments in the different strains, this data does not pinpoint unique proteins that could be proposed as biomarkers. To determine if some of the enriched proteins could be considered strain-specific (absent in all the replicates of the rest of the strains), we performed a cross-correlation comparison (S5 Fig) between excluded and common pools of proteins previously retained to generate the EV profiles (reported in Fig 3A). This analysis revealed 4 unique enriched proteins in EVs released by WT (Table 2) and MF200.5 (Table 4) strains, and 13 unique proteins in the AmB1000.1 strain (Table 5).

Previous studies have reported that unconventional secretion is a key feature of EVs' proteins in *Leishmania* [57]. To validate this among the unique, enriched proteins identified in our four strains, we used SecretomeP 2.0 proteomic tool [52] for identification of non-classical protein secretion. Of note, this server integrates SignalP5.0 for further confirmation of the presence of signal peptides [53]. Our analyses showed that approximately 26.0% of WT-unique proteins are unconventionally secreted (Table 2; NN-score > 0.600 and absence of signal peptide). This value was slightly lower for the three drug-resistant strains, with values of 20.0%, 21.8%, and 15.8% for Sb2000.1, MF200.5, and AmB1000.1 EVs, respectively (Tables 3–5). On the other hand, according to SignalP prediction, 13.0% of the unique proteins identified in WT EVs have signal peptides (Table 2). Regarding drug-resistant strains, 20.0% of Sb2000.1 and 7.9% of MF200.5 EVs unique proteins were predicted with signal peptides (Tables 3 and 4). No signal peptide was identified among of the proteins identified in AmB1000.1 EVs (Table 5). As EVs usually include various membrane proteins, we manually assessed the presence of membrane/transmembrane proteins using UniprotKB [48]. As summarized in Tables 2–5, the number of unique, enriched membrane/transmembrane proteins for each strain was very variable: 9 (39.1%) for the WT, 5 (20.0%) for Sb2000.1, 4 (4.0%) for MF200.5 and 2 (10.5%) for AmB1000.1.

## Discussion

Different parasite molecular modifications, such as ABC transporters, membrane composition changes or oxidative stress, among others, can contribute both directly and indirectly to the phenomena of drug resistance



[35, 46, 58]. Moreover, it has been shown that *Leishmania* is able to actively alter macrophage and neutrophil environments to resist current antileishmanial agents [59]. Recently, different drug-resistant field isolates have shown either efficient survival inside the insect vector or increased infectivity in the mammalian host [60–64]. This highlights the importance of not only parasite-to-parasite communication, but also a more complex host-parasite and vector-parasite environment. EVs have become known as an integral part of the parasite's infectious life cycle as powerful cell-cell communication mediators. *Leishmania* infection, parasite survival (both inside the vector and the host), as well as the resulting clinical manifestations, are highly influenced by EVs [21–23, 29, 30, 65]. While traditional studies have focused on the survival of drug-resistant parasites in the host during treatment (amastigote form), the impact of drug resistance on the survival of the parasites inside the sand-fly vector (promastigote form) and the first moments of infection has recently begun to be explored. The latter could have a major impact on the spread and perpetuation of drug-resistant *Leishmania* populations [60–62, 66]. To better understand the potential roles of EVs in both the development of *Leishmania* parasites and the spread of drug-resistant strains, we have isolated and characterized the EVs released by the promastigote form of three drug-resistant *L. infantum* strains, as well as their WT counterpart. Our results showed, for the first time, that EV quantities, morphology, distribution, and protein cargo are altered in drug-resistant *Leishmania* parasites. Moreover, these changes appear to be specific to the antileishmanial drug involved in the resistant phenotype.

First, we investigated the impact of drug resistance on the production and distribution of EVs, which could lead to these extracellular elements serving different biological functions. While all four strains were able to produce particles compatible with EVs, parasites resistant to both miltefosine (MF200.5) and amphotericin B (AmB1000.1) produced larger EV subpopulations with altered morphology, especially in MF200.5, as shown by TEM and nanoparticle-tracking analysis. It is known that resistance to miltefosine and amphotericin B in *Leishmania* can lead to drastic changes in different lipids species, predominantly in sterols and phospholipids, some of which are enriched with cyclopropanated fatty acids, as well as to an increase in inositolphosphoceramide species [46, 67]. Consequently, MF- and AmB-resistant parasites tend to show a significant increase in membrane rigidity [67, 68]. Similarly, AmB1000.1 parasites are greatly depleted in ergosterol and 5-dehydroepisterol, but highly enriched in 4-methyl-8,24-cholestadienol. Likewise, MF200.5 cells contain strikingly low levels of ergosterol, with episterol as predominant sterol [46]. Due to the generation of exosomes from late endosomes [38], these vesicles are highly enriched in sterols (up to 43%) in eukaryotic cells [69]. As such, alterations in sterols, and thus membrane fluidity, could be responsible for the marked morphological changes observed in EVs from the MF200.5 strain. Specific EV-targeting lipid analysis should



be conducted to further support this hypothesis. Nanoparticle-tracking analyses revealed a significant increase in the modal particle size of MF200.5 and AmB.1000.1 EVs. This is in correlation with previous TEM studies in which *L. infantum* parasites were stimulated with G418 (geneticin), leading to an increased release of larger vesicles in response to death-inducing stimuli [70]. Likewise, gentamicin-resistant pathogenic *E. coli* increased the modal size of their outer membrane vesicles (OMVs) when exposed to high concentrations of gentamicin [71]. Similarly, a recent study showed that  $\beta$ -lactam antibiotic-resistant *E. coli* produced significantly larger OMVs than its sensitive counterpart [72]. Particle-size distribution analyses revealed significant differences between the four strains, as well as important levels of heterogeneity, which is in accordance with previous reports involving different eukaryotic-cell lines [73]. MF200.5 and AmB1000.1 showed significantly increased amounts of particles within the ranges 100–200 and >200 nm, respectively. Among biomolecules, sterols, especially cholesterol, play a major role in the formation of EVs. As such, the above-mentioned modifications in sterol species in the MF200.5 and AmB1000.1 mutants [46] could potentially be inducing changes in the formation and release of small EVs (normally associated with exosomes). Moreover, while there is a growing body of knowledge suggesting a pathway analogous to that of the mammalian ESCRT-dependent pathway previously reported, the precise mechanism in *Leishmania* has yet to be fully elucidated (reviewed in [65]). It is therefore possible that this pathway, as well as different molecular sorting mechanisms, have been altered in drug-resistant mutants. For example, EVs released by Sb2000.1 and AmB1000.1 showed significantly reduced metalloprotease GP63 content, which has been shown to participate in the sorting of protein content of *Leishmania* exosomes [30].

During their biogenesis, EVs are hypothesized to selectively capture cell-specific proteins that may then become a part of the EVs “molecular signature”. However, the mechanism of such selective packaging remains unknown [74]. To investigate the proteomic “molecular signature” of *Leishmania* EVs, we first evaluated the protein diversity found in the EVs released by the WT and three drug-resistant strains. No significant differences between strains were observed in terms of number of different proteins. This could be explained by the fact that proteins in EVs account for more than half of the total secretion of parasite proteins [75], and EVs, due to their size, have a limited space to enclose large quantities. Moreover, *Leishmania* genomic organization and control leads to great individual parasite-to-parasite variations resulting in mosaic aneuploidy [76, 77], which ultimately modulates protein expression [35]. Due to the specialization of drug-resistant parasites required for their survival (compared with the WT), a lower parasite-to-parasite variability in these strains could be expected, which, coupled with the larger size of drug-resistant EVs, could lead to lower variability within the same strain when compared with the WT. MF200.5



EVs showed a tendency to contain a more diverse EV protein population, which could be facilitated by their larger size (when compared to the other strains). On the other hand, despite its EVs being significantly larger than those of the WT, the AmB1000.1 strain showed the lowest EV protein diversity. This lower diversity was accompanied by an increase in protein abundance. That said, high-abundance proteins could be masking the detection of low-abundance proteins in AmB1000.1, leading to a lower total protein diversity [78]. We also identified the presence of several conserved markers in the EVs isolated from the three replicates of the four strains. These corresponded to EV-specific markers previously reported for *Leishmania* and other eukaryotic cells [32, 55, 56]. The zinc-metalloprotease GP63, in addition to the protein sorting functions discussed above [30], is a virulence factor that greatly influences host cell signaling mechanisms and related functions [79]. This analysis allowed us to identify a number of correlations between EVs' composition and the whole-cell proteome of the drug-resistant strains, demonstrating that EVs could reflect the drug-resistance background of their parental cell line. In this way, previous proteomic studies targeting drug-resistant promastigotes reported a downregulation of GP63 in both Sb2000.1- and AmB1000.1-resistant parasites (Sb/WT ratio: -1.91 and AmB/WT ratio: -4.14, respectively) [42, 44]. In our experiments, GP63 was significantly underrepresented in Sb2000.1 and AmB1000.1 EVs. Likewise, proteins enriched in drug-resistant EVs, such as 14-3-3 Protein-like protein (in AmB1000.1) or Tryparedoxin peroxidase (in Sb2000.1), were also enriched in whole-parasite preparations (AmB/WT ratio: +1.98 and Sb/WT ratio: +1.38, respectively) [42, 44]. Another example is a kinesin coded by the gene LinJ.16.1550, which was enriched 2.75-fold in Sb-resistant parasites compared with their WT counterpart in SILAC experiments [42]. Similarly, all three replicates of EVs released by Sb2000.1, but none of the other investigated strains, showed the presence of this specific protein. This is the first time it has been demonstrated that the proteomic signature profile of EVs—and thus protein sorting—of *Leishmania* parasites could vary according to their drug-resistance profile, as previously observed for cancer cells and bacteria [38–40].

The mechanisms of drug-resistance in *Leishmania* parasites are far from completely elucidated, and some may be non-specific adaptations that provide a general fitness gain allowing the parasite to survive in stressful conditions. In the search for non-specific mechanisms of drug resistance, we identified an interesting subset of nine EVs' proteins enriched in the three replicates of the three drug-resistant strains, but absent in the WT. These proteins included histone H3, core histone-like transcription factor (CBF/NF-Y), and different ribosomal proteins. Histones play an important role in DNA packaging, transcription and gene regulation in the parasite, which also includes drug-resistant genes. This is in accordance with previous studies in *L. donovani*, in which Sb-resistant strains isolated from patients showed an overexpression of histones, highlighting the potential



role of these proteins as traits of drug resistance [80]. While it is well documented that *Leishmania* EVs are effective modulators of early macrophage and host inflammatory responses [29–31], the exact mechanisms behind this modulation are yet to be characterized. Strikingly, a recent study discovered a new virulence mechanism in *L. major*, by which *Leishmania* H3, one of the histones only present in our drug-resistant EVs is secreted by the parasite and forms a nucleosome with the human histones in the host chromatin during infection. This leads to a relaxed conformation of chromatin that impacts gene expression pattern, facilitating survival of the parasite [81]. Transcription factor CBF/NF-Y has been shown to be regulated in different cell types when submitted to different types of stress, such as mechanical stress, ER stress, and DNA damage-related stress, among others [82]. Its presence in EVs derived from drug-resistant parasites would reflect general adaptation mechanisms against drug-generated stress. Moreover, drug-resistant EVs, but not naïve EVs, would have the potential to modulate transcription in recipient parasites with the potential to mediate different downstream pathways. Similarly, it has recently been shown that cancer cells may exploit exosomes to confer transcriptome reprogramming that leads to cancer-associated pathologies [83]. Drug-resistant EVs were also enriched in ribosomal proteins. Similarly, several ribosomal proteins were upregulated in Sb-resistant *L. donovani* field isolates, decreasing the sensitivity of the parasites to Sb, MF, and paromomycin by increasing the proliferation of parasites [84].

As previously discussed, EVs capture cell-specific proteins during their formation and release. For this reason, we were interested in what EVs could potentially tell us about the biology, immunopathology, and drug-resistance mechanisms deployed by each strain. Recent evidence points to a possible correlation between Sb-resistance and virulence in *Leishmania* field isolates [66]. Interestingly, among the 25 enriched proteins present in Sb2000.1 EVs, one of the most upregulated proteins was a SPRY domain-containing ubiquitin ligase. The SPRY domain-containing SOCS box protein 2 was shown to recruit an E3 ubiquitin ligase complex to polyubiquitinate iNOS, targeting it for proteasomal degradation and therefore reducing macrophage killing of *Leishmania* parasites [85]. Moreover, Sb2000.1 EVs contained two proteasome regulatory subunits (an ATPase and a non-ATPase). This suggests that Sb2000.1-derived EVs could be involved in the modulation of redox control and protein degradation of recipient parasites, leading to increased tolerance to stress-inducing drugs as well as to the intracellular environment. Another important protein highly enriched in Sb2000.1 EVs was an ecotin-like protein, which has an important role in the inhibition of peptidases and promotion of *Leishmania* survival inside the sand fly vector. In addition, this protein modulates parasite differentiation and increases macrophage internalization due to the upregulation of phagocytosis by a mechanism dependent on serine peptidase activity [86, 87]. With respect to the MF200.5 strain, released EVs



were enriched in glycolytic (e.g. ATP-dependent 6-phosphofructokinase and glycosomal phosphoenol pyruvate carboxykinase) and lipid-related (e.g. inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and sterol 14 $\alpha$ -demethylase) pathways, reflecting MF's mode of action and mechanisms of drug resistance previously described in whole-parasite studies [46, 59]. MF200.5 EVs carried two ATP-dependent RNA helicases. One of them was a member of the DEAD-box family, which has been shown to play a central role in preventing ROS-mediated damage and in maintaining mitochondrial protein quality control in *Leishmania* [88]. This would facilitate the survival of parasites against mitochondrial MF-induced ROS. In addition, several partners of the DEAD-box helicase [88] were also found in MF200.5 EVs. For example, the HS70-related protein-1 mitochondrial precursor (HSPA9B) has been recently linked to miltefosine resistance and response to oxidative stress in *L. donovani* [89]. In addition to GP63, several other virulence factors, such as disulfide-isomerase and cysteine peptidase B (CPB) proteins, were found in MF200.5 EVs, further confirming that *Leishmania* EVs play a major role as virulence factors [21, 65]. This also raises the concern about a potentially increased virulence induced by EVs secreted by drug-resistant parasites. Last, analysis of AmB1000.1 EVs led to the identification of 19 enriched proteins. Among these, we identified a trypanothione synthetase (TryS) and an ATP-binding cassette protein (MRPA/P-gpA), the latter of which was also present in 2/3 replicates of Sb2000.1. Resistance to AmB in *Leishmania* has been associated with increased expression of enzymes involved in thiol metabolism. Eqbal and collaborators showed that TryS mRNA is upregulated in AmB-resistant *L. donovani* field isolates when compared with sensitive strains [90]. Increased levels in the thiol pathway could also explain the presence of MRPA, which is implicated in the sequestration of thiol conjugates near the flagellar pocket (a specific site for exosome accumulation and secretion in *Leishmania* [56, 57]), and subsequent exocytosis outside the cell [91]. Moreover, in relation to MRPA, there is considerable evidence that P-gp and other MDR transporters can be transmitted from drug-resistant to drug-sensitive tumor cells by exosomes *in vivo* and *in vitro* [92]. Ongoing research will shed light on the potential occurrence of similar mechanisms in *Leishmania* parasites.

The final question we broached was the potential use of unique proteins present in EVs as biomarkers of drug resistance. Since *Leishmania* EVs are highly enriched within the sand fly and are co-egested with the parasite during the insect's bite [56], drug-specific biomarkers would represent a major epidemiological tool for the evaluation of drug resistant *Leishmania* populations, as well as increase our knowledge on how drug-resistant parasites adapt to mammalian and insect hosts in order to guarantee survival. Our results demonstrate that different proteomic-signature profiles can be obtained depending on the drug-resistance background of the parental cell. Moreover, we were able to identify two sets of four unique proteins present only in EVs released



by the WT and MF200.5, as well as 13 in AmB1000.1 particles. While our study represents the first step towards the discovery of EV-based drug-resistance biomarkers, our work presents two limitations that should be addressed in future studies: future analyses should target larger sets of strains and replicates in order to reduce the observed variability and improve the robustness of potential biomarkers. Furthermore, evaluation and comparison of EV production and composition directly from resistant field strains is required.

In conclusion, we have conducted the first comparative characterization of *Leishmania* EVs in the context of drug-resistance. We have analyzed the EVs of three different *L. infantum* strains resistant to antimony, miltefosine and amphotericin B, respectively, as well as their WT counterpart. Our results showed for the first time that drug-resistance mechanisms can induce changes in the morphology, size, and distribution of EVs in *Leishmania*. Next, we identified the core proteome of EVs conserved in both sensitive and drug-resistant backgrounds. Moreover, we obtained the first snapshot of the enriched and unique proteins in EVs released by each drug-resistant strain. Additionally, among these enriched EVs proteins, we identified several virulence factors, transcription factors, as well as proteins coded by drug-resistance genes. This selective sorting of cargo could facilitate the survival of drug-resistant parasites, and potentially sensitive parasites in contact with drug-resistant strains, to a plethora of stressful situations including drug pressure, initial moments of infection, adaptation to the sand-fly vector, etc. Future studies may explore all these aspects and shed light on how EVs, especially those released by drug-resistant parasites, contribute to the survival of *Leishmania*.

## Acknowledgments

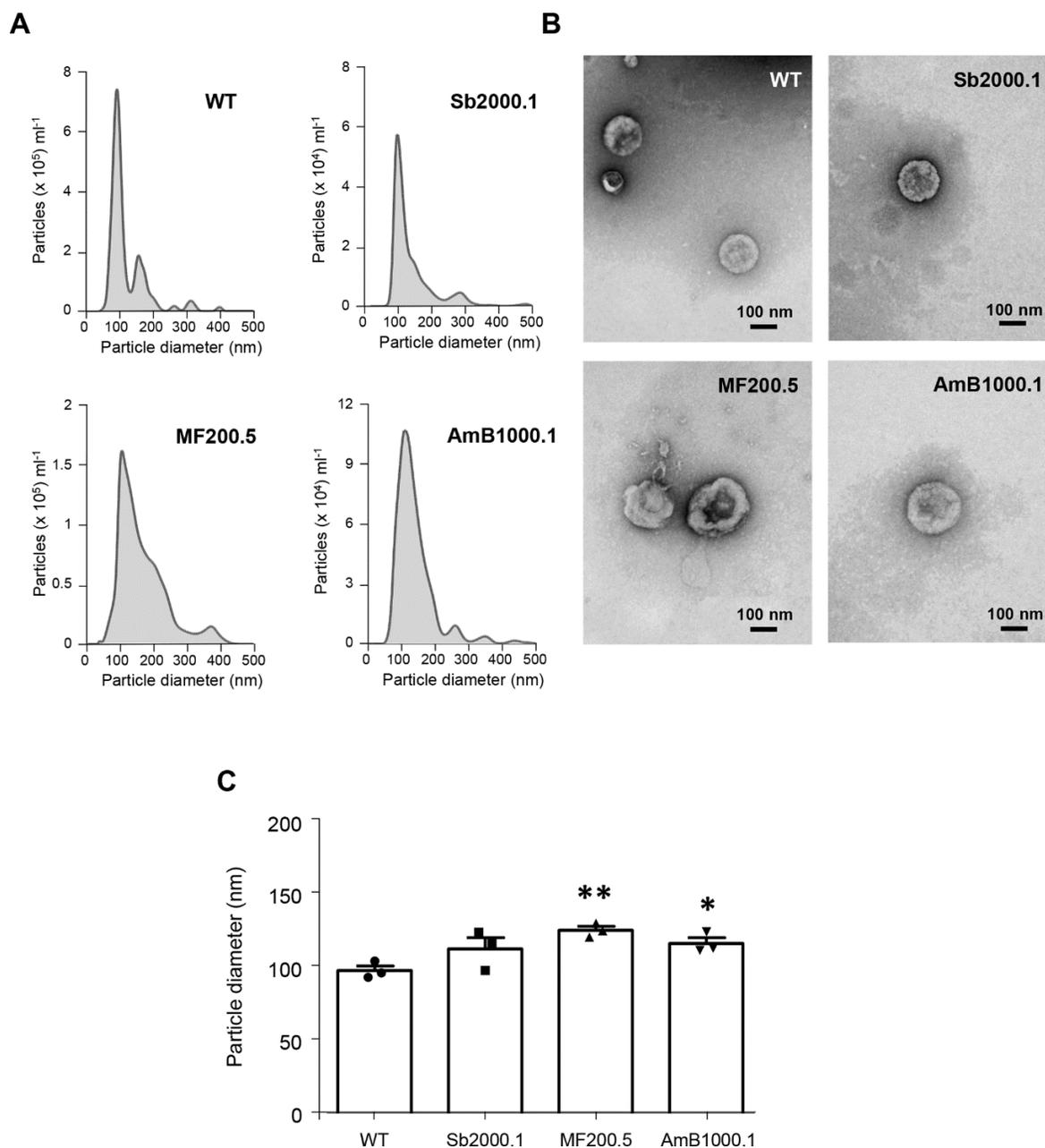
Authors want to thank Prof. Marc Ouellette for the kind gift of the Sb2000.1, MF200.5 and AmB1000.1 drug-resistant strains, and Dr Aida Mínguez-Menéndez for her help with the conception of the figures.

## Funding Statement

This work was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC; [www.nserc-crnsng.gc.ca](http://www.nserc-crnsng.gc.ca)) of Canada Discovery Grant RGPIN-2017-04480 and by the Canada foundation for Innovation ([www.innovation.ca](http://www.innovation.ca)), grant number 37324; both awarded to CFP. Work in the MO lab is supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; [www.cihr-irsc.gc.ca](http://www.cihr-irsc.gc.ca)) Grant PJT-159765 and the NSERC of Canada Discovery Grant RGPIN-2018-03849. ND and GD are respectively supported by the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) studentship programs. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

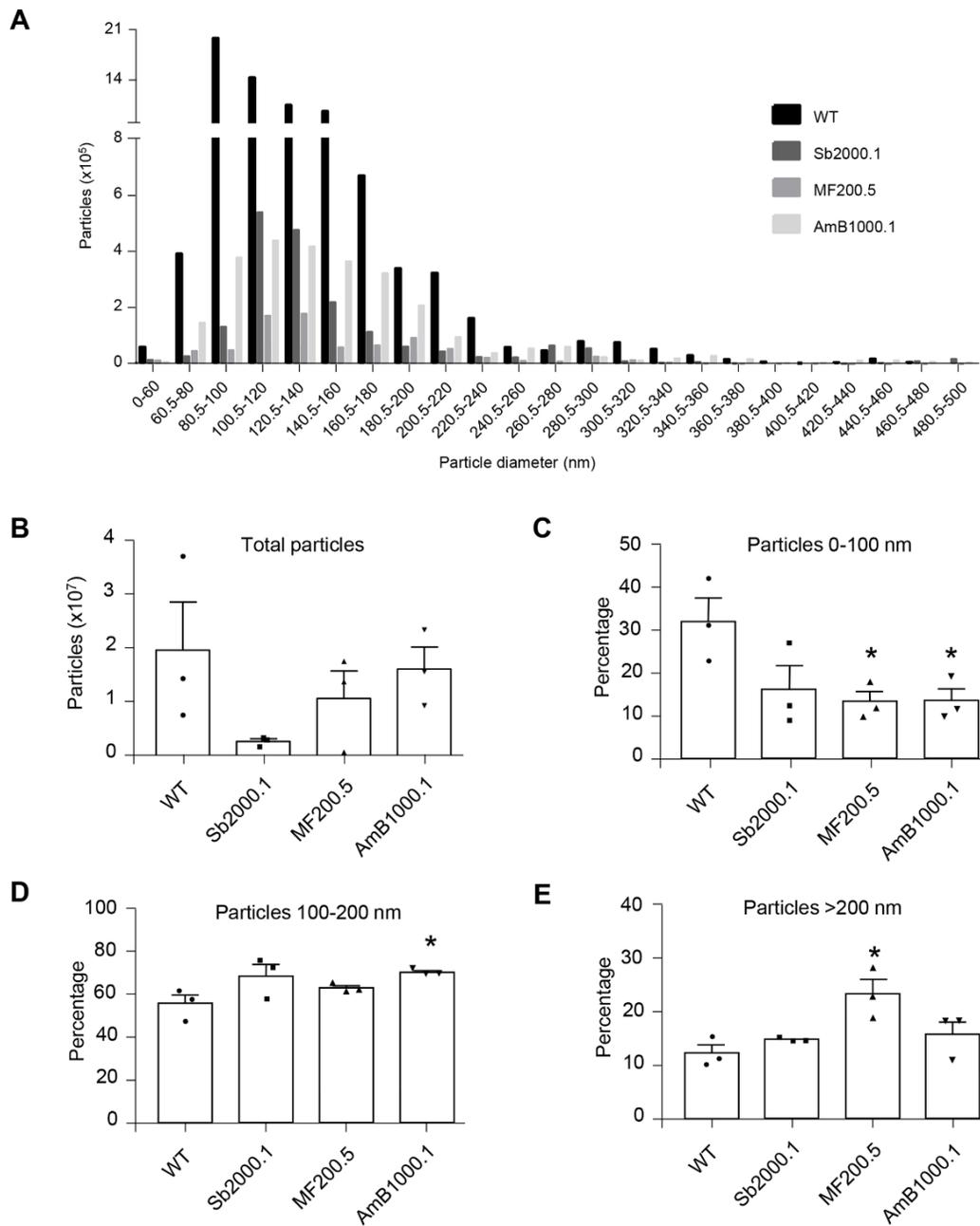


## Figures and tables



**Fig 1.** EVs released by *L. infantum* parasites differ in morphology and size depending on their drug-resistance background.

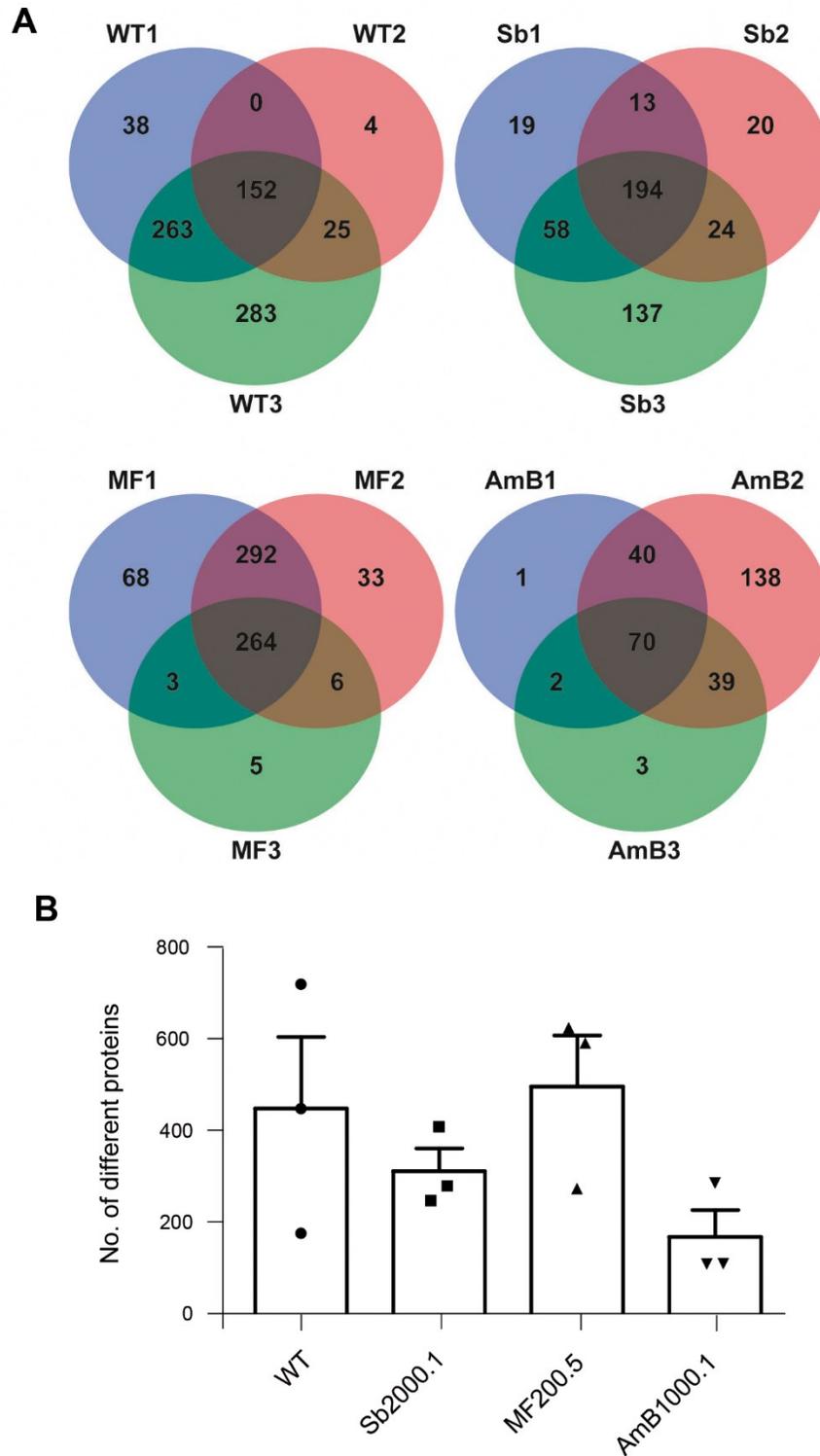
**(A)** Particle size distributions obtained by nanoparticle tracking analysis of *L. infantum* WT, and drug resistant Sb2000.1, MF200.5 and AmB1000.1 strains. Results were normalized per  $10^6$  parasites. **(B)** EVs derived from *L. infantum* WT, and drug resistant Sb2000.1, MF200.5 and AmB1000.1 promastigotes were prepared for TEM by negative staining. **(C)** Comparison of the modal average size of the EVs isolated from WT, Sb2000.1, MF200.5 and AmB1000.1 promastigotes. Differences were statistically evaluated by unpaired t-test (\* $p \leq 0.05$ , (\*\* $p \leq 0.01$ ). In a–c, the results are representative of at least three independent experiments with similar data. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008439.g001>



**Fig 2.** EVs of drug-resistant *L. infantum* show altered particle profiles and EV secretion capacity.

(A) *L. infantum* WT and drug-resistant strains were compared in terms of number of particles per category (size) between 0 nm and 500 nm using NTA. One representative image of three experiments is shown (experiments 2 and 3 are shown in S1). (B) Total number of particles, from 0 nm to 500 nm, secreted by WT, Sb2000.1, MF200.5 and AmB1000.1. (C) Percentage of particles corresponding to 0–100 nm. (D) Percentage of particles corresponding to 100–200 nm. (E) Percentage of particles corresponding to 200–500 nm. In A–E, the results are representative of at least three independent experiments with similar data. Differences were statistically evaluated by unpaired t-test (\* $p < 0.05$ ).

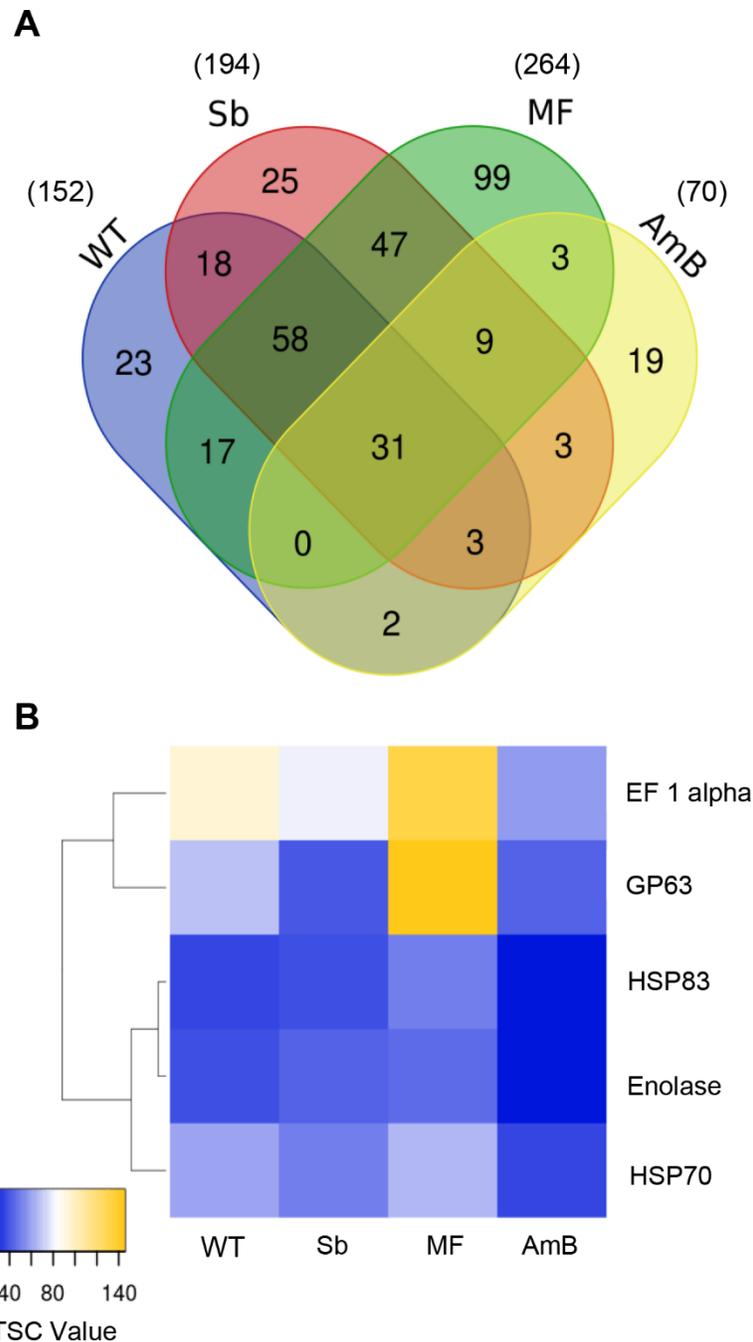
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008439.g002>



**Fig 3.** Characterization of EVs' protein diversity in *L. infantum* parasites.

(A) Venn diagrams summarizing the distribution of the identified proteins by their presence/absence in three biological replicates per strain. (B) Total number of different proteins identified in EVs isolated from each strain. Horizontal lines indicate the mean value for each strain ( $n = 3$ ).

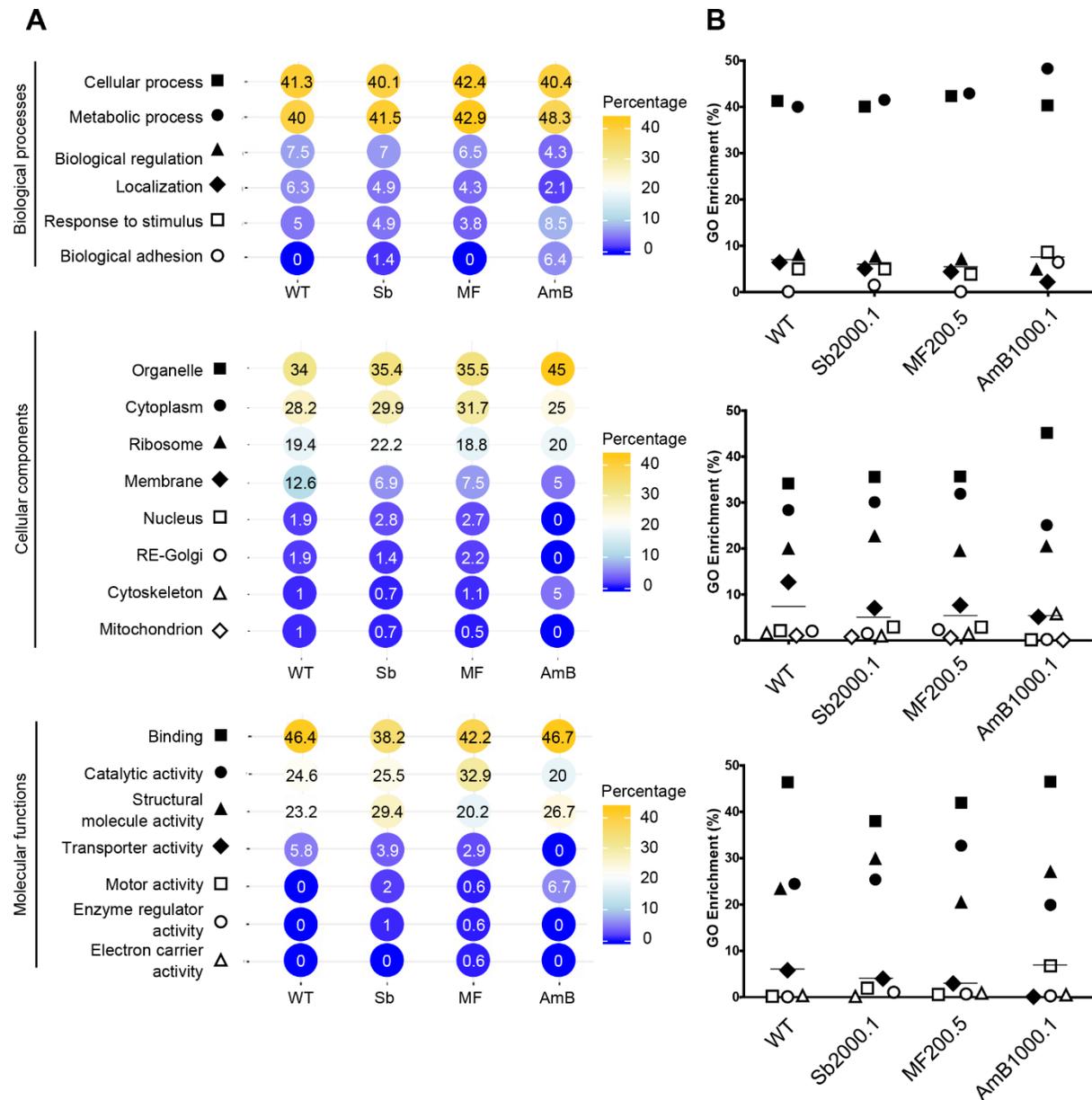
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008439.g003>



**Fig 4.** Identification of *L. infantum* EVs' conserved proteins.

**(A)** Venn diagram showing all the proteins identified in EVs isolated from *L. infantum* WT and drug-resistant strains Sb2000.1, MF200.5 and AmB1000.1. Venn diagram shows common and exclusive proteins in the different groups. The numbers of proteins in the overlapping and non-overlapping areas are indicated (only proteins found in three replicates were included). **(B)** Heatmap of leishmanial EVs' markers in particles isolated from WT, Sb2000.1, MF200.5 and AmB1000.1 *L. infantum* strains. Values correspond to the mean total number of spectra identified for each protein in three replicates.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008439.g004>



**Fig 5.** GO analysis of proteins shared by *L. infantum* WT and drug-resistant strain EVs.

(A) Shared proteins among the three replicates of each strain (WT: 152; Sb2000.1: 194; MF200.5: 264; and AmB1000.1: 70 proteins) were annotated with GO terms from UniProt GOA knowledge base using the basic Scaffold version 4.11.0. GO terms were classified according to Biological Process, Cellular Component and Molecular Function, as defined by the GO consortium. (B) General distribution of the GO hits identified in (A). Horizontal lines indicate the median values. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008439.g005>

**Table 1.** Differential enrichment of the common proteins identified in EVs released by *L. infantum* WT and the three mutant strains.

Gene ID	Protein	WT	Sb2000.1	MF200.5	AmB1000.1
LINJ_26_0150	60S ribosomal protein L7 putative	93.3	77.0 (0.83)	46.7 (0.50)	5.7 (0.06)
LINJ_36_4100	Adenosyl homocysteinase	13.7	7.7 (0.56)	12.7 (0.93)	7.0 (0.51)
LINJ_32_0410	ATP-dependent RNA helicase putative	95.7	49.0 (0.51)	89.7 (0.94)	9.7 (0.10)
LINJ_17_0180	Elongation factor 1-alpha	75.3	65.7 (0.87)	115.7 (1.54)	47.0 (0.62)
LINJ_17_0190	Elongation factor 1-alpha	112.3	92.0 (0.82)	148.3 (1.32)	66.3 (0.59)
LINJ_36_0190	Elongation factor 2	21.3	5.0 (0.23)	16.7 (0.78)	6.7 (0.31)
LINJ_14_1240	Enolase	37.0	43.3 (1.17)	45.0 (1.22)	21.7 (0.59)
LINJ_10_0520	GP63-leishmanolysin	24.7	14.3 (0.58)*	53.0 (2.15)	9.7 (0.39)*
LINJ_10_0490	GP63-leishmanolysin	113.3	65.7 (0.58)**	243.3 (2.15)	66.7 (0.59)*
LINJ_10_0800	GP63-leishmanolysin	58.7	34.0 (0.58)*	163.3 (2.78)	42.3 (0.72)
LINJ_10_0530	GP63-leishmanolysin	74.7	45.0 (0.60)*	123.3 (1.65)	49.0 (0.66)
LINJ_33_0350	Heat shock protein 83-1	36.0	37.7 (1.05)	49.7 (1.38)	21.3 (0.59)
LINJ_28_3000	Heat shock protein (Fragment)	73.7	61.3 (0.83)	85.0 (1.15)	41.0 (0.56)
LINJ_26_1220	Heatshock70-related protein 1 mitochondrial precursor putative	14.7	18.7 (1.27)	18.7 (1.27)	12.0 (0.82)
LINJ_18_1350	Heatshock protein 110 putative	18.7	15.3 (0.82)	31.3 (1.68)	5.0 (0.27)
LINJ_15_0010	Histone H4	13.0	15.3 (1.18)	24.0 (1.85)	5.3 (0.41)
LINJ_32_3100	Nucleoside diphosphate kinase	14.7	8.3 (0.57)*	19.0 (1.30)	7.3 (0.50)**
LINJ_09_0950	Polyubiquitin	13.3	8.7 (0.65)	7.7 (0.58)	6.3 (0.48)
LINJ_04_0750	Putative 60S ribosomal protein L10	86.7	70.7 (0.82)	46.3 (0.53)	14.3 (0.17)
LINJ_16_0470	Putative 60S ribosomal protein L21	42.3	35.7 (0.84)	44.0 (1.04)	6.7 (0.16)
LINJ_34_3440	Putative 60S ribosomal protein L21	42.0	36.7 (0.87)	44.3 (1.06)	6.7 (0.16)
LINJ_27_2350	Putative heat shock protein DNAJ	9.3	4.7 (0.50)	10.3 (1.11)	4.0 (0.43)
LINJ_28_3060	Putative heat shock protein hsp70	90.3	72.7 (0.80)	92.3 (1.02)	48.7 (0.54)
LINJ_27_0620	Putative small GTP-binding protein Rab1	9.3	3.7 (0.39)	9.3 (1.00)	4.3 (0.46)
LINJ_31_1240	Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump1 putative	36.3	9.3 (0.26)	47.0 (1.24)	10.7 (0.29)
LINJ_35_5450	Pyruvate kinase	10.7	6.0 (0.56)	10.0 (0.94)	11.0 (1.03)
LINJ_36_1420	Transitional endoplasmic reticulum ATPase putative	12.7	5.7 (0.45)	11.3 (0.89)	4.3 (0.34)
LINJ_13_1450	Tubulin alpha chain	52.7	44.7 (0.85)	91.3 (1.73)*	25.7 (0.49)
LINJ_08_1290	Tubulin beta chain	46.3	39.0 (0.84)	130.3 (2.81)*	28.3 (0.61)
LINJ_08_1290	Tubulin beta chain	45.0	37.0 (0.82)	129.7 (2.88)*	29.3 (0.65)
LINJ_26_1960	Uncharacterized protein	13.7	14.0 (1.02)	18.3 (1.34)	12.7 (0.93)

Numbers correspond to average Total Spectrum Count (n = 3). Numbers between parentheses depict the average fold change of the mutant compared with the WT. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (unpaired t-test).

**Table 2.** Unique proteins identified in EVs isolated from WT *L. infantum* strain.

	Gene ID	Protein	Total Spectrum Count <sup>1</sup>	(Trans)membrane protein	Unconventional secretion prediction <sup>2</sup>	Signal peptide <sup>3</sup>
1	LINJ_31_0450	Putative cytoskeleton associated protein CAP5.5	21.3	no	no (0.465)	no
2	LINJ_31_0820	C2 domain protein - putative	8.3	no	no (0.154)	no
3	LINJ_31_1860	Aminoacid permease	8.0	yes	yes (0.662)	no
4	LINJ_13_1500	Programmed cell death 6 protein-like protein	7.7	no	yes (0.937)	no
5	LINJ_35_2080	Putative calcium motive P-type ATPase	7.7	yes	yes (0.612)	no
6	LINJ_12_0668	Surfaceantigenprotein2-putative	7.3	yes	no (0.295)	yes
7	LINJ_12_0490	Glucose-6-phosphate isomerase	7.0	no	no (0.452)	no
8	LINJ_31_2670	Putative calreticulin	7.0	no	no (0.498)	yes
9	LINJ_19_1280	SPFH domain / Band 7 family - putative	4.7	no	no (0.526)	no
10	LINJ_06_1360	CLN3 protein putative	4.3	yes	no (0.280)	no
11	LINJ_28_2050	Zinc transporter3-putative	3.7	yes	no (0.514)	yes
12	LINJ_16_1450	ADP-ribosylationfactor-like-putative	3.3	no	no (0.342)	no
13	LINJ_06_1330	Coproporphyrinogen III oxidase	3.3	no	no (0.556)	no
14	LINJ_31_0810	Putative c2 domain protein	3.3	no	no (0.336)	no
15	LINJ_29_2610	Vacuolar protein sorting associated protein 4	3.3	no	no (0.387)	no
16	LINJ_36_2340	Plasma-membrane choline transporter putative	3.0	yes	yes (0.863)	no
17	LINJ_10_0380	Pteridine transporter putative	3.0	yes	no (0.361)	no
18	LINJ_09_0960	Putative ef-hand protein 5	3.0	no	no (0.311)	no
19	LINJ_36_1680	Putative universal minicircle sequence binding protein	3.0	no	yes (0.822)	no
20	LINJ_14_0490	Amastin surface glycoprotein putative	2.3	yes	yes (0.838)	no
21	LINJ_31_0050	BT1 family MFS sugar transport protein putative	2.3	yes	no (0.466)	no
22	LINJ_03_0190	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase putative	2.3	no	no (0.559)	no
23	LINJ_27_2520	Putative cysteine peptidase, Clan CA, family C2	1.3	no	sequence too long to be analyzed	
Total number of proteins				9 (39.1%)	5 (26.0%)	3 (13.0%)

<sup>1</sup> Mean Total Spectrum Count obtained with the LC-MS/MS analyses.

<sup>2</sup> NM score calculated using the SecretomeP 2.0 Server. Proteins with an NM score higher than 0.600 that are not predicted to have a signal peptide are considered non-classically secreted proteins.

<sup>3</sup> Signal peptides were predicted using SignalP Server integrated in SecretomeP 2.0 Server.

**Table 3.** Unique proteins identified in EVs isolated from Sb2000.1 *L. infantum* strain.

	Gene ID	Protein	Total Spectrum Count <sup>1</sup>	(Trans)membrane protein	Unconventional secretion prediction <sup>2</sup>	Signal peptide <sup>3</sup>
1	LINJ_07_0960	Hypothetical protein conserved	17.3	yes	0.693, but prediction of a peptide signal	yes
2	LINJ_30_3650	40S ribosomal protein S14	15.3	no	yes (0.693)	no
3	LINJ_28_1050	40S ribosomal protein S14	15.3	no	yes (0.695)	no
4	LINJ_13_1510	SPRYdomain/HECT-domain (Ubiquitin-transferase) putative	14.3	no	sequence too long to be analyzed	
5	LinJ_15_0540	Ecotin-like protein 3	10.0	no	no (0.343)	no
6	LINJ_33_2070	Ribosomal protein L37	6.7	no	yes (0.783)	no
7	LINJ_34_3420	Uncharacterized protein	5.7	yes	0.825, but prediction of a peptide signal	yes
8	LINJ_16_0510	Hypothetical protein conserved	5.3	yes	no (0.126)	yes
9	LINJ_02_0340	Putative proteasome regulatory non-ATPase subunit 6	4.7	no	no (0.097)	no
10	LINJ_27_0500	Putative calpain-like cysteine peptidase	4.0	no	sequence too long to be analyzed	
11	LINJ_19_0560	Hypothetical protein conserved	3.7	yes	0.653, but prediction of a peptide signal	yes
12	LINJ_22_0440	Putative proteasome regulatory ATPase subunit 1	3.7	no	yes (0.659)	no
13	LINJ_28_0090	Adenylate cyclase-like protein	3.3	no	no (0.358)	no
14	LINJ_20_1310	Domain of unknown function (DUF1935) - putative	3.3	no	no (0.599)	no
15	LINJ_21_0830	Hypothetical protein conserved	3.0	no	no (0.402)	no
16	LINJ_28_3090	Malate dehydrogenase	3.0	no	no (0.447)	no
17	LINJ_16_1550	Putative kinesin	2.7	no	no (0.394)	no
18	LINJ_32_4040	Cysteine peptidase - putative	2.3	no	yes (0.620)	no
19	LINJ_30_1710	SmallGTP-binding protein Rab28 putative	2.3	no	no (0.450)	no
20	LINJ_01_0010	Protein of unknown function (DUF2946)	2.0	yes	no (0.085)	yes
21	LINJ_29_2550	Phosphodiesterase putative	1.7	no	no (0.354)	no
22	LINJ_25_1640	Putative casein kinase I	1.3	no	no (0.559)	no
23	LINJ_31_1130	Putative N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	1.3	no	no (0.530)	no
24	LINJ_32_2610	Hypothetical protein conserved	1.3	no	no (0.408)	no
25	LINJ_20_0160	Hypothetical protein conserved	1.0	no	no (0.080)	no
Total number of proteins				5 (20.0%)	5 (20.0%)	5 (20.0%)

<sup>1</sup> Mean Total Spectrum Count obtained with the LC-MS/MS analyses.

<sup>2</sup> NM score calculated using the SecretomeP 2.0 Server. Proteins with an NM score higher than 0.600 that are not predicted to have a signal peptide are considered non-classically secreted proteins.

<sup>3</sup> Signal peptides were predicted using SignalP Server integrated in SecretomeP 2.0 Server.

Table 4. Unique proteins identified in EVs isolated from MF200.5 *L. infantum* strain.

	Gene ID	Protein	Total Spectrum Count <sup>1</sup>	(Trans)membrane protein	Unconventional secretion prediction <sup>2</sup>	Signal peptide <sup>3</sup>
1	LINJ_29_2620	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	69.3	no	no (0.295)	no
2	LINJ_27_1710	Glycosomal phosphoenol pyruvate carboxykinase, putative	66.3	no	no (0.279)	no
3	LINJ_21_0310	Phosphotransferase	52.0	no	no (0.454)	no
4	LINJ_11_1000	Pyruvate, phosphate dikinase	34.3	no	no (0.442)	no
5	LINJ_36_1320	Fructose-bisphosphate aldolase	32.0	no	no (0.547)	no
6	LINJ_35_1190	Putative NADH-dependent fumarate reductase	30.3	no	no (0.285)	no
7	LINJ_02_0430	Voltage-dependent anion-selective channel - putative	30.0	no	no (0.550)	no
8	LINJ_30_2480	Heatshock70-related protein1 - mitochondrial precursor putative	28.0	no	no (0.234)	no
9	LINJ_36_7320	Putative eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8	26.0	no	no (0.129)	no
10	LINJ_16_0560	Orotidine 5 phosphate decarboxylase/ototate phosphoribosyl transferase putative	19.0	no	yes (0.850)	no
11	LINJ_35_3150	ATP-dependent RNA helicase putative	18.0	no	no (0.171)	no
12	LINJ_17_0870	GMP reductase	17.7	no	yes (0.655)	no
13	LINJ_29_2310	Dynamin-1-like protein	14.7	no	no (0.454)	no
14	LINJ_36_0270	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	14.3	no	no (0.259)	no
15	LINJ_17_0010	Hypothetical protein conserved	14.3	no	no (0.309)	no
16	LINJ_36_7070	ATP synthase delta (OSCP) subunit putative	12.0	no	yes (0.807)	no
17	LINJ_32_3470	Chaperonin alpha subunit-putative	11.3	no	no (0.414)	no
18	LINJ_17_1390	Translation initiation factor putative	11.3	no	no (0.266)	no
19	LINJ_35_3750	Putative Gim5A protein	10.3	no	yes (0.705)	no
20	LINJ_18_0510	Aconitate hydratase	10.0	no	no (0.493)	no
21	LINJ_30_3430	Phosphoglycerate kinase	10.0	no	no (0.501)	no
22	LINJ_30_0120	Alkyl dihydroxy acetone phosphate synthase O	9.3	no	no (0.400)	no
23	LINJ_32_3200	Leucine-rich repeat protein-putative	9.3	no	no (0.568)	no
24	LINJ_22_1390	Alanine-tRNA ligase	9.0	no	no (0.324)	no
25	LINJ_36_1000	40S ribosomal protein S18-putative	8.3	no	no (0.667)	no
26	LINJ_10_0070	Dehydrogenase like protein	8.3	yes	0.820, but prediction of a peptide signal	yes

27	LINJ_23_0050	Peroxidoxin	8.3	no	yes (0.854)	no
28	LINJ_24_2150	Transketolase	8.3	no	no (0.569)	no
29	LINJ_35_1490	Arginase	8.0	no	no (0.376)	no
30	LINJ_29_0120	Proteasome regulatory non-ATPase subunit putative	7.7	no	no (0.519)	no
31	LINJ_07_0710	Hypothetical protein conserved	7.3	no	yes (0.609)	no
32	LINJ_05_0280	Protein tyrosine phosphatase putative	7.3	yes	no (0.100)	no
33	LINJ_32_2280	Hypothetical protein conserved	7.0	no	yes (0.628)	no
34	LINJ_11_0100	Seryl-tRNA synthetase putative	7.0	no	no (0.330)	no
35	LINJ_24_0870	Triosephosphate isomerase	7.0	no	no (0.413)	no
36	LINJ_24_0870	Uncharacterized protein	7.0	yes	no (0.254)	yes
37	LINJ_30_3080	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7-like protein	6.7	no	no (0.196)	no
38	LINJ_19_1590	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	6.7	no	no (0.331)	no
39	LINJ_25_2520	Uncharacterized protein	6.7	no	no (0.281)	no
40	LINJ_35_1000	Aldose 1 epimerase putative	6.3	no	no (0.598)	no
41	LINJ_32_3510	Dihydrolipoyl dehydrogenase	6.3	no	no (0.463)	no
42	LINJ_36_3220	Fibrillarlin	6.0	no	no (0.334)	no
43	LINJ_28_1830	Hypothetical protein conserved	6.0	no	no (0.129)	no
44	LINJ_29_2300	Hypothetical protein conserved	6.0	yes	0.675, but prediction of a peptide signal	yes
45	LINJ_19_1560	Peptidylprolyl isomerase	6.0	no	yes (0.665)	no
46	LINJ.20.0120	Phosphoglycerate kinase	6.0	no	no (0.226)	no
47	LINJ_11_1100	Sterol14-alpha-demethylase putative	6.0	no	0.829, but prediction of a peptide signal	yes
48	LINJ_36_3940	40S ribosomal protein S27-1 putative	5.7	no	yes (0.681)	no
49	LINJ_27_1770	Trypanothione synthetase putative	5.7	no	no (0.415)	no
50	LINJ_19_1100	Proteasome regulatory non-ATPase subunit9 putative	5.3	no	no (0.532)	no
51	LINJ_36_4030	Putative glycyl tRNA synthetase	5.3	no	no (0.436)	no
52	LINJ_34_0010	Uncharacterized protein	5.3	no	yes (0.738)	no
53	LINJ_32_3460	Glucosamine-6-phosphate isomerase	5.0	no	yes (0.835)	no
54	LINJ_36_6080	Nitroreductase family putative	5.0	no	no (0.511)	no
55	LINJ_36_7280	Protein disulfide-isomerase	5.0	no	0.649, but prediction of a peptide signal	yes
56	LINJ_35_0370	ATP-dependent DEAD-box RNA helicase putative	4.7	no	no (0.407)	no

57	LINJ_32_1060	Chaperon incontinaining t-complex protein putative	4.7	no	no (0.407)	no
58	LINJ_15_0270	Lysine-tRNA ligase	4.7	no	no (0.337)	no
59	LINJ_22_0310	40S ribosomal protein S15 putative	4.3	no	no (0.453)	no
60	LINJ_10_0560	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	4.3	no	yes (0.633)	no
61	LINJ_27_1150	Putative T-complex protein 1, beta subunit	4.3	no	no (0.393)	no
62	LINJ_30_3480	Protein_mkt1_-_putative	4.3	no	no (0.505)	no
63	LINJ_36_4380	Zeta-crystallin/NADPH-oxidoreductase-like protein	4.3	no	yes (0.670)	no
64	LINJ_27_1230	Arginyl-tRNA synthetase-putative	4.0	no	no (0.393)	no
65	LINJ_27_2020	RNA-binding protein putative	4.0	no	no (0.378)	no
66	LINJ_36_3750	Cysteine synthase	3.7	no	no (0.411)	no
67	LINJ_36_4070	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	3.7	no	no (0.405)	no
68	LINJ_02_0330	Putative casein kinase II, alpha chain	3.7	no	no (0.598)	no
69	LINJ_28_2480	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	3.3	no	no (0.557)	no
70	LINJ_25_1670	Hypothetical protein conserved	3.3	no	no (0.451)	no
71	LINJ_36_2510	Methyltransferase	3.3	no	no (0.339)	no
72	LINJ_29_2270	Rab GDP dissociation inhibitor	3.3	no	no (0.541)	no
73	LINJ_36_5330	Hypothetical protein conserved	3.3	no	no (0.344)	no
74	LINJ_06_0120	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	3.0	no	0.842, but prediction of a peptide signal	yes
75	LINJ_03_0670	DEAD/DEAH box helicase /Type III restriction enzyme res subunit - putative	3.0	no	no (0.324)	no
76	LINJ_19_0090	Fibrillarin putative	2.7	no	yes (0.659)	no
77	LINJ_18_0270	Glycogen synthase kinase 3 putative	2.7	no	no (0.499)	no
78	LINJ_11_0640	Putative aminopeptidase	2.7	no	no (0.499)	no
79	LINJ_10_0210	Putative nucleolar protein	2.7	no	no (0.396)	no
80	LINJ_29_2680	Putative serine/threonine-protein kinase	2.7	no	yes (0.613)	no
81	LINJ_32_2330	SAC3/GANP/Nin1/mts3/eIF-3 p25 family /COP9 signalosome - subunit CSN8 - putative	2.7	no	yes (0.850)	no
82	LINJ_29_2350	Aminopeptidase	2.3	no	yes (0.606)	no
83	LINJ_36_6170	Halo acid dehalogenase-like hydrolase putative	2.3	no	0.714, but prediction of a peptide signal	yes
84	LINJ_18_0670	HEAT repeats/HEAT repeat putative	2.3	no	no (0.439)	no
85	LINJ_09_1130	Translation initiation factor EIF-2B gamma subunit putative	2.3	no	yes (0.655)	no

86	LINJ_35_2400	Aminopeptidase P putative	2.0	no	yes (0.680)	no
87	LINJ_08_0960	Cysteine peptidase B (CPB)	2.0	no	0.790, but prediction of a peptide signal	yes
88	LINJ_34_3160	Glucose-6-phosphate 1-epimerase	2.0	no	yes (0.606)	no
89	LINJ_28_3050	Hypothetical protein conserved	2.0	no	no (0.183)	no
90	LINJ_35_2090	Kinesin putative	2.0	no	no (0.548)	no
91	LINJ_03_0240	Ribosomal protein L38 putative	2.0	no	yes (0.723)	no
92	LINJ_15_1170	Cyclic nucleotide-binding domain containing protein - putative	2.0	no	no (0.367)	no
93	LINJ_27_1300	60S acidic ribosomal protein P0	1.7	no	no (0.208)	no
94	LINJ_21_0980	Hypoxanthine phosphoribosyl transferase	1.7	no	no (0.587)	no
95	LINJ_36_1390	N-acetyltransferase subunit Nat1 putative	1.7	no	no (0.346)	no
96	LINJ_31_3080	Acetyl-CoA carboxylase putative	1.3	no	no (0.316)	no
97	LINJ_35_0840	Aspartate aminotransferase putative	1.3	no	no (0.587)	no
98	LINJ_31_0890	Ras-like small GTPases putative	1.3	no	no (0.208)	no
99	LINJ_27_1920	GMP-PDE-delta subunit-putative/Pfam:PF05351	1.0	no	yes (0.664)	no
Total number of proteins				4 (4.0%)	22 (21.8%)	8 (7.9%)

<sup>1</sup> Mean Total Spectrum Count obtained with the LC-MS/MS analyses.

<sup>2</sup> NM score calculated using the SecretomeP 2.0 Server. Proteins with an NM score higher than 0.600 that are not predicted to have a signal peptide are considered non-classically secreted proteins.

<sup>3</sup> Signal peptides were predicted using SignalP Server integrated in SecretomeP 2.0 Sever.

**Table 5.** Unique proteins identified in EVs isolated from AmB1000.1 *L. infantum* strain.

	Gene ID	Protein	Total Spectrum Count <sup>1</sup>	(Trans)membrane protein	Unconventional secretion prediction <sup>2</sup>	Signal peptide <sup>3</sup>
1	LINJ_27_1630	Hypothetical protein conserved	37.7	no	no (0.522)	no
2	LINJ_04_1250	Actin	15.3	no	no (0.513)	no
3	LINJ_29_0110	C2 domain in Dock180 and Zizimin proteins putative	14.0	no	no (0.272)	no
4	LINJ_31_0520	Cytoskeleton-associated protein	9.3	no	no (0.465)	no
5	LINJ_26_2510	Hypothetical protein conserved	9.0	no	no (0.107)	no
6	LINJ_05_0580	Uncharacterized protein	8.0	yes	no (0.196)	no
7	LINJ_13_0090	Putative carboxypeptidase	7.3	no	no (0.384))	no
8	LINJ_23_0410	Putative NADP dependent alcohol dehydrogenase	7.3	no	no (0.303)	no
9	LINJ_35_1030	Putative casein kinase	7.0	no	no (0.343)	no
10	LINJ_31_2890	ADP-ribosylation factor putative	5.7	no	no (0.512)	no
11	LINJ_34_1630	p25-alpha putative	5.7	no	yes (0.617)	no
12	LINJ_36_0080	Stress-inducible protein ST11 homolog	4.7	no	yes (0.645)	no
13	LINJ_19_0250	Kinesin-like protein	4.3	no	no (0.136)	no
14	LINJ_27_1770	Putative trypanothione synthetase	3.7	no	no (0.417)	no
15	LINJ_23_1200	Hydrophilic acylated surface protein a (HASPA1)	2.7	no	no (0.283)	no
16	LINJ_25_2100	Hypothetical protein conserved	2.7	no	no (0.487)	no
17	LINJ_36_3360	14-3-3 protein-like protein	2.3	no	no (0.240)	no
18	LINJ_26_1480	Hypothetical protein conserved	1.7	no	yes (0.867)	no
19	LINJ_23_0290	Pentamidine resistance protein 1	1.7	yes	no (0.497)	no
Total number of proteins				2 (10.5%)	3 (15.8%)	0 (0.0%)

<sup>1</sup> Mean Total Spectrum Count obtained with the LC-MS/MS analyses.

<sup>2</sup> NM score calculated using the SecretomeP 2.0 Server. Proteins with an NM score higher than 0.600 that are not predicted to have a signal peptide are considered non-classically secreted proteins.

<sup>3</sup>Signal peptides were predicted using SignalP Server integrated in SecretomeP 2.0 Sever.

## Supporting information

### **S1 Fig.** EVs released by drug-resistant *L. infantum* parasites show altered particle profiles and secretory capacity.

*L. infantum* WT and drug-resistant strains were compared in terms of number of particles per category (size) between 0 nm and 500 nm using NTA. (A-B) Two representative images of three experiments is shown (experiment 1 is shown in Fig 2A). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008439.s001> (PDF)

### **S2 Fig.** EVs released by drug-resistant *L. infantum* parasites show altered particle distributions.

Particle distribution analysis corresponding to the range of 0 to 500 nm. Horizontal lines indicate the median value for each particle size ( $n = 3$ ). Whiskers correspond to minimum and maximum values. Differences were statistically evaluated using Shapiro-Wilk Test for normality, followed by Kruskal-Wallis rank sum test ( $****p \leq 0.0001$ ). Nemenyi post-hoc test pinpointed significant differences between WT and Sb2000.1 EVs distributions ( $p \leq 0.0001$ ), as well as between Sb2000.1 and the other two resistant strains ( $**p \leq 0.01$  for Sb2000.1 vs. MF200.5;  $****p \leq 0.0001$  for Sb2000.1 vs. AmB1000.1).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008439.s002> (PDF)

### **S3 Fig.** Volcano plot of proteins found in *L. infantum* EVs.

The volcano plot shows the intensity of protein expression between EVs from Sb2000.1 (A), MF200.5 (B) and AmB1000.1 (C) cells and EVs from *L. infantum* WT cells. The horizontal axis represents the log<sub>2</sub> fold change and the vertical axis represents  $-\log_{10}$  (Fisher exact test, P value).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008439.s003> (PDF)

### **S4 Fig.** Study of the potential impact of protein diversity in protein abundance.

Standard deviation scatterplot depicting the mean and standard deviation values of the abundance (normalized total spectra) of each EVs protein transformed into base-10 logarithms for WT, Sb2000.1, MF200.5 and AmB1000.1 ( $n = 3$ ). X-axis: Log<sub>10</sub> of the mean value of the estimated protein abundance across those proteins retained for each strain (shared among the three replicates). Y-axis: Log<sub>10</sub> of standard deviation of the estimated protein abundance computed across those proteins retained for each strain (shared among the three replicates). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008439.s004> (PDF)



**S5 Fig. Cross-correlation between excluded and common pools of proteins used for identifying enriched proteins in EVs.**

Enriched proteins common to the three replicates of EVs isolated from WT (A), Sb2000.1 (B), MF200.5 (C) and AmB1000.1 (D) and their relationship with the pool of proteins excluded because they were not conserved through the replicates of the other strains.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008439.s005> (TIF)

**S1 Table. Drug sensitivity profiles of the different strains used in this study.**

EC<sub>50</sub> values were calculated from the dose-response curves after performing a nonlinear fitting with the GraphPad 8.0 software program. An average of three independent biological replicates is shown ± standard error of the mean. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008439.s006> (PDF)

**S2 Table. Proteins common to EVs released by the three drug-resistant strains but not by the WT.**

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008439.s007> (PDF)

**S1 Data. Raw proteomic data used in this study.** Total Spectra of *Leishmania* EVs using *Leishmania infantum* database. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008439.s008> (XLSX)

**Data Availability**

All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**References**

1. Fernandez-Prada C, Minguéz-Menéndez A, Pena J, Tunes LG, Pires DEV, Monte-Neto R. Repurposed molecules: A New Hope in Tackling Neglected Infectious Diseases. In: Roy K, editor. *In Silico Drug Design 1st Edition: Repurposing Techniques and Methodologies*. Netherlands: Elsevier; 2019.
2. Sundar S, Singh B. Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;1–20. Epub 2018/05/03. pmid:29718739. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
3. McCall LI, Zhang WW, Matlashewski G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. *PLoS Pathog*. 2013;9(1):e1003053. pmid:23300451; PubMed Central PMCID: PMC3536654. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
4. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(9):581–96. pmid:17714672. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
5. Okwor I, Uzonna J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94(3):489–93. pmid:26787156; PubMed Central PMCID: PMC4775878. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
6. Abranches P, Silva-Pereira MC, Conceicao-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol*. 1991;77(4):557–61. Epub 1991/08/01. pmid:1865262. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
7. PAHO. Epidemiological Report of the Americas. Leishmaniases, Pan American Health Organization. 2019.

8. Arce A, Estirado A, Ordobas M, Sevilla S, Garcia N, Moratilla L, et al. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 2013;18(30):20546. Epub 2013/08/10. PMID:23929177. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
9. Uranw S, Hasker E, Roy L, Meheus F, Das ML, Bhattarai NR, et al. An outbreak investigation of visceral leishmaniasis among residents of Dharan town, eastern Nepal, evidence for urban transmission of *Leishmania donovani*. *BMC Infect Dis.* 2013;13:21. Epub 2013/01/19. PMID:23327548; PubMed Central PMCID: PMC3552873. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
10. Abubakar A, Ruiz-Postigo JA, Pita J, Lado M, Ben-Ismaïl R, Argaw D, et al. Visceral leishmaniasis outbreak in South Sudan 2009–2012: epidemiological assessment and impact of a multisectoral response. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(3):e2720. Epub 2014/03/29. PMID:24675573; PubMed Central PMCID: PMC3967947. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
11. Babuadze G, Alvar J, Argaw D, de Koning HP, Iosava M, Kekelidze M, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Georgia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(3):e2725. Epub 2014/03/08. PMID:24603768; PubMed Central PMCID: PMC3945224. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
12. Solano-Gallego L, Miro G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors.* 2011;4:86. Epub 2011/05/24. PMID:21599936; PubMed Central PMCID: PMC3125381. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
13. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:27066. Epub 2015/05/14. PMID:25979354; PubMed Central PMCID: PMC4433489. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
14. Devhare PB, Ray RB. Extracellular vesicles: Novel mediator for cell to cell communications in liver pathogenesis. *Mol Aspects Med.* 2018;60:115–22. Epub 2017/11/11. PMID:29122679; PubMed Central PMCID: PMC5856598. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
15. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1):1535750. Epub 2018/11/23. PMID:30637094; PubMed Central PMCID: PMC6322352. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
16. Kao CY, Papoutsakis ET. Extracellular vesicles: exosomes, microparticles, their parts, and their targets to enable their biomanufacturing and clinical applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2019;60:89–98. Epub 2019/03/07. PMID:30851486. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
17. Kandasamy K, Mohan SS, Raju R, Keerthikumar S, Kumar GS, Venugopal AK, et al. NetPath: a public resource of curated signal transduction pathways. *Genome Biol.* 2010;11(1):R3. Epub 2010/01/12. PMID:20067622; PubMed Central PMCID: PMC2847715. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
18. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:27066. Epub 2015/05/17. PMID:25979354; PubMed Central PMCID: PMC4433489. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
19. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol.* 2019;21(1):9–17. Epub 2019/01/04. PMID:30602770. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
20. Marcilla A, Martin-Jaular L, Trelis M, de Menezes-Neto A, Osuna A, Bernal D, et al. Extracellular vesicles in parasitic diseases. *J Extracell Vesicles.* 2014;3:25040. Epub 2014/12/30. PMID:25536932; PubMed Central PMCID: PMC4275648. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
21. Atayde VD, Hassani K, da Silva Lira Filho A, Borges AR, Adhikari A, Martel C, et al. *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. *Cell Immunol.* 2016;309:7–18. Epub 2016/08/09. PMID:27499212. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
22. Olivier M, Minguéz-Menéndez A, Fernández-Prada C. *Leishmania* Viannia guyanensis. *Trends Parasitol.* 2019;35(12):1018–9. Epub 2019/07/12. PMID:31292065. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
23. Olivier M, Fernández-Prada C. *Leishmania* and its exosomal pathway: a novel direction for vaccine development. *Future Microbiol.* 2019;14:559–61. Epub 2019/06/01. PMID:31148479. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
24. Szempruch AJ, Dennison L, Kieft R, Harrington JM, Hajduk SL. Sending a message: extracellular vesicles of pathogenic protozoan parasites. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(11):669–75. Epub 2016/09/13. PMID:27615028. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)

25. Szempruch AJ, Sykes SE, Kieft R, Dennison L, Becker AC, Gartrell A, et al. Extracellular Vesicles from *Trypanosoma brucei* Mediate Virulence Factor Transfer and Cause Host Anemia. *Cell*. 2016;164(1–2):246–57. Epub 2016/01/16. pmid:26771494; PubMed Central PMCID: PMC4715261. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
26. Mantel PY, Hjelmqvist D, Walch M, Kharoubi-Hess S, Nilsson S, Ravel D, et al. Infected erythrocyte-derived extracellular vesicles alter vascular function via regulatory Ago2-miRNA complexes in malaria. *Nat Commun*. 2016;7:12727. Epub 2016/10/11. pmid:27721445; PubMed Central PMCID: PMC5062468. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
27. Mantel PY, Hoang AN, Goldowitz I, Potashnikova D, Hamza B, Vorobjev I, et al. Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. *Cell Host Microbe*. 2013;13(5):521–34. Epub 2013/05/21. pmid:23684304; PubMed Central PMCID: PMC3687518. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
28. Regev-Rudzki N, Wilson DW, Carvalho TG, Sisquella X, Coleman BM, Rug M, et al. Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. *Cell*. 2013;153(5):1120–33. Epub 2013/05/21. pmid:23683579. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
29. Hassani K, Antoniak E, Jardim A, Olivier M. Temperature-induced protein secretion by *Leishmania mexicana* modulates macrophage signalling and function. *PLoS One*. 2011;6(5):e18724. Epub 2011/05/12. pmid:21559274; PubMed Central PMCID: PMC3086886. | [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) - [Google Scholar](#)
30. Hassani K, Shio MT, Martel C, Faubert D, Olivier M. Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of *Leishmania* exosomes. *PLoS One*. 2014;9(4):e95007. Epub 2014/04/17. pmid:24736445; PubMed Central PMCID: PMC3988155. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
31. Silverman JM, Reiner NE. *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2011;1:26. Epub 2011/01/01. pmid:22919591; PubMed Central PMCID: PMC3417360. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
32. Atayde VD, da Silva Lira Filho A, Chaparro V, Zimmermann A, Martel C, Jaramillo M, et al. Exploitation of the *Leishmania* exosomal pathway by *Leishmania* RNA virus 1. *Nat Microbiol*. 2019;4(4):714–23. Epub 2019/01/30. pmid:30692670; PubMed Central PMCID: PMC30692670. | [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
33. O'Neill CP, Gilligan KE, Dwyer RM. Role of Extracellular Vesicles (EVs) in Cell Stress Response and Resistance to Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. 2019;11(2). Epub 2019/01/27. pmid:30682793; PubMed Central PMCID: PMC6406503. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
34. Leprohon P, Fernandez-Prada C, Gazanion E, Monte-Neto R, Ouellette M. Drug resistance analysis by next generation sequencing in *Leishmania*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2015;5(1):26–35. Epub 2015/05/06. pmid:25941624; PubMed Central PMCID: PMC4412915. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
35. Fernández-Prada C, Vincent IM, Gazanion É, Monte-Neto RL. Chapter 6 Omics and Their Impact on the Development of Chemotherapy Against *Leishmania*. *Drug Discovery for Leishmaniasis: The Royal Society of Chemistry*; 2018. p. 101–29. [View Article](#) | [Google Scholar](#)
36. 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. pmid:32413766. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
37. Sundar S, Singh B. Understanding *Leishmania* parasites through proteomics and implications for the clinic. *Expert Rev Proteomics*. 2018;15(5):371–90. Epub 2018/05/03. pmid:29717934; PubMed Central PMCID: PMC5970101. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
38. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci*. 2019;9:19. Epub 2019/03/01. pmid:30815248; PubMed Central PMCID: PMC6377728. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
39. Zhang C, Ji Q, Yang Y, Li Q, Wang Z. Exosome: Function and Role in Cancer Metastasis and Drug Resistance. *Technol Cancer Res Treat*. 2018;17:1533033818763450. Epub 2018/04/24. pmid:29681222; PubMed Central PMCID: PMC5949932. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
40. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(2):193–208. Epub 2017/07/25. pmid:28733901; PubMed Central PMCID: PMC5756260. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
41. Leprohon P, Legare D, Raymond F, Madore E, Hardiman G, Corbeil J, et al. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(5):1387–99. Epub 2009/01/09. pmid:19129236; PubMed Central PMCID: PMC2655676. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)

42. Brotherton MC, Bourassa S, Leprohon P, Legare D, Poirier GG, Droit A, et al. Proteomic and genomic analyses of antimony resistant *Leishmania infantum* mutant. PLoS One. 2013;8(11):e81899. Epub 2013/12/07. PMID:24312377; PubMed Central PMCID: PMC3842243. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
43. 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. Epub 2005/04/28. PMID:15855523; PubMed Central PMCID: PMC1087671. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
44. Brotherton MC, Bourassa S, Legare D, Poirier GG, Droit A, Ouellette M. Quantitative proteomic analysis of amphotericin B resistance in *Leishmania infantum*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2014;4(2):126–32. Epub 2014/07/25. PMID:25057462; PubMed Central PMCID: PMC4095042. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
45. Moreira W, Leprohon P, Ouellette M. Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. Cell Death Dis. 2011;2:e201. Epub 2011/09/02. PMID:21881603; PubMed Central PMCID: PMC3186901. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
46. 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. Epub 2016/12/03. PMID:27911896; PubMed Central PMCID: PMC5135041. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
47. Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. Anal Chem. 2003;75(17):4646–58. Epub 2003/11/25. PMID:14632076. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
48. UniProt C. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. Nucleic Acids Res. 2019;47(D1):D506–D15. Epub 2018/11/06. PMID:30395287; PubMed Central PMCID: PMC6323992. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
49. 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. Epub 2009/10/22. PMID:19843604; PubMed Central PMCID: PMC2808979. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
50. Jones P, Binns D, Chang HY, Fraser M, Li W, McAnulla C, et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. Bioinformatics. 2014;30(9):1236–40. Epub 2014/01/24. PMID:24451626; PubMed Central PMCID: PMC3998142. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
51. Verhaak RG, Sanders MA, Bijl MA, Delwel R, Horsman S, Moorhouse MJ, et al. HeatMapper: powerful combined visualization of gene expression profile correlations, genotypes, phenotypes and sample characteristics. BMC Bioinformatics. 2006;7:337. Epub 2006/07/14. PMID:16836741; PubMed Central PMCID: PMC1574351. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
52. Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, Von Heijne G, Brunak S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. Protein Eng Des Sel. 2004;17(4):349–56. Epub 2004/04/30. PMID:15115854. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
53. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat Methods. 2011;8(10):785–6. Epub 2011/10/01. PMID:21959131. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
54. R-Core-Team. A Language and Environment for Statistical Computing. 3.6.1 ed. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2020.
55. Thery C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. J Extracell Vesicles. 2018;7(1):1535750. Epub 2019/01/15. PMID:30637094; PubMed Central PMCID: PMC6322352. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
56. Atayde VD, Aslan H, Townsend S, Hassani K, Kamhawi S, Olivier M. Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan *Leishmania* within the Sand Fly Midgut. Cell Rep. 2015;13(5):957–67. Epub 2015/11/14. PMID:26565909; PubMed Central PMCID: PMC4644496. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
57. Silverman JM, Chan SK, Robinson DP, Dwyer DM, Nandan D, Foster LJ, et al. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. Genome Biol. 2008;9(2):R35. Epub 2008/02/20. PMID:18282296; PubMed Central PMCID: PMC2374696. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
58. 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. PMID:29602064. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)

59. 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. Epub 2016/12/21. pmid:27993477. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
60. Van Bockstal L, Bulte D, Hendrickx S, Sadlova J, Volf P, Maes L, et al. Impact of clinically acquired miltefosine resistance by *Leishmania infantum* on mouse and sand fly infection. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2020;13:16–21. Epub 2020/05/11. pmid:32388220; PubMed Central PMCID: PMC7215113. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
61. Hendrickx S, Van Bockstal L, Aslan H, Sadlova J, Maes L, Volf P, et al. Transmission potential of paromomycin-resistant *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(4):951–7. Epub 2019/12/31. pmid:31886863. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
62. Rai K, Cuypers B, Bhattarai NR, Uranw S, Berg M, Ostyn B, et al. Relapse after treatment with miltefosine for visceral leishmaniasis is associated with increased infectivity of the infecting *Leishmania donovani* strain. *mBio.* 2013;4(5):e00611–13. Epub 2013/10/10. pmid:24105765; PubMed Central PMCID: PMC3791894. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
63. Deep DK, Singh R, Bhandari V, Verma A, Sharma V, Wajid S, et al. Increased miltefosine tolerance in clinical isolates of *Leishmania donovani* is associated with reduced drug accumulation, increased infectivity and resistance to oxidative stress. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(6):e0005641. Epub 2017/06/03. pmid:28575060; PubMed Central PMCID: PMC5470736. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
64. Seblova V, Oury B, Eddaikra N, Ait-Oudhia K, Pralong F, Gazanion E, et al. Transmission potential of antimony-resistant *Leishmania* field isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(10):6273–6. Epub 2014/07/23. pmid:25049256; PubMed Central PMCID: PMC4187949. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
65. Dong G, Filho AL, Olivier M. Modulation of Host-Pathogen Communication by Extracellular Vesicles (EVs) of the Protozoan Parasite *Leishmania*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:100. Epub 2019/04/30. pmid:31032233; PubMed Central PMCID: PMC6470181. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
66. Ouakad M, Vanaerschot M, Rijal S, Sundar S, Speybroeck N, Kestens L, et al. Increased metacyclogenesis of antimony-resistant *Leishmania donovani* clinical lines. *Parasitology.* 2011;138(11):1392–9. Epub 2011/08/09. pmid:21819638. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
67. Barratt G, Saint-Pierre-Chazalet M, Loiseau PM. Cellular transport and lipid interactions of miltefosine. *Curr Drug Metab.* 2009;10(3):247–55. Epub 2009/05/16. pmid:19442087. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
68. Rakotomanga M, Saint-Pierre-Chazalet M, Loiseau PM. Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug-membrane interactions. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(7):2677–86. Epub 2005/06/28. pmid:15980336; PubMed Central PMCID: PMC1168669. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
69. Skotland T, Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A. Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *J Lipid Res.* 2019;60(1):9–18. Epub 2018/08/05. pmid:30076207; PubMed Central PMCID: PMC6314266. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
70. Santarem N, Racine G, Silvestre R, Cordeiro-da-Silva A, Ouellette M. Exoproteome dynamics in *Leishmania infantum*. *J Proteomics.* 2013;84:106–18. Epub 2013/04/06. pmid:23558030. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
71. Chan KW, Shone C, Hesp JR. Antibiotics and iron-limiting conditions and their effect on the production and composition of outer membrane vesicles secreted from clinical isolates of extraintestinal pathogenic *E. coli*. *Proteomics Clin Appl.* 2017;11(1–2). Epub 2016/11/03. pmid:27666736. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
72. Kim SW, Park SB, Im SP, Lee JS, Jung JW, Gong TW, et al. Outer membrane vesicles from beta-lactam-resistant *Escherichia coli* enable the survival of beta-lactam-susceptible *E. coli* in the presence of beta-lactam antibiotics. *Sci Rep.* 2018;8(1):5402. Epub 2018/03/31. pmid:29599474; PubMed Central PMCID: PMC5876404. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
73. Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 24):5553–65. Epub 2013/10/10. pmid:24105262. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
74. Margolis L, Sadovsky Y. The biology of extracellular vesicles: The known unknowns. *PLoS Biol.* 2019;17(7):e3000363. Epub 2019/07/19. pmid:31318874; PubMed Central PMCID: PMC6667152 member of a Clinical Expert Advisory Panel to Illumina, Inc. | [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)

75. Silverman JM, Clos J, deOliveira CC, Shirvani O, Fang Y, Wang C, et al. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 6):842–52. Epub 2010/02/18. pmid:20159964. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
76. Sterkers Y, Lachaud L, Crobu L, Bastien P, Pages M. FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*. *Cell Microbiol*. 2011;13(2):274–83. Epub 2010/10/23. pmid:20964798. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
77. Ubeda JM, Legare D, Raymond F, Ouameur AA, Boisvert S, Rigault P, et al. Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. *Genome Biol*. 2008;9(7):R115. Epub 2008/07/22. pmid:18638379; PubMed Central PMCID: PMC2530873. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
78. Lundgren DH, Hwang SI, Wu L, Han DK. Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2010;7(1):39–53. Epub 2010/02/04. pmid:20121475. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
79. Isnard A, Shio MT, Olivier M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:72. Epub 2012/08/25. pmid:22919663; PubMed Central PMCID: PMC3417651. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
80. Kumar D, Singh R, Bhandari V, Kulshrestha A, Negi NS, Salotra P. Biomarkers of antimony resistance: need for expression analysis of multiple genes to distinguish resistance phenotype in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Parasitol Res*. 2012;111(1):223–30. Epub 2012/02/04. pmid:22302478. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
81. Dacher M, Tachiwana H, Horikoshi N, Kujirai T, Taguchi H, Kimura H, et al. Incorporation and influence of *Leishmania* histone H3 in chromatin. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(22):11637–48. Epub 2019/11/14. pmid:31722422. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
82. Maity SN. NF-Y (CBF) regulation in specific cell types and mouse models. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. 2017;1860(5):598–603. Epub 2016/11/07. pmid:27815195; PubMed Central PMCID: PMC5413426. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
83. Qadir F, Aziz MA, Sari CP, Ma H, Dai H, Wang X, et al. Transcriptome reprogramming by cancer exosomes: identification of novel molecular targets in matrix and immune modulation. *Mol Cancer*. 2018;17(1):97. Epub 2018/07/17. pmid:30008265; PubMed Central PMCID: PMC6047127. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
84. Biyani N, Singh AK, Mandal S, Chawla B, Madhubala R. Differential expression of proteins in antimony-susceptible and -resistant isolates of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*. 2011;179(2):91–9. Epub 2011/07/09. pmid:21736901. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
85. Kuang Z, Lewis RS, Curtis JM, Zhan Y, Saunders BM, Babon JJ, et al. The SPRY domain-containing SOCS box protein SPSB2 targets iNOS for proteasomal degradation. *J Cell Biol*. 2010;190(1):129–41. Epub 2010/07/07. pmid:20603330; PubMed Central PMCID: PMC2911665. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
86. Verma S, Das S, Mandal A, Ansari MY, Kumari S, Mansuri R, et al. Role of inhibitors of serine peptidases in protecting *Leishmania donovani* against the hydrolytic peptidases of sand fly midgut. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):303. Epub 2017/06/25. pmid:28645315; PubMed Central PMCID: PMC5481909. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
87. Eschenlauer SC, Faria MS, Morrison LS, Bland N, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, et al. Influence of parasite encoded inhibitors of serine peptidases in early infection of macrophages with *Leishmania major*. *Cell Microbiol*. 2009;11(1):106–20. Epub 2008/11/20. pmid:19016791; PubMed Central PMCID: PMC2659362. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
88. Padmanabhan PK, Zghidi-Abouzid O, Samant M, Dumas C, Aguiar BG, Estaquier J, et al. DDX3 DEAD-box RNA helicase plays a central role in mitochondrial protein quality control in *Leishmania*. *Cell Death Dis*. 2016;7(10):e2406. Epub 2016/10/14. pmid:27735940; PubMed Central PMCID: PMC5133982. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
89. Vacchina P, Norris-Mullins B, Carlson ES, Morales MA. A mitochondrial HSP70 (HSPA9B) is linked to miltefosine resistance and stress response in *Leishmania donovani*. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):621. Epub 2016/12/03. pmid:27906059; PubMed Central PMCID: PMC5133764. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
90. Equbal A, Suman SS, Anwar S, Singh KP, Zaidi A, Sardar AH, et al. Stage-dependent expression and up-regulation of trypanothione synthetase in amphotericin B resistant *Leishmania donovani*. *PLoS One*. 2014;9(6):e97600. Epub 2014/06/06. pmid:24901644; PubMed Central PMCID: PMC4046939. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
91. Legare D, Cayer S, Singh AK, Richard D, Papadopoulou B, Ouellette M. ABC proteins of *Leishmania*. *J Bioenerg Biomembr*. 2001;33(6):469–74. Epub 2002/01/24. pmid:11804188. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)
92. Sousa D, Lima RT, Vasconcelos MH. Intercellular Transfer of Cancer Drug Resistance Traits by Extracellular Vesicles. *Trends Mol Med*. 2015;21(10):595–608. Epub 2015/10/04. pmid:26432017. [View Article](#) | [PubMed/NCBI](#) | [Google Scholar](#)

---

**Article 2**


---

## ***Leishmania* parasites exchange drug-resistance genes through extracellular vesicles**

Noélie Douanne<sup>1,2</sup>, George Dong<sup>3,7</sup>, Atia Amin<sup>4,7</sup>, Lorena Bernardo<sup>1,2</sup>, Mathieu Blanchette<sup>5</sup>, David Langlais<sup>4,6</sup>, Martin Olivier<sup>3,6,\*</sup> and Christopher Fernandez-Prada<sup>1,2,6,8,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, 626 CIMIA Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada

<sup>2</sup>The Research Group on Infectious Diseases in Production Animals (GREMIP), Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada

<sup>3</sup>IDIGH, The Research Institute of the McGill University Health Centre, 2155 Guy Street, Montreal, QC H3H 2L9, Canada

<sup>4</sup>Department of Human Genetics, McGill University Genome Centre, Montreal, QC H3A 0G1, Canada

<sup>5</sup>School of Computer Science, McGill University, Montreal, QC H3A 0E9, Canada

<sup>6</sup>Department of Microbiology and Immunology, McGill Research Centre on Complex Traits, Montreal, QC, Canada

<sup>7</sup>These authors contributed equally 8Lead contact

\*Correspondence: martin.olivier@mcgill.ca (M.O.), christopher.fernandez.prada@umontreal.ca (C.F.-P.)

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111121>

### **Highlights**

- EVs serve as a mechanism of genetic exchange in *Leishmania* parasites
- DNA content of EVs reflects the genetic background of the source parasite
- Drug-resistant *Leishmania* transfer resistance genes through EVs
- EVs from resistant parasites improve the growth and fitness of naive parasites

### **Résumé en français**

Les leishmanies sont des parasites eucaryotes qui ont conservé la capacité de produire des vésicules extracellulaires (EVs) au cours de l'évolution. À ce jour, il n'est pas clair si différentes entités d'ADN pourraient être associées aux EVs de *Leishmania* et si celles-ci pourraient constituer un mécanisme de transfert horizontal de gènes (HGT). Ici, nous étudions le contenu en ADN des vésicules extracellulaires dérivés de parasites résistants aux médicaments, ainsi que le potentiel de ces vésicules à agir comme navettes pour le transfert d'ADN. Le séquençage de nouvelle génération et les tests PCR confirment l'enrichissement des amplicons porteurs de gènes de résistance aux médicaments associés aux vésicules extracellulaires. Les tests de transfert d'EVs résistants aux médicaments mettent en évidence un impact significatif sur le phénotype des parasites receveurs induit par l'expression de l'ADN transféré. Les parasites receveurs présentent une croissance accrue et un meilleur contrôle du stress oxydatif. Nous apportons la preuve que



les vésicules extracellulaires eucaryotes fonctionnent comme des médiateurs efficaces dans le HGT, facilitant ainsi la transmission des gènes de résistance aux médicaments et augmentant l'aptitude des cellules lorsqu'elles sont confrontées à des environnements stressants.

## Summary

*Leishmania* are eukaryotic parasites that have retained the ability to produce extracellular vesicles (EVs) through evolution. To date, it has been unclear if different DNA entities could be associated with *Leishmania* EVs and whether these could constitute a mechanism of horizontal gene transfer (HGT). Herein, we investigate the DNA content of EVs derived from drug-resistant parasites, as well as the EVs' potential to act as shuttles for DNA transfer. Next-generation sequencing and PCR assays confirm the enrichment of amplicons carrying drug-resistance genes associated with EVs. Transfer assays of drug-resistant EVs highlight a significant impact on the phenotype of recipient parasites induced by the expression of the transferred DNA. Recipient parasites display an enhanced growth and better control of oxidative stress. We provide evidence that eukaryotic EVs function as efficient mediators in HGT, thereby facilitating the transmission of drug-resistance genes and increasing the fitness of cells when encountering stressful environments.

## Introduction

Parasitic infectious diseases remain real and pervasive threats worldwide. The situation has worsened in recent decades due to the emergence and spread of drug resistance. In particular, the vector-borne parasite *Leishmania* affects 15 million people worldwide, and in the absence of effective preventive and therapeutic treatments, is spreading with almost 1.5 million new cases every year (Fernández-Prada et al., 2019). Control of the disease is based on a very short list of chemotherapeutic agents headed by antimonial drugs (Sb), followed by miltefosine (MF) and amphotericin B (AmB). These drugs are far from ideal due to host toxicity, limited access, and high rates of drug resistance (Fernández-Prada et al., 2019; Sundar and Singh, 2018).

One of the most striking evolutionary features of *Leishmania* is the lability of its genomic architecture, which can be conveniently restructured to rapidly counter stressors such as drug pressure (Bussotti et al., 2018; Leprohon et al., 2009; Ubeda et al., 2008). As *Leishmania* is an early divergent eukaryote, it lacks classic transcriptional control mechanisms. *Leishmania* parasites mostly rely on aneuploidy and DNA copy number variations (CNVs) for regulation of the expression of drug targets, stress-related genes, and drug-resistance genes (Leprohon et al., 2009; Ubeda et al., 2014). Increases in CNVs in drug-resistant *Leishmania* parasites

are frequently caused by the reversible accumulation of small extrachromosomal amplifications (i.e., amplicons) containing drug-resistance genes. These are generated through homologous recombination events between direct repeated sequence elements (producing circular amplicons) or inverted ones (producing linear amplicons), when *Leishmania* is exposed to stressful environmental conditions (El Fadili et al., 2005; Guimond et al., 2003; Leprohon et al., 2009; Ubeda et al., 2008, Ubeda et al., 2014). Of note, the presence of extrachromosomal episomes has been repeatedly confirmed in both *in vitro*-generated drug-resistant strains and field isolates (Downing et al., 2011; Leprohon et al., 2009; Mukherjee et al., 2007; Tripp et al., 1991; Ubeda et al., 2008, Ubeda et al., 2014).

Extracellular vesicles (EVs) are nanometric membrane-enclosed particles released into the extracellular space by organisms belonging to almost all living kingdoms; they serve as mediators of intercellular communication (Dong et al., 2021; Yáñez-Mó et al., 2015). In this way, EVs have emerged as key players in *Leishmania* biology by leading to, inter alia, an enrichment of parasite populations with key virulence factors (i.e., GP63) during the first moments of infection, promotion of parasite survival, or the triggering of an exacerbation of the disease (Atayde et al., 2015; da Silva Lira Filho et al., 2022; Dey et al., 2018; Hassani et al., 2014; Silverman et al., 2010). Recently, our group made the discovery that small EVs contain specific protein signatures reflecting the drug-resistance profile of the parental *Leishmania* strain from which they originate (Douanne et al., 2020a). Moreover, we showed that *Leishmania* EVs can serve as a viral envelope for the endovirus *Leishmania* RNA virus 1 (LRV1), facilitating virus transmission and increasing infectivity in the mammalian host (Atayde et al., 2019).

These two seminal findings prompted us to explore whether EVs could be involved in the acquisition of drug-resistance genes through horizontal transfer events. Herein, we provide evidence that EVs released by drug-resistant *Leishmania* parasites are enriched in genomic regions containing genes involved in drug resistance. Moreover, we show that those circular amplifications containing drug-resistance genes can exploit EVs to guarantee efficient propagation into naive, drug-sensitive parasites (both intra- and interspecies), leading to the rapid emergence of drug-resistant subpopulations. This biological mechanism, coupled with *Leishmania*'s genomic plasticity, could contribute to a rapid genomic diversification of a parasite population, while promoting rapid fitness gains in hostile environments.

## Results

### EV DNA is highly enriched in drug-resistance genes reflecting the parental parasite



From our recent study showing that *Leishmania* EVs can serve as a cell-to-cell shuttle for double-stranded RNA viruses (Atayde et al., 2019), we hypothesized that this could also be the case for genes encoding proteins involved in drug resistance in *Leishmania*. To prove this, we selected a panel of drug-sensitive and drug-resistant strains belonging to *L. infantum* and *L. major* (Figure 1). First, the various strains were analyzed in terms of drug sensitivity to confirm their previously reported phenotypes (Table S1). Next, EVs were purified and assessed in terms of size and distribution (Figure 1A), particle-to-protein ratio (Figure 1B), and transmission electron microscopy (TEM) (Figure 1C). For all strains, vesicle purifications yielded EVs mostly situated under the 200 nm threshold (Figure 1A), therefore corresponding to small EVs. The ratio of particles per microgram of protein was above 1011 for all the extractions, which corresponds to highly pure EV preparations (Bellotti et al., 2021) (Figure 1B). TEM experiments revealed EV preparations to be free of contaminants and homogeneous in size (Figure 1C).

To confirm whether leishmanial EVs could serve as amplicon “carriers,” we isolated and characterized the DNA associated with the EVs released by the *L. infantum* wild type (*Ldi* WT) and the *L. infantum* Sb2000.1 (*Ldi* Sb) strains, the latter known to be equipped with a circular amplicon containing the *mrpA* gene (responsible for Sb resistance). DNA was recovered from EVs of three independent cultures of *Ldi* WT and *Ldi* Sb and analyzed by DNA sequencing (DNA-seq) using short-read Illumina sequencing (Data S1). Whole-genome sequencing (WGS) was also performed to generate high-coverage comparative datasets for the EV DNA analysis. The reads were aligned on the LINP reference genome assembly and a differential abundance analysis was performed by comparing the normalized read coverage in *Ldi* Sb and *Ldi* WT for 5 kb genomic intervals, tiling each chromosome. This analysis highlights some CNVs at the genomic level (Figure 2A ; outer circle), which are also reflected in the DNA recovered from EVs (inner circle). For example, as shown on the Miami plot representation of chromosome LinJ6 (Figures S1A and S1B), the terminal portion exhibits a 5-fold amplification in *Ldi* WT. In contrast, a segment of LinJ17 (between 157 and 193 kb) was depleted in the WT strain (Figures S1C and S1D). As expected, the WGS analysis detected the previously described *mrpA*-containing amplicon stemming from LinJ23, with an ~30-fold increased coverage in *Ldi* Sb parasites (Figures 2B and 2C). Importantly, the DNA isolated from EVs of Sb-resistant parasites also exhibited a similar increase in sequence coverage over this ~16 kb region (Figures 2B and 2C).

To validate our DNA-seq findings, we conducted a series of PCR experiments targeting either the 4.7 kb *mrpA* complete open reading frame (ORF) or a 1.8 kb DNA fragment resulting from a homologous recombination event during the formation of the extrachromosomal circular DNA (Figure 2D), and thus absent from the



sequence of the chromosomal locus (Leprohon et al., 2009). As shown in Figure 2E, the *mrpA* gene was amplified when using both total DNA and EV DNA from the Sb2000.1 strain as a template, but only from the genomic DNA recovered from *Ldi* WT (Figure 2E). However, the amplicon junction was detectable only in DNA isolated from the Sb-resistant strain (in both total DNA and EV DNA; Figure 2E), further confirming the presence of this extrachromosomal element in drug-resistant EVs. Finally, we evaluated whether the relationship of EVs and the *mrpA*-containing amplicon was restricted to the surface of the vesicles or, if at the same time, these extrachromosomal elements could be protected inside the particles. EVs derived from the WT and Sb2000.1 strains were subjected to a DNase I treatment prior to DNA isolation (Figure S1E) and then subjected to DNA-seq. As shown in Figure S1E, the ~16 kb region containing the *mrpA* gene not only was detected but remained highly enriched in Sb2000.1 EVs after DNase I treatment.

### ***Leishmania* EVs serve as an efficient mechanism of gene transfer**

Once extrachromosomal amplicon-EV association was confirmed, we explored whether these particles could be involved in intraspecies horizontal gene transfer (HGT) and interspecies gene transfer (IGT) events in promastigotes. We first evaluated the ability of EV-driven HGT to influence recipient cell phenotypes in *L. infantum* strains. To this end, we exposed a Sb-hypersensitive strain of *L. infantum* (*Ldi mrpA*<sup>-/-</sup>) (Douanne et al., 2020b) to EVs of the *L. infantum* Sb-resistant strain Sb2000.1, by means of 3 different experimental approaches (Figure S2). We performed Transwell experiments with Sb2000.1 or *Ldi mrpA*<sup>-/-</sup> promastigotes as EV donor cells, and *Ldi mrpA*<sup>-/-</sup> were recipient cells. The 0.4 μm pores in the insert membrane prohibit the movement of parasites but permit the diffusion of released EVs from the upper chamber to the lower compartment. No Sb was present in the medium during this process. After 7 days of culture, recipient cells were recovered and submitted to dose-response assays in the presence of increasing concentrations of Sb. As depicted in Figure 3A, recipient parasites exposed to Sb2000.1 displayed increased resistance levels compared with those exposed to *Ldi mrpA*<sup>-/-</sup>, with a significant ~2-fold increase in the EC50 value (Figure 3B). Moreover, the EC50 of *Ldi mrpA*<sup>-/-</sup> exposed to EVs from *Ldi mrpA*<sup>-/-</sup> parasites did not change compared with *Ldi mrpA*<sup>-/-</sup> alone (Table S1). To further confirm whether this phenotypic transformation was directly caused by EVs, we exposed the recipient *Ldi mrpA*<sup>-/-</sup> strain to purified EVs recovered from Sb2000.1 or *Ldi mrpA*<sup>-/-</sup> strains (Figure 1) for 5 days, in the absence of Sb pressure. Once again, recipient parasites exposed to Sb2000.1 EVs displayed high levels of resistance to Sb compared with those exposed to their own vesicles (Figure 3C); with a significant ~3-fold shift in EC50 value (Figure 3D). For the last approach, drug-resistant EVs were used as the transfection substrate. Once transfected with Sb2000.1 EVs, *Ldi mrpA*<sup>-/-</sup> recipient

parasites were subjected to Sb-drug pressure for one passage (7 days of stabilization) and then tested with dose-response curves. Direct delivery of EV content inside the cell nucleus, coupled with a positive selection, led to high levels of drug resistance in the parasites exposed to Sb2000.1 EVs (Figure 3E), with a >8-fold increase in the EC50 (Figure 3F). To further confirm the success of the HGT event, and since the recipient cell line was null for *mrpA*, we proceeded to the extraction of total DNA from recipient parasites after their exposure to EVs and conducted a PCR amplification targeting the complete coding sequence of *mrpA*. As depicted in Figure 3G, PCR led to the amplification of the expected ~4.7 kb product corresponding to the *mrpA* ORF in all three *Ldi mrpA*<sup>-/-</sup> recipient populations (Transwell, pure EVs, and nucleofection; Figure 3G). To further verify that these findings were not restricted to the *mrpA* null mutant—and assess whether the transferred DNA was being transcribed by the recipient cells—we exposed *Ldi* WT promastigotes to a single dose of WT- or Sb2000.1-purified EVs and recovered the total RNA on the fifth day after exposure. As expected, *mrpA* RNA levels were significantly increased (Figure S3), which supports the drug-resistant phenotype observed after exposure to drug-resistant small EVs.

Next, we explored the potential involvement of EVs in IGT. To this end, we used *L. infantum* (*Ldi*) and *L. major* (LV39) WT strains, as well as an *L. major* strain resistant to methotrexate (MTX) (LV39 MTX60.4), which contains an extrachromosomal circular amplicon (result of a homologous recombination event, as schematized in Figure 4A ) comprising the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) locus, known to be the main target of MTX (Ubeda et al., 2008). First, we conducted a series of PCR experiments targeting the homologous-recombination junction that is present only in the amplicon, and not in the chromosomal sequence. The amplicon signal was detected in the total DNA of only LV39 MTX60.4, as well as being associated with the vesicles of the MTX-resistant strain (Figure 4B). Naive cultures of both *L. major* WT and *L. infantum* WT parasites were exposed to LV39 MTX60.4 through Transwell assays, direct exposure to purified EVs, and nucleofection experiments. After Transwell assays, both *L. major* and *L. infantum* recipient parasites showed a significantly enhanced ability to survive in the presence of higher concentrations of MTX (Figure 4C), with an ~1.4-fold shift in their EC50 value (Figure 4D). Likewise, recipient parasites exposed to EVs purified from the LV39 MTX60.4 were also able to better survive in the presence of MTX (Figure 4E), with ~4-fold (*L. major*) and ~2.5-fold (*L. infantum*) increases in their EC50 values (Figure 4F). Finally, as previously demonstrated for the *mrpA* amplicon, direct nucleofection of pure EVs led to very high levels of resistance to MTX in both *L. infantum* and *L. major* recipient parasites (Figure 4G), with a >8-fold increase in their EC50 value (Figure 4H).



### Plasmids containing foreign elements can efficiently propagate through small EVs

We further explored the efficiency of HGT events by using a synthetic plasmid carrying the coding sequences of two different markers: the mCherry gene and the blasticidin-resistance gene (BSD) (Figure 5A). The *BSD-mCherry* plasmid was transfected as a circular episome in the *L. infantum* WT background, and both parasite DNA and EV DNA were recovered on passage 3 after the transfection. PCR analysis targeting the 399 bp sequence of the BSD showed a positive amplification in both total parasite DNA and EV DNA of the novel *Ldi* BSD-mCherry strain (Figure 5B). In this case, because of the presence of these two markers, we were able to evaluate both the impact in terms of blasticidin sensitivity and the success of plasmid transfer by the evaluation of mCherry-derived red fluorescence. As shown with amplicon EV experiments, recipient naive parasites exposed to *Ldi* BSD-mCherry EVs through Transwell assays (Figure 5C), direct contact (Figure 5E), and nucleofection (Figure 5G) increased their capacity to survive in the presence of high concentrations of blasticidin by ~1.5- (Figure 5D), ~3.0- (Figure 5F), and >8-fold (Figure 5H), respectively. All three recipient populations exhibited a positive result when tested for the presence of the BSD gene by PCR (Figure S4).

We next evaluated the time required to observe red parasites (i.e., expression of the transferred genes) after the exposure of recipient naive parasites to BSD-mCherry purified EVs. As shown in Figure S5, no fluorescence was detected in the initial moments; recipient parasites began to express the mCherry protein around 48 h post-exposure. Signal was greatly increased 96–120 h after initial exposure. Of note, these experiments were conducted in blasticidin-free medium, so no drug pressure was driving the selection of the mCherry subpopulation. Next, we compared the success of transmission of the BSD-mCherry plasmid to recipient WT parasites using Transwell assays, purified EVs, and direct transfection of EVs (Figure 6). The efficiency of transfer followed the same order as previously seen in terms of shift in the EC50 values (nucleofection > purified EVs > Transwell). Simultaneous quantification of the total fluorescence signal normalized by the number of parasites showed similar results; with transfer efficiency levels approximately two times higher when using purified EVs (signal corresponding to ~20% of the total population compared with the donor *Ldi* BSD-mCherry strain) than with Transwell assays (~11% of the population) after 120 h of exposure (Figure S6). As expected, nucleofection using purified BSD-mCherry EVs resulted in a very strong (~93% of the population) fluorescence phenotype (Figures 6 and S6). Of note, parasites incubated in the presence of the “naked” (no EVs) plasmids did not show any mCherry fluorescence signal (Figures 6 and S6), further supporting the importance of small EVs to guarantee the uptake of the DNA of interest.



## EVs released by drug-resistant parasites contribute to reducing cellular stress and stimulate cell proliferation

Using Transwell assays, we evaluated the impact of EVs released by different drug-resistant *Leishmania* strains on the drug cross-sensitivity profiles of naive recipient cells. EVs released by Sb- and AmB-resistant strains caused a reduction in the sensitivity of the WT strain against Sb (Figure 7A). EVs released by the AmB-resistant strain induced a slight but significant reduction in the sensitivity against MF (Figure 7B). Exposure to particles released by the AmB- and MF-resistant strains resulted in decreased sensitivity against AmB (Figure 7C). We next studied the accumulation of reactive oxygen species (ROS) upon drug exposure and the impact of EVs in this process. To this end, *L. infantum*-sensitive parasites were exposed to the EC90 of Sb, MF, and AmB in the presence, or the absence, of purified EVs released by the WT, Sb2000.1, MF200.5, and AmB1000.1 strains (Figure 7D). Detection of dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) fluorescence confirmed lower levels of ROS production/accumulation in WT promastigotes exposed to EVs derived from drug-resistant strains compared with unexposed parasites. EVs released by the WT did not confer any protection against ROS. As expected, protection against ROS translated into significantly higher survival rates in promastigotes exposed to EVs released by drug-resistant parasites (Figure 7D). Next, we evaluated the impact of EVs released by the WT and the drug-resistant strains on the growth pattern of drug-sensitive parasites in the absence (Figure 7E) or presence of drug-induced stress (Figures 7F and 7H). EVs released by drug-resistant parasites, but not those of the WT, significantly increased the growth of sensitive recipient parasites (Figure 7E). Moreover, Sb2000.1- and AmB1000.1-derived EVs fostered a greater growth of WT parasites under drug pressure (Figures 7F and 7H, respectively). On the other hand, the effect of MF-derived EVs on parasite growth, while significant, was milder and transient (Figure 7G).

Finally, to better understand the differences in terms of cell growth, we explored potential changes in the proteome of *Ldi* WT recipient promastigotes after 120 h exposure to Sb-resistant *Leishmania* EVs compared with the WT's own EVs. Shotgun proteomics revealed four proteins detected in the whole-parasite proteome of only the three replicates of WT parasites exposed to Sb-resistant EVs and not in all three replicates exposed to WT-EV (Figures S7A and S6C and Data S2). Among these unique proteins found in the parasites, we identified two dehydrogenase proteins, one involved in the oxidation of malate to oxaloacetate (A4I9I4\_LEIIN) and one involved in succinate converting to fumarate (A4HWJ7\_LEIIN). In addition, we identified a putative Peter Pan protein (A4HRX6\_LEIIN), which could be involved in cellular division and cell-cycle progression. On the other hand, as summarized in the volcano plot (Figure S7B), we identified 17 upregulated ( $p < 0.05$ ; fold change  $\geq 2$ ) and 4 downregulated proteins ( $p < 0.05$ ; fold change  $\leq 0.5$ ). Among the enriched proteins



(Figure S7C) in WT parasites exposed to Sb2000.1 EVs, we identified an enoyl-CoA hydratase (E9AHU0\_LEIIN), a farnesyl pyrophosphate synthase (E9AH04\_LEIIN), a member of the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) pathway VPS23 (A4I7R5\_LEIIN), and a dynein-associated protein (A4IB75\_LEIIN).

## Discussion

Drug-resistance in *Leishmania* continues to emerge, diversify, and spread (Fernández-Prada et al., 2019). While the effect of antileishmanial drugs on host-infecting amastigotes has been largely studied, interest in the propagation of drug-resistance traits in the sand fly vector has only recently drawn the attention of the scientific community (Van Bockstal et al., 2020). Of note, *Leishmania* can undergo genetic exchange during growth and development in the sand fly vector through cryptic sex. However, the occurrence of viable hybrid offspring is variable depending on the experimental conditions (Akopyants et al., 2009; Louradour et al., 2020, Louradour et al., 2022; Monte-Neto et al., 2022). Alternatively, acquisition of genes *via* HGT in the vector would represent an efficient and less challenging mechanism of genetic exchange by facilitating a rapid genome diversification. However, such a mechanism had never been described in eukaryotic parasites before. Moreover, and to guarantee efficient HGT, DNA should be protected from degradation during its cell-to-cell transit. In this way, we recently showed that *Leishmania* EVs are naturally secreted in the vector (Atayde et al., 2015), and they serve as an envelope for LRV1 virions (Atayde et al., 2019). This points to EVs as potential shuttles for nucleic acid transfer in *Leishmania*.

The first question we addressed in this work was the potential occurrence of specific leishmanial DNA associated with EVs, and whether this EV DNA could vary depending on the drug-resistance background of the parasite. Numerous studies have reported the presence of DNA both attached to the surface of tumor-derived EVs and in their lumen (Elzanowska et al., 2021). Likewise, a recent metagenomic study showed the presence of antibiotic-resistance genes in bacterial EVs in indoor dust (Qin et al., 2022). Our EV DNA-seq experiments revealed that fragments from almost the entire genome of *L. infantum* WT and Sb2000.1 strains were represented in their respective small EVs. EV-DNA genomic fragments could represent a highly diverse source of gene CNVs, which are a well-established mechanism of genetic adaptation in *Leishmania* (Leprohon et al., 2015). Indeed, when encountering a stressor (i.e., drug pressure or physical stress such as temperature), the subset of parasites with increased CNVs—leading to increased expression of genes involved in countering the challenge—would survive. Of note, EV-driven CNVs could contribute to a rapid genetic diversification of the population in the sand fly vector, as well as inducing rapid fitness gains to

effectively respond to environmental signals and stressors in the absence of regulated transcription (Grünebast and Clos, 2020). Likewise, tumor-derived EVs are known to contain double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes (reflecting the genetic status of the tumor, i.e., single-nucleotide polymorphisms [SNPs] and CNVs) (Balaj et al., 2011; Kahlert et al., 2014; Vagner et al., 2018) and could potentially participate in the process of cancer metastasis and drug resistance (Zhang et al., 2018). Our analyses pinpointed a major enrichment of EV DNA corresponding to the region encoding the *mrpA* gene on chromosome LinJ23, reflecting the genetic background of the Sb2000.1 strain (Leprohon et al., 2009), and thus pointing to a potential transfer of resistance. Of note, the presence of the *mrpA* amplicon was not restricted to the exofacial surface of Sb2000.1 EVs, given that the same amplification was detected by DNA-seq after DNase treatment. This, in fact, could confer increased stability to the amplicon by protecting it from the external environment during an HGT event. Due to their size, small EVs (<200 nm) can transport a limited amount of material in their lumen. However, the presence of dsDNA fragments ranging from 100 bp to 20 kb has been confirmed in small EVs (i.e., exosomes) released by tumor cells (Kahlert et al., 2014; Lee et al., 2016), further substantiating our findings of an ~16 kb *mrpA* amplification in *Leishmania* EVs. That said, the mechanism of DNA packaging in uptake by EVs remains unclear (Elzanowska et al., 2021). During each mitotic division the nucleus disassembles and re-forms, releasing nuclear content into the cytoplasm. Since the ESCRT pathway participates in both membrane abscission during cytokinesis and regeneration of the nuclear envelope (Stoten and Carlton, 2018), this could represent the most favorable moment for amplicon uptake by *Leishmania* EVs.

Next, we demonstrated, through three different approaches, that EVs released by drug-resistant parasites can efficiently alter the drug-sensitivity phenotype of recipient parasites after a single exposure, through the transmission of natural amplicons (i.e., *mrpA* and DHFR genes) or artificial plasmids (i.e., BSD). Moreover, this observation was conserved, and gene transfers were functional between visceral and cutaneous leishmaniasis species as demonstrated by MTX-resistance transfer from *L. major* MTX60.4 to *L. infantum* parasites. Likewise, genomic exchange through interspecies-hybrid formation has been recently reported both *in vitro* and in the sand fly vector (Louradour et al., 2022; Romano et al., 2014). Importantly, we showed that, when exposing naive parasites to purified drug-resistant EVs, levels of drug sensitivity in the recipient cells were increased by 2- to 3-fold after a single exposure. While less efficient, continuous exposure in Transwell co-culture experiments also led to a significant decrease in drug sensitivity in recipient parasites. Similarly, Pereira and co-workers showed that co-culture of Sb-resistant and Sb-sensitive *Leishmania* strains recovered from patients resulted in an improvement in growth capacity and an increased resistance of



sensitive parasites (Pereira et al., 2021). While they did not identify the mechanism underlying these phenotypic changes, their observational results further reinforce our mechanistic findings. In addition, this could have major clinical implications: increased EC50 values will translate to poor, or even ineffective, treatment response in leishmaniasis patients (Pereira et al., 2021).

Our most striking evidence of HGT events was the demonstration of the efficient transfer of the extrachromosomally amplified genes *mrpA* and BSD into the naive background of recipient *mrpA*<sup>-/-</sup> and WT *L. infantum* strains after exposure to donor EVs. While a few reports have recently described the gene transfer potential of outer membrane vesicles (OMVs) of Gram-negative bacteria (Dell'Annunziata et al., 2021), we now demonstrate HGT in eukaryotic parasites through EVs. While leishmanial amplicons share some similarities with prokaryotic plasmids (i.e., circular architecture and multi-gene content), *Leishmania* extrachromosomal DNAs do not include any genetic factor known to facilitate their transfer among parasites (Beverley, 1991). However, this evolutionary limitation could have been circumvented by EVs, which, as supported by our findings, would facilitate the diffusion of genetic elements to surrounding parasites, as we also showed previously for LRV1 (Atayde et al., 2019). In addition to being a very efficient source of genetic diversity, EV DNA could represent a safekeeping mechanism by acting as a highly diverse library of DNA “repair templates” (i.e., for correcting harmful homozygous mutations or irreversible deletions) shared between parasites within the sand fly vector. On the other hand, this new EV-driven genetic-exchange mechanism implies that drug resistance could spread in sand fly populations, even in the absence of drug pressure.

Expression of proteins encoded by EV-transferred genes took up to 72 h, as per detection of mCherry reporter fluorescence emission. This delay in detection further corroborates the transmission of mCherry DNA, rather than the protein, and sheds some light on the time required for the release of EV-DNA cargo into the cytoplasm of recipient parasites and subsequent intracellular trafficking to their nucleus. To this extent, different studies have shown that plasmids use the microtubule network and the retrograde motor dynein to reach the cell nucleus after transfection in eukaryotic cells (Vaughan and Dean, 2006). Likewise, our proteomic analyses revealed a significant enrichment in dynein-associated proteins in parasites exposed to EVs containing drug-resistance amplicons (i.e., WT exposed to Sb2000.1 EVs for 120 h). However, further studies are needed to better understand DNA vesicular absorption mechanisms. In addition, we showed that EV-mediated genetic-exchange events could be efficient in *Leishmania*, as a single exposure to EVs led to a transformation of ~20% of the population in the absence of any selection pressure. This HGT efficiency rate is comparable to that reported in *L. major-L. major* hybrid selection experiments (7%–26%) in the sand fly vector (Akopyants



et al., 2009; Monte-Neto et al., 2022). Whether both mechanisms are linked should be addressed in future studies.

To succeed through its parasitic life cycle, resistance-conferring genetic alterations must guarantee the survival of the parasite under stressors not only in the mammalian host but also inside the sand fly vector (Van Bockstal et al., 2020). Several reports have shown that drug-resistant *Leishmania* parasites are more tolerant when exposed to different stressors (i.e., starvation, heat shock-pH stress, etc.) (Berg et al., 2015). Thus, we explored the potential involvement of EVs released by donor drug-resistant parasites in the modulation of redox control and tolerance to stress in naive recipient parasites. To this end, we verified potential mechanisms of cross-resistance when exposing sensitive recipient parasites to EVs issued by parasites resistant to the three main antileishmanial drugs. We confirmed a cross-resistant phenotype between AmB and MF (Fernandez-Prada et al., 2016) previously reported, and we pinpointed a previously unknown cross-resistance to Sb when parasites were exposed to AmB1000.1 EVs. This could be explained by the enrichment of AmB1000.1 EVs with MRPA protein, as described in our previous EV proteomics studies (Douanne et al., 2020a). Of note, we showed that WT receiving EVs from drug-resistant parasites were able to grow better and survive for longer in a non-drugged environment. Increased growth rate was coupled to a better tolerance toward, or reduced production of, ROS when parasites were exposed to high concentrations of various antileishmanial drugs. This enhanced ability to neutralize drug-induced ROS production was not transferred by WT EVs, which is in line with previous metabolomic studies showing that drug-resistant parasites are protected against drug-induced oxidative stress as part of a general adaptation mechanism that is independent of the drug toward which the parasite has become resistant (Berg et al., 2015).

Next, we explored the potential reprogramming of *Leishmania*'s proteome during its stationary phase (fifth day of growth) after an initial, single-dose exposure to EVs released by drug-resistant parasites. Patterns of protein expression of recipient parasites exposed to EVs changed according to the drug-resistance background of the donor cell. Among the proteins detected only in parasites exposed to Sb2000.1 EVs, we identified succinate and malate dehydrogenases, both known to be potentially involved in promastigote growth and metacyclogenesis. Succinate dehydrogenase (mitochondrial complex II) may be of particular importance, as succinate is the main trypanosomatid respiratory substrate (Verner et al., 2014). In eukaryotic cells, complex II can be a source as well as a suppressor of ROS, and its processes are highly linked to the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Among TCA-cycle intermediates, oxaloacetate (a product of malate dehydrogenase) can efficiently inhibit complex II and minimize superoxide production (Dröse, 2013). This could explain the protective effect of Sb-resistant EVs against ROS formation, as well as the enhanced growth



observed in recipient parasites. Likewise, enrichment in enoyl-CoA hydratase and farnesyl pyrophosphate synthase could translate into enhanced growth, as these are two key intermediates in the biosynthesis of all isoprenoids, which are precursors of many end-products that are essential for cell viability. Farnesyl pyrophosphate is used by trypanosomatids in the biosynthesis of dolichol and sterols, such as ergosterol, and in protein prenylation (Gadelha et al., 2020). Finally, the presence of VPS23 protein, belonging to ESCRT-II, coupled to the enrichment of a dynein-associated protein could reflect an increased rate of cellular division, as vesiculation contributes to membrane abscission during cytokinesis (Stoten and Carlton, 2018). Future work should address the functionality (i.e., enzymatic activity) of these altered pathways and further elucidate the signaling cascade leading to their enrichment in naive parasites after exposure to drug-resistant EVs.

Collectively, our study reveals that *Leishmania* parasites exploit EVs to guarantee the propagation of drug-resistance genes as part of episomal amplifications, which constitutes a demonstration of EV-mediated HGT in eukaryotic parasites, as well as an alternative mechanism of drug resistance in eukaryotic cells. In addition, EVs derived from drug-resistant parasites modulate promastigote fitness by reducing the accumulation of ROS, when encountering stressors, and altering the basal proteome of recipient parasites, further guaranteeing the survival and propagation of drug-resistant populations.

### Limitations of the study

DNA is not restricted to the nucleus in eukaryotic cells, as these also possess a mitochondrial genome. Mitochondrial DNA (mtDNA) can be released to the extracellular space as cell-free mtDNA in association with EVs. The *Ldi* WT reference genome assembly does not include the kinetoplast DNA (mtDNA, or kDNA); hence, our analyses focused on the nuclear DNA, which contains the known drug-resistance genes. Further studies are also needed to elucidate the intracellular processes involved in packaging DNA into *Leishmania* EVs, and whether DNA structure and intracellular origin have a role in this process. Moreover, while we have proved the link between drug-resistance genes transferred through EVs (i.e., *mrpA*, *dhfr*, and *BSD*) and changes in the phenotype (i.e., decreased drug sensitivity) of recipient cells, EVs could contain molecules other than DNA (i.e., different thiol species) that could be contributing to survival against off-target or non-specific stressors (i.e., cross-resistance through increased protection against ROS). Finally, it also remains to be determined how the HGT and IGT mechanisms proposed here will apply to other eukaryotic organisms under different physiological and stressful conditions.

### STAR★Methods



## Key resources table

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Chemicals, peptides, and recombinant proteins</b>		
Sb (potassium antimonyl tartrate trihydrate)	Sigma	Cat#383376-100g
Acide borique	Sigma	Cat#10043-35-3
Adenine	Sigma	Cat#A2545-25g
Agarose	Fisher	Cat#BP160-500
AmB (amphotericin B solution)	Sigma	Cat#A2942-100ml
Ammonium bicarbonate	Fisher	Cat#1066-33-7
Ampicilin	Sigma	Cat#A9518-25g
BSD (blasticidin S hydrochloride)	Gibco	Cat#R210-01
CAN (Ceric Ammonium Nitrate)	Fisher	Cat#RDCC0300500
H2DCFDA (H2-DCF, DCF)	Invitrogen, USA	Cat# D399
DNAzol reagent	Invitrogen, USA	Cat#10503027
DTT (dithiothreitol)	Thermo Fisher Scientific, USA	Cat#R0861
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Sigma	Cat#60-00-4
FBS	Wisent	Cat#80150
Formic acid	Sigma	Cat#64-18-6
Glucose	Gibco	Cat#A2494001
Glutaraldehyde solution	Fisher	Cat# BP25471
Hemin Chloride	MP Biomedicals	Cat#194025
Hepes	Sigma	Cat#H4034-500g
Kanamycine	Sigma	Cat#K4000-25g
KCL	Fisher	Cat#AC418205000
M199 medium	Gibco	Cat#31100-019
MF (miltefosine)	Cayman Chem. cie	Cat#63280
MOPS	Sigma	Cat#M3183
MTX (methotrexate hydrate)	Sigma	Cat#A6770-25mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (phosphate sodium dibasique anhydre)	Fisher	Cat#7558-79-4
NaCl	Fisher	Cat#AA1101930
NaHCO <sub>3</sub> (Sodium Bicarbonate)	VWR	Cat#BDH0280-2,5Kg
Puromycin solution 10 mg/ml	Wisent	Cat# 450-162-XL
RPML-1640 1X medium (with L-glutamine, without HEPES & phenol red)	Wisent	Cat#250-046-CL
Sodium cacodylate	Fisher	Cat# AAJ60367AE
SYBR Safe DNA Gel Stain	Invitrogen, USA	Cat#S33102
Trichloroacetic acid (15 %)	Fisher	Cat#13-622-625
Tris (1 M), pH 8.0, RNase-free	Invitrogen	Cat#AM9856
Triton X-100	Sigma	Cat#9002-93-1
Uranyl acetate	SPI supplies	Cat#6159-44-0
<b>Critical commercial assays</b>		
DNeasy Blood and Tissue Kit	QIAGEN, USA	Cat#69504
Human T Cell Nucleofactor Kit	Lonza Bioscience	Cat#VPA-1002
KAPA HyperPrep Kit	Roche	#KK8500
MicroBCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, USA	Cat#PI23235
Quant-iT Pico Green dsDNA Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, USA	#P7589
Turbo DNA-free Kit	Thermo Fisher Scientific, USA	Cat#AM1907
PCR-free Lucigen NxSeq	Lucigen, USA	#14000
<b>Deposited data</b>		
EV-DNA seq data	This paper	GEO (TBD)
Proteomic data	This paper	Supplementary File 2

<b>Experimental models: Cell lines</b>		
<i>L. infantum</i> WT (MHOM/MA/67/ITMAP-263)	Laboratory of Prof. Marc Ouellette	N/A
<i>L. infantum</i> Sb2000.1	Laboratory of Prof. Marc Ouellette	N/A
<i>L. infantum</i> MF200.5	Laboratory of Prof. Marc Ouellette	N/A
<i>L. infantum</i> AmB1000.1	Laboratory of Prof. Marc Ouellette	N/A
<i>L. infantum</i> mrpA <sup>-/-</sup>	Douanne et al, 2020	<a href="https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.100000">https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.100000</a>
<i>L. infantum</i> BSD-mCherry	This paper	N/A
<i>L. major</i> WT	Laboratory of Prof. Marc Ouellette	N/A
<i>L. major</i> MTX60.4	Laboratory of Prof. Marc Ouellette	N/A
<b>Oligonucleotides</b>		
Primers for PCR validation experiments, see Supplementary Table S2	This paper	N/A
<b>Recombinant DNA</b>		
Plasmid: pLEXSY-2 mCherry Hsp70 BSD	Calvo-Alvarez et al., 2014	<a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188875">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188875</a>
<b>Software and algorithms</b>		
GraphPad Prism 8.0 for Windows	GraphPad Software, La Jolla California	<a href="https://www.graphpad.com/science">https://www.graphpad.com/science</a>
Blast2GO 6.0.1	Gotz S. et al., 2008	<a href="https://doi.org/10.1093/nar/gkn476">https://doi.org/10.1093/nar/gkn476</a>
Bowtie 2 (Version 2.4.4)	Langdon 2015	<a href="https://doi.org/10.1186/s13040-014-0091-0">https://doi.org/10.1186/s13040-014-0091-0</a>
BWA-MEM (Version 0.7.17)	Li H. 2013	<a href="https://doi.org/10.48550/arXiv.1303.3997">https://doi.org/10.48550/arXiv.1303.3997</a>
CMplot	Yin et al. 2021	<a href="https://doi.org/10.1016/j.gpb.2020.100000">https://doi.org/10.1016/j.gpb.2020.100000</a>
deepTools (Version 3.5.1)	Ramírez et al. 2016	<a href="https://doi.org/10.1093/nar/gkv077">https://doi.org/10.1093/nar/gkv077</a>
edgeR	Robinson et al. 2010	<a href="https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq154">https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq154</a>
FastQC (Version 0.11.9)	Andrews 2010	<a href="http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/">http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/</a>
FeatureCounts (Version Rsubread 2.8.1)	Liao et al. 2014	<a href="https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu175">https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu175</a>
IGV (2.11.9)	Robinson et al. 2011	<a href="https://doi.org/10.1038/nbt.175">https://doi.org/10.1038/nbt.175</a>
Picard Tools (Version 2.26.3)	Picard toolkit 2018	<a href="http://broadinstitute.github.io/picard/">http://broadinstitute.github.io/picard/</a>
Qualimap (Version 2.2.2)	García-Alcalde et al. 2012	<a href="https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts322">https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts322</a>
SAMtools (Version 1.13)	Li et al. 2009	<a href="https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp117">https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp117</a>
Scaffold 4.9.0	Proteome Software Inc., Portland, USA	<a href="https://support.proteomesoftware.com/">https://support.proteomesoftware.com/</a>
Trimmomatic (Version 0.39)	Bolger AM 2014	<a href="https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu175">https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu175</a>

## Resource availability

### Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Christopher Fernandez-Prada ([christopher.fernandez.prada@umontreal.ca](mailto:christopher.fernandez.prada@umontreal.ca)).

### Materials availability

This study did not generate new unique reagents.

## Experimental model and subject details

### *Leishmania* cell lines

Eight strains belonging to two different *Leishmania* species, *L. infantum* (belonging to the *Leishmania donovani* complex; *Ld*) and *L. major*, were used in this study. *Leishmania infantum* strains included: *L.*

*infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) wild-type strain (WT) and the *in vitro* generated resistant mutants Sb2000.1, AmB1000.1 and MF200.5 (Brotherton et al., 2013, Brotherton et al., 2014; El Fadili et al., 2005; Fernandez-Prada et al., 2016; Leprohon et al., 2009; Moreira et al., 2011), which are resistant to antimony (Sb), amphotericin B (AmB), and miltefosine (MF), respectively. We also included an antimony-hypersensitive strain (*Ldi-mrpA*<sup>-/-</sup>) which lacks the gene encoding the ATP-binding cassette protein MRPA (Douanne et al., 2020b); and a strain overexpressing an episomal plasmid harboring the mCherry and blasticidin-resistance genes (*BSD-mcherry*). *Leishmania major* strains included: *L. major* LV39 wild-type strain (LV39 WT) and the *in vitro* generated methotrexate (MTX)-resistant mutant LV39 MTX60.4 (Ubeda et al., 2008).

All strains were grown at 25°C in M199 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 5 µg/mL of haemin at pH 7.0. Drug-resistant strains were grown in the presence of the drug for which they were previously selected for resistance (except during DNA-transmission experiments and isolation of EVs): 2 mM Sb (Potassium antimonyl tartrate, Sigma-Aldrich) for Sb2000.1; 200 µM MF (Miltefosine, Cayman Chem.) for MF200.5; 1 µM AmB (Amphotericin B solution, Sigma) for AmB1000.1; 60 µM MTX (Methotrexate, Sigma-Aldrich); 120 µg/mL blasticidin (Blasticidin S hydrochloride, Sigma-Aldrich) for *Ldi BSD-mcherry*; and 100 µg/mL puromycin (Puromycin dihydrochloride, Wisent) for *Ldi mrpA*<sup>-/-</sup>.

## Method details

### Drug sensitivity assays

Antileishmanial values were determined by monitoring the growth of promastigotes after 72 h of incubation at 25°C in the presence of increasing drug concentrations of Sb, MF, AmB, MTX, or blasticidin, by measuring A600 using a Cytation 5 machine (BioTek, USA). EC50 values were calculated based on dose-response curves analyzed by non-linear regression with GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, La Jolla California, USA). An average of at least three independent biological replicates run in triplicate was performed for each determination. Before proceeding to purification of EVs, the different strains were analyzed in terms of drug sensitivity to confirm their previously reported phenotypes (Table S1).

### *Leishmania* growth experiments

Growth curves were performed in 25 cm<sup>2</sup> cell culture flasks by seeding 1 × 10<sup>6</sup> parasites/mL, and parasite growth was determined daily, up to 5 days, by measuring A600 using a Cytation 5 machine (BioTek, USA). Depending on the experimental conditions, parasites were exposed (5 µg EVs/mL) or not to purified small EVs in the presence or in the absence of the different antileishmanial drugs mentioned above (0 × or 1 ×



EC50). Growth assays were performed with at least three biological replicates from independent cultures, each of which included three technical replicates.

### Generation of the *L. infantum* BSD-*mcherry* strain

The BSD-*mcherry* overexpressing mutant was generated by introducing the pLEXSY-*mCherry* plasmid in the *L. infantum* strain background as previously described (Calvo-Álvarez et al., 2014). Briefly, for episomal expression, a total of 20 µg of the circular pLEXSY-BSD-*mcherry* plasmid were transfected into *L. infantum* WT parasites by nucleofection using the Amaxa Nucleofector System (Lonza) customized for the Human T cell Nucleofector Kit (U-033 pre-set program). Selection was achieved in the presence of 120 µg/mL blasticidin S (Blasticidin S hydrochloride, Sigma-Aldrich). The phenotype of the resulting mutant was verified by both blasticidin drug-susceptibility tests and fluorescence microscopy (Texas Red Fluorescence Imaging (586–647 nm), Cytation 5 machine (BioTek, USA)).

### Isolation and purification of *Leishmania* small EVs

*Leishmania* small EVs were isolated and purified as we previously described (Atayde et al., 2019; Douanne et al., 2020a). Briefly, 1 L of *Leishmania* parasites ( $2.5\text{--}5.0 \times 10^6$  parasites/mL) was grown in drug-free M199 at 25°C (supplemented with 10% FBS and 5 µg/mL of haemin at pH 7.0) and left to divide in 10 non-ventilated 75 cm<sup>2</sup> culture flasks (Corning, USA) until they reached late-log phase. Next, parasites were washed twice in PBS and resuspended in 5 mL RPMI-1640 medium (no FBS, no phenol red) (Life Technologies) at a final concentration of  $2.5\text{--}5.0 \times 10^8$  parasites/mL, in non-ventilated 25 cm<sup>2</sup> culture flasks (Corning, USA) at 37°C. Parasites were stimulated for 4 h at 37°C to maximize the release of EVs in the medium (Atayde et al., 2019; Douanne et al., 2020a). The viability of parasites was evaluated by propidium-iodide (PI) staining before and after incubation at 37°C. Only cultures with a viability >95.0% were submitted to subsequent EV-purification steps. After the 4-h incubation, samples were centrifuged 10 min at 3 000 g to eliminate parasites and 10 min at 8,500 g to clear out debris, followed by two subsequent filtrations using 0.45 and 0.22 µm syringe filters. EVs were then recovered by a 1 h ultracentrifugation at 100,000 g using 17 mL polypropylene tubes (16 × 96 mm) in an SW 32 Ti Swinging-Bucket Rotor (Beckman Coulter, USA) and resuspended in EVs buffer (137 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.5). EV protein content was determined using the Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, USA) as per the manufacturer's recommendations. EVs were conserved in aliquots in EVs buffer at –80°C for subsequent experiments. Aliquots were slowly thawed on ice before being used (EVs were never refrozen). A minimum of three independent purifications were performed for each strain.





### Small EVs size and concentration measurements

Size and concentration measurements of the purified EV samples were performed with a ZetaView Nanoparticle tracking analyzer (NTA) (Particle Metrix, USA). The samples were run at 25°C using 0.22 µm filtered EVs buffer as a diluent. For video acquisition, a shutter frame rate of 45 was used and the sensitivity was set at 85, according to the system's software guidance algorithms. Before measurements were taken, accuracy of the ZetaView was verified using 100 nm standard beads. Samples were diluted in EVs buffer with a dilution factor of 1:1,000–1:10,000 to achieve a particle count in the range of 1,000–2,000.

### Transmission electron microscopy (TEM)

TEM visualization of *Leishmania* small EVs was performed in accordance with our previously published method (Douanne et al., 2020a). Briefly, purified EVs were coated on formvar carbon grids, fixed with 1% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1 min, and stained with 1% uranyl acetate for 1 min. A FEI Tecnai 12 120 kV transmission electron microscope was then used for recording the formvar grids coated with the purified EVs. The resulting images were captured with the AMT XR-80C CCD Camera System (Facility for Electron Microscopy Research, McGill University).

### Isolation of DNA from whole promastigotes and purified small EVs

Genomic DNAs were prepared from mid-log phase clonal cultures of promastigotes of each strain using DNAzol reagent (Invitrogen, USA), as recommended by the manufacturer. DNA was extracted using the DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, USA) from (i) purified EVs, or (ii) purified EVs after treatment with Turbo DNA-free (Thermo Fisher Scientific, USA), following the manufacturer's instructions, to eliminate external DNA. Dried DNA pellets were resuspended in ddH<sub>2</sub>O and further concentrated using a Savant DNA SpeedVac Concentrator (Thermo Electron Corporation, USA). Purified DNAs were fluorometrically quantified using the Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) in a Take 3 platform (BioTek, USA). DNA was stored at -20 °C until use in subsequent next generation sequencing or PCR experiments.

### DNA amplification and visualization

DNA targets (e.g., drug-resistance markers) were amplified from genomic DNA or small-EV associated DNA using compatible primer pairs (Table S2) in a ProFlex PCR System (Applied Biosystems, USA). PCR products were electrophoretically resolved in 1 × TBE, 0.6% agarose gels stained with SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA). Images were captured using a ChemiDoc MP Imaging System (BioRad, USA).

### DNA sequencing and analysis

Extracellular vesicle DNA libraries were constructed using the KAPA HyperPrep kit following the manufacturer's protocol without fragmentation; the final library fragment size was 250–400 bp. Sequencing was performed using an Illumina NovaSeq 6000 sequencer in a 50 bp pair-end configuration. An average 29-fold and 32-fold genome coverage was achieved for the EV DNA samples from the WT and the Sb-resistant mutant, respectively. Whole-genome DNA sequencing (WGS) libraries were prepared from genomic DNA with fragments >40 kbp, using the PCR-free Lucigen NxSeq library kit; the average library fragment size distribution was between 500 and 2,500bp. The WGS libraries were sequenced on an Illumina NovaSeq 6000 in a PE 100bp configuration, and a genome coverage of 208-fold and 27-fold was obtained for the WT and the Sb resistant mutant, respectively. Quality control analysis of the raw sequence reads was performed using FASTQC. Adapters and low-quality bases were trimmed by Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Trimmed EV DNA sequences were mapped onto the *Leishmania infantum* reference genome assembly (LINFGCA\_900500625.2) using the short-read aligner Bowtie2 (Langdon, 2015) using default parameters. For the WGS alignment, BWA-MEM was used with the default parameter, which supports the alignment of longer Illumina sequences ranging from 70 to 100bp (Li, 2013). Quality of mapping was analyzed using Qualimap (García-Alcalde et al., 2012) and reads with low mapping quality score (MAPQ  $\leq 2$ ) were removed using Samtools (Li et al., 2009). PCR duplicates in EV DNA libraries were flagged and removed using Picard. Coverage tracks for the visualization in Integrated Genome Viewer (IGV) were created using deepTools (Ramirez et al., 2016), where the scaling factors were calculated using the following formula: genome size/(mapped read pairs \* read length).

For the analysis of copy number variation (CNV), read depth coverage was calculated for 5-kb non-overlapping genomic windows tilling the 36 chromosomes using featureCounts (Liao et al., 2014). Read depth coverage was normalized based on the library size and the EVs DNA differential abundance analysis was performed using edgeR with exactTest method and Benjamini-Hochberg multiple testing correction (adjusted p value threshold 0.05). Five-kb windows with a minimal coverage of 50 counts per million in at least three samples were included in the CNV analysis. To visualize the results of the CNV analyses, the circular and linear Miami plots were created using the CMplot package in R 3.5.3.

### Transfer of EV-associated DNA

The ability of small EVs to transfer DNA to recipient cells was evaluated using three different approaches (Figure S2). For EVs Transwell co-culture (no contact) assays, donor parasites ( $2 \times 10^7$  promastigotes in 1.5



mL) were added to the 0.4  $\mu$ m pore-size inside chamber (Corning, USA), while recipient parasites ( $5 \times 10^6$  promastigotes in 2.6 mL) were added to the wells as previously described (Atayde et al., 2019). Parasites were grown in drug-free M199 at 25°C for 7 days. For direct transfer assays, particle preparations (a single dose of 10  $\mu$ g/mL pure small EVs) were added to 106 promastigotes/mL recipient parasite cultures in drug-free M199 at 25°C for 7 days in 24-well plates (Corning, USA). For EV-nucleofection experiments, a total of 15  $\mu$ g of purified small EVs were directly transfected by nucleofection using the Amaxa Nucleofector System (Lonza) customized for the Human T cell Nucleofector Kit (U-033 program). Selection was achieved in the presence of the drug to which the donor parasites were resistant (25  $\mu$ M Sb; 1  $\mu$ M MTX or 120  $\mu$ g/mL blasticidin S). For all three experimental approaches, recipient parasites were recovered and submitted to different post-exposure tests (drug susceptibility, genomic DNA extraction or microscopy; Tables S3–S5). Experiments were performed with at least three biological replicates from independent cultures, each of which included three technical replicates.

### Measurement of reactive oxygen species (ROS) accumulation

Intracellular ROS accumulation was measured using the DCFDA dye (Invitrogen, USA). Briefly,  $5 \times 10^7$  mid-log *L. infantum* WT promastigotes were exposed to 5  $\mu$ g/mL purified EVs for 3 h and then exposed to the EC90 of the antileishmanial drugs (e.g., Sb, MF or AmB) for 48h in M199 medium at 25°C supplemented with 10% fetal bovine serum and 5  $\mu$ g/mL of haemin at pH 7.0. Parasites were washed twice in HEPES–NaCl (21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 6 mM glucose, pH 7.4) and resuspended in 500  $\mu$ L of HEPES–NaCl containing 25  $\mu$ g/mL of H<sub>2</sub>DCFDA (Invitrogen, USA). Parasites were then incubated in the dark for 30 min and washed twice with HEPES–NaCl. After washing, 200  $\mu$ L of the promastigote resuspension was analyzed with a Cytation 5 machine (BioTek, USA) at 485 nm excitation and 535 nm emission wavelengths. Fluorescence was normalized with the number of living parasites determined by PI staining and manual counting. Experiments were performed with at least three biological replicates from independent cultures, each of which included three technical replicates.

### LC–MS/MS

Liquid chromatography–MS/MS was performed at the Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM, Université de Montréal, Canada). Twenty  $\mu$ g of proteins derived from late-logarithmic *L. infantum* promastigotes were precipitated with 15% trichloroacetic acid/acetone and processed as previously described (Atayde et al., 2019; Douanne et al., 2020a). Briefly, proteins were solubilized using a 6M urea buffer, reduced



by the addition of reduction buffer (45 mM DTT, 100 mM ammonium bicarbonate) for 30 min at 37°C, and then by the addition of alkylation buffer (100 mM iodoacetamide, 100 mM ammonium bicarbonate) for 20 min at 24°C in the dark. Subsequently, an in-solution digestion was performed by the addition of trypsin at a ratio of 1:25 protease/protein. After an overnight incubation at 37°C, reactions were quenched by adding formic acid to a 0.2% final concentration. Samples were cleaned with C18 Zip Tip pipette tips (Millipore, USA), eluates were dried down in a vacuum centrifuge and then re-solubilized under agitation for 15 min in 10 mL of 2% ACN/1% formic acid. The column was installed on the Easy-LLC II system (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark) and coupled to the LTQ Orbitrap Velos (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with a Proxeon nanoelectrospray ion source. Proteomic experiments were performed with at least three biological replicates from independent cultures.

### Database searching and protein identification

All MS/MS samples were analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK; version Mascot in Proteome Discoverer 2.4.0.305). Mascot was set up to search UniProt\_*Leishmania*\_Infantum\_JPCM5, assuming the digestion enzyme trypsin. Mascot was searched with a fragment ion mass tolerance of 0.050 Da and a parent ion tolerance of 10.0 PPM. Carbamidomethyl of cysteine was specified in Mascot as a fixed modification, and oxidation of methionine as a variable modification. Next, validation of MS/MS-based peptide and protein identifications were performed using Scaffold (Scaffold\_4.9.0 version, Proteome Software Inc., Portland, USA). Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 80.0% probability by the Peptide Prophet algorithm. Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 99.0% probability and contained at least 2 identified peptides. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm. Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony. Finally, proteins sharing significant peptide evidence were grouped into clusters.

### Proteomics analysis

The results of the LC-MS/MS were imported and normalized with the Scaffold (version 4.11.0) software. Only proteins with at least 2 normalized spectrum counts in a minimum of three samples were retained for downstream analyses. Protein information was completed with UniprotKB (UniProt, 2019) and TriTrypDB v46 (Aslett et al., 2010) databases. To identify differentially expressed proteins, an adjusted T test p value < 0.05 and fold-change (FC)  $\geq 2$  for upregulated proteins and FC  $\leq 0.5$  for downregulated proteins were set as



thresholds to define the significance. Blast2GO version 6.0.1 was used to map the differentially expressed proteins in the gene ontology (GO) database (Gotz et al., 2008).

### Quantification and statistical analysis

To evaluate the differences between the samples studied, statistical analyses were performed using multiple one-sided unpaired t test ( $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.001$ ,  $****p \leq 0.0001$ ). In the different experiments, each data point represents the average  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). The data were analyzed using GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, La Jolla California, USA). The results are representative of at least three independent experiments.

### Data and code availability

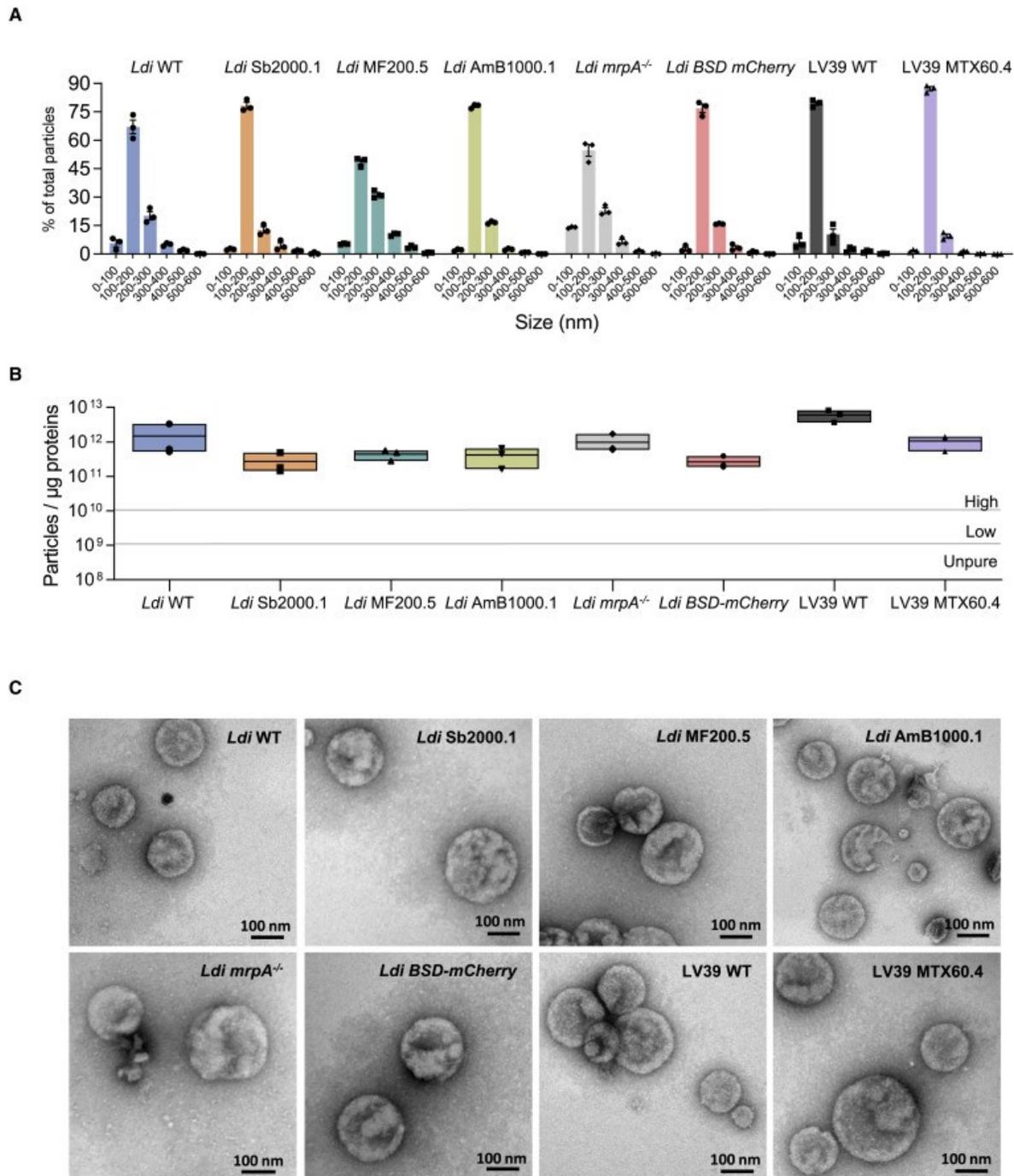
- EV DNA-seq data have been deposited at GEO (GSE200222) and are publicly available as of the date of publication. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) via the iProX partner repository with the dataset identifier PXD034487. Accession numbers are listed in the key resources table.
- This paper does not report original code.
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

### Acknowledgments

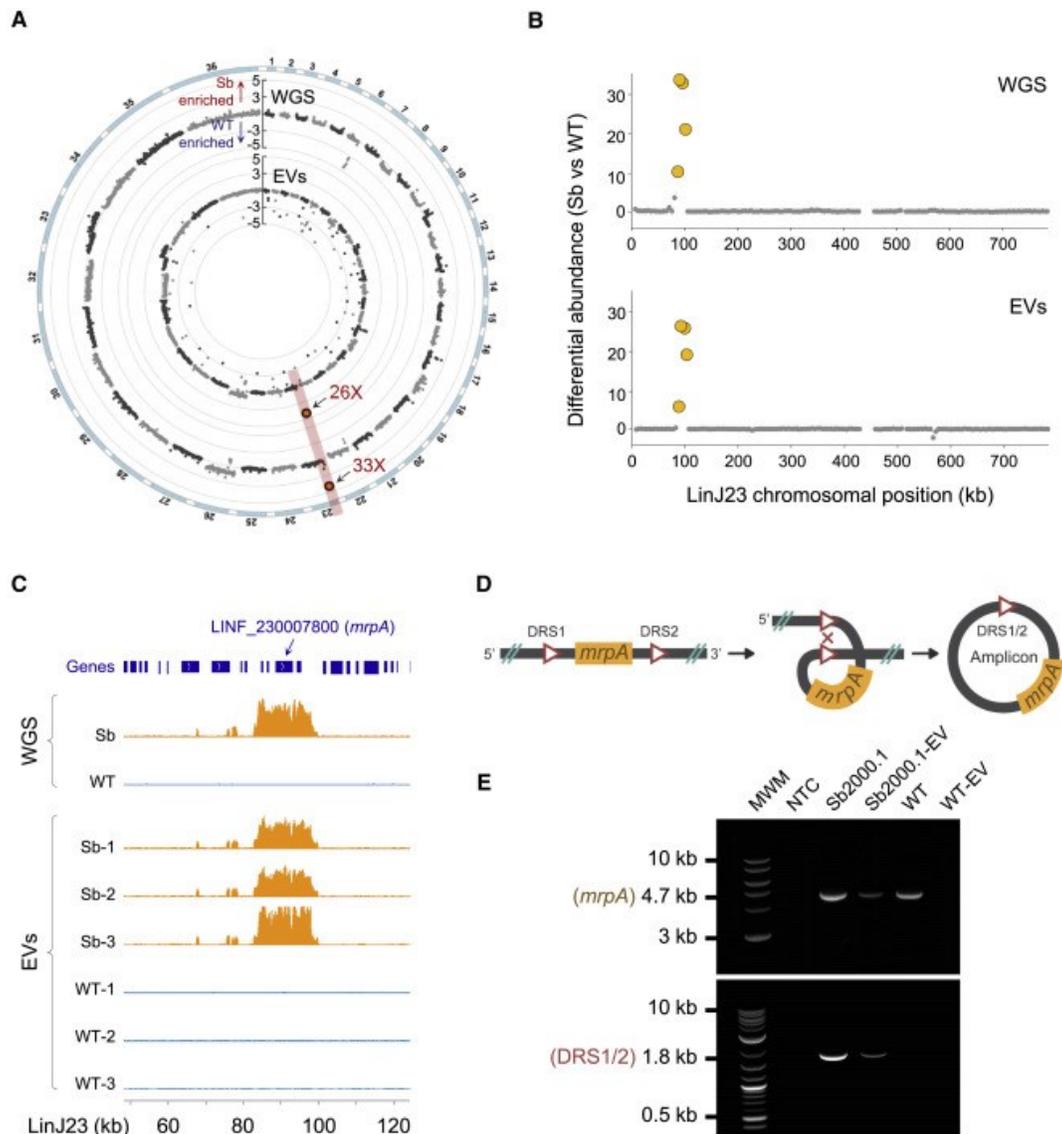
The authors want to thank Prof. Marc Ouellette for the kind gift of the *L. infantum* Sb2000.1, MF200.5, AmB1000.1, and *L. major* MTX60.4 drug-resistant strains. We also thank Dr. Aida Mínguez-Menéndez for her help with the creation of scientific figures. This work was supported by a Canada Institutes of Health Research (CIHR) Project Grant (#173450) to C.F.-P. and M.O. C.F.-P. was also supported by the Canada Foundation for Innovation (CFI) John R. Evans Leaders Fund (#37324 and #38858). D.L. was supported by a CIHR Project Grant (#168959). D.L. was also supported by an FRQ-S, Chercheur-Boursier Junior 1 Award and by the CFI John R. Evans Leaders Fund. N.D. and G.D. were respectively supported by the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT) and the CIHR studentship programs.

### Figures and tables

(next pages)

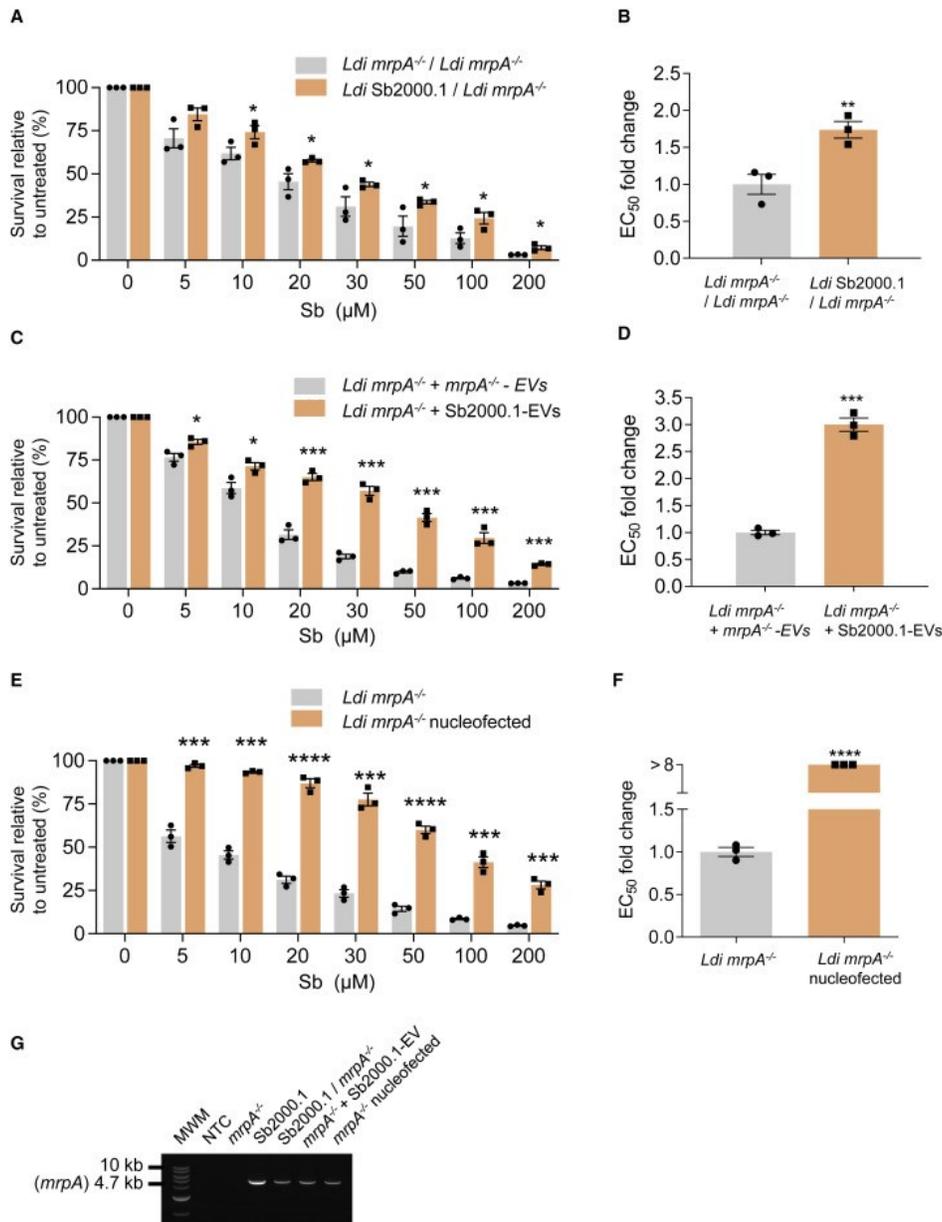


**Fig 1.** Characterization of EVs of different *L. infantum* and *L. major* strains used in this study  
**(A)** Particle size distributions obtained by nanoparticle tracking analysis of *Ldi* WT, *Ldi* Sb2000.1, *Ldi* MF200.5, *Ldi* Amb1000.1, *Ldi* *mrpA*<sup>-/-</sup>, *Ldi*-*BSD*-*mCherry*, LV39 WT, and LV39 MTX60.4 strains. Particle size distributions obtained by ZetaView were expressed as percentages after normalization per 10<sup>6</sup> parasites. **(B)** Use of particle-to-protein ratio to quantify vesicle purity. **(C)** EVs derived from promastigotes were prepared for TEM by negative staining. In **(A–C)**, results are representative of three biological replicates with similar data (or images for the TEM).



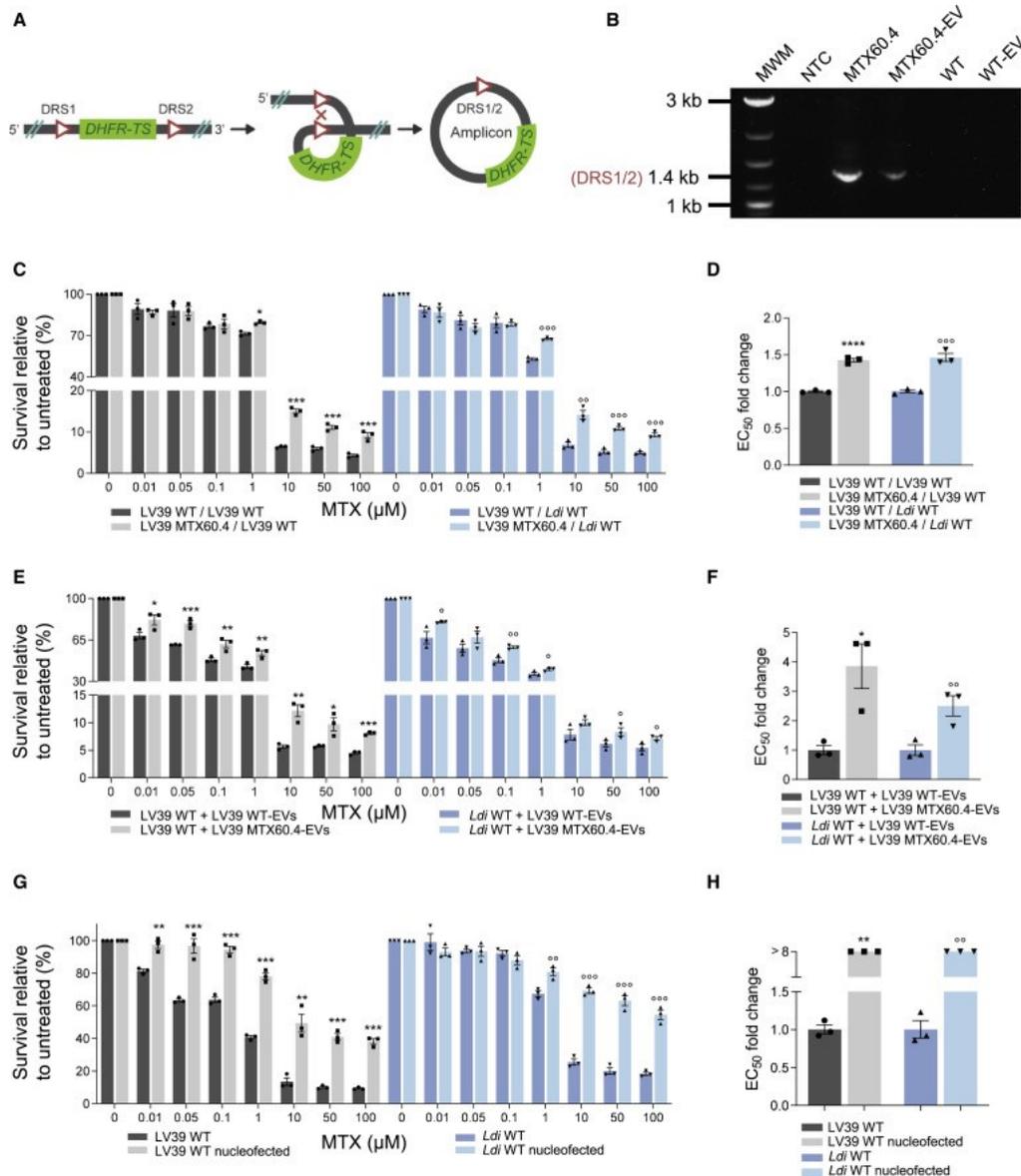
**Fig 2.** Differential enrichment of EV DNA in Sb-sensitive and Sb-resistant parasites

**(A)** Circos plot showing the differential abundance between the whole genome (WGS; outer ring) and the EVs (inner ring) comparing Sb-resistant versus WT parasites for each chromosome. The y axis maximum range was set to -5 to +5, with a region on chromosome LinJ23 highlighted in red and with the above axis fold differences indicated. **(B)** Miami plots showing the enrichment of a 20 kb genomic window (position 80–100 kb) on LinJ23 in both WGS and EVs. **(C)** Sequencing coverage tracks for *L. infantum* WT and Sb2000.1 WGS and triplicates of EVs at the *mrpA* locus; the tracks were normalized according to the total number of mapped reads, read length, and genome size. **(D)** Model for the formation of the extrachromosomal circular DNA amplicon on chromosome 23. The amplicon is generated through homologous recombination between the direct repeated sequences (DRS1 and DRS2). **(E)** PCR experiments validating the presence of the extrachromosomal circular amplicon (DRS1/2; 1.8 kb) containing the *mrpA* resistance gene (4.7 kb) in the Sb2000.1 drug-resistant strain and its EVs. Results are representative of three biological replicates with similar data.

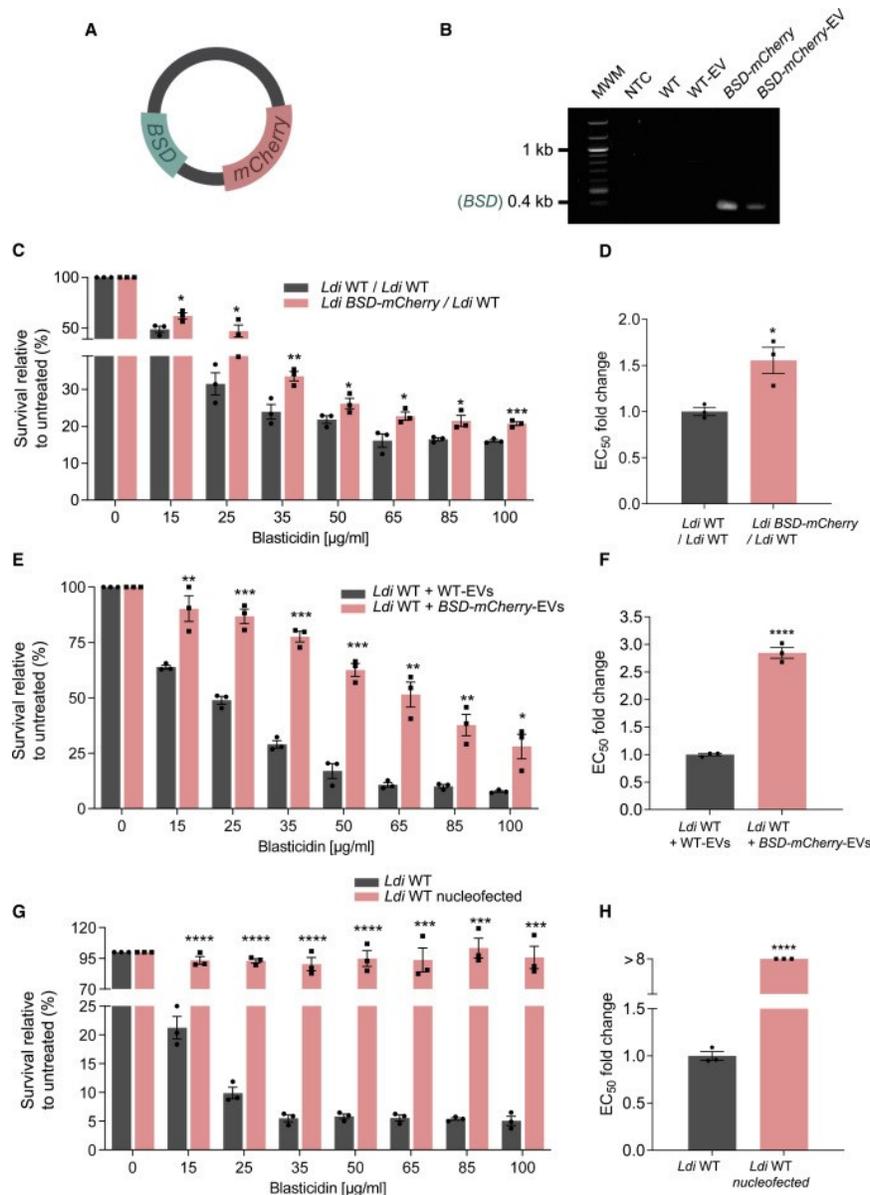


**Fig 3.** Demonstration of HGT events leading to the transmission of the *mrpA* amplicon from drug-resistant to drug-sensitive strains of *L. infantum*

**(A)** Dose-response assays to evaluate the phenotype of recipient parasites after medium sharing in co-culture Transwell assays. **(B)** EC<sub>50</sub> fold-change comparison between conditions depicted in (A). **(C)** Dose-response assays in recipient parasites after exposure to purified EVs. **(D)** EC<sub>50</sub> fold-change comparison between conditions depicted in (C). **(E)** Dose-response assays in recipient parasites after their nucleofection and selection with purified EVs. **(F)** EC<sub>50</sub> fold-change comparison between conditions depicted in (E). In (A), (C), and (E), percentages of survival were calculated and normalized to the untreated control. **(G)** PCR for the demonstration of the presence of the *mrpA* gene in *Ldi mrpA*<sup>-/-</sup> recipient parasites after Transwell assays (A), exposure to EVs (C), and nucleofection (E). In **(A–G)**, the results are representative of three biological replicates with similar data. Each data point represents the average  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). Differences were statistically evaluated by one-tailed unpaired t test (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ).

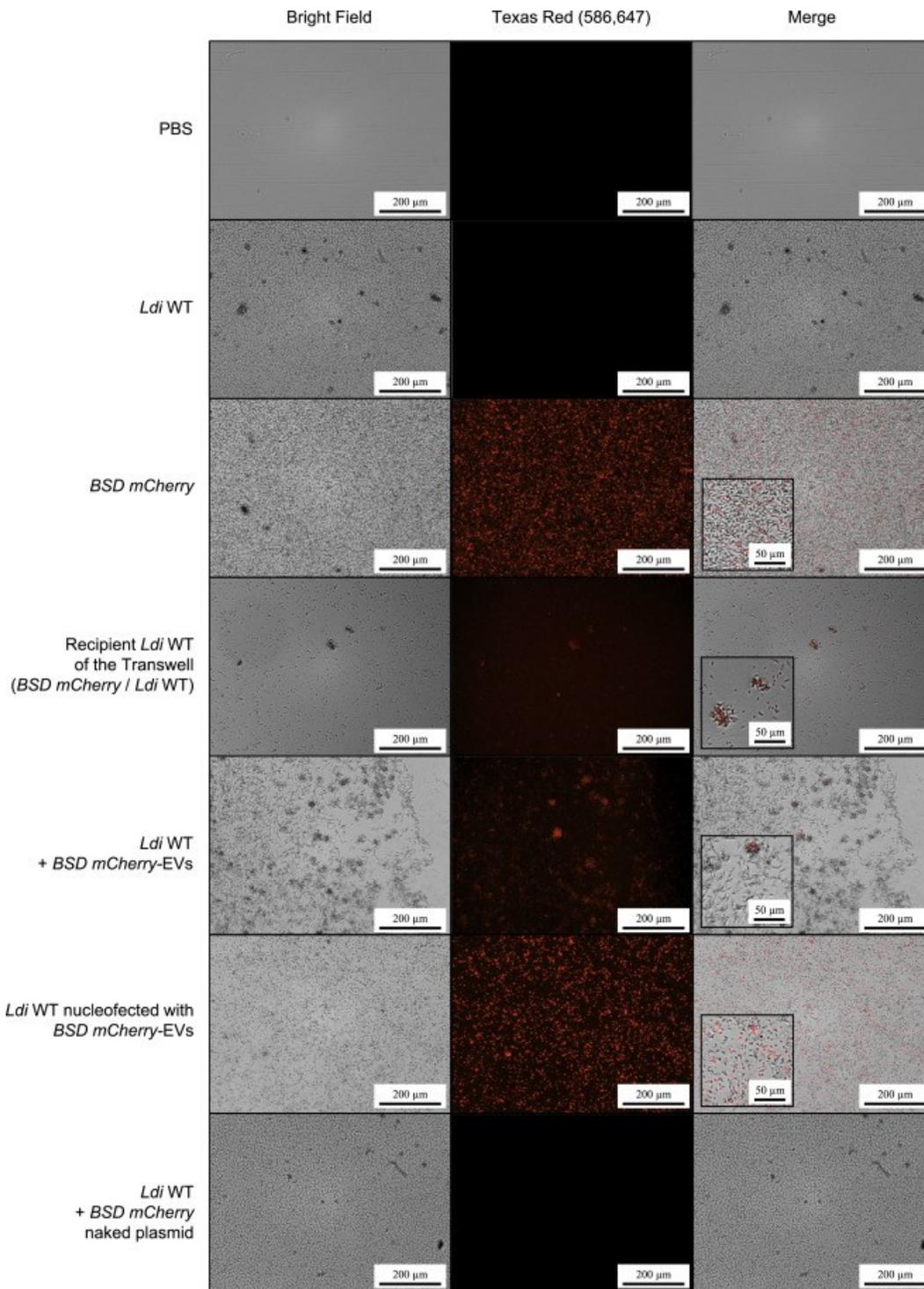


**Fig 4.** Demonstration of HGT and IGT events leading to the transmission of the *DHFR-TS* circular amplicon from *L. major* drug-resistant parasites to *L. major* and *L. infantum* drug-sensitive strains  
**(A)** Model for the formation of the *DHFR-TS* circular amplicon. **(B)** PCR for the confirmation of the presence of the extrachromosomal *DHFR-TS* circular amplicon (*DSR1/2*; 1.4 kb) in the LV39 MTX60.4-resistant strain and in its EVs. **(C)** Dose-response assays to evaluate the phenotype of recipient parasites after medium sharing in co-culture Transwell assays. **(D)** EC<sub>50</sub> fold-change comparison between conditions depicted in (C). **(E)** Dose-response assays in recipient parasites after exposure to purified EVs. **(F)** EC<sub>50</sub> fold-change comparison between conditions depicted in (E). **(G)** Dose-response assays in recipient parasites after their nucleofection and selection with purified EVs. **(H)** EC<sub>50</sub> fold-change comparison between conditions depicted in (G). In (C), (E), and (G), percentages of survival were calculated and normalized to the untreated control. In **(B–H)**, the results are representative of three biological replicates with similar data. Each data point represents the average  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). Differences were statistically evaluated by one-tailed unpaired t test (\*<sup>o</sup> $p \leq 0.05$ , \*\*<sup>oo</sup> $p \leq 0.01$ , \*\*\*<sup>ooo</sup> $p \leq 0.001$ ).



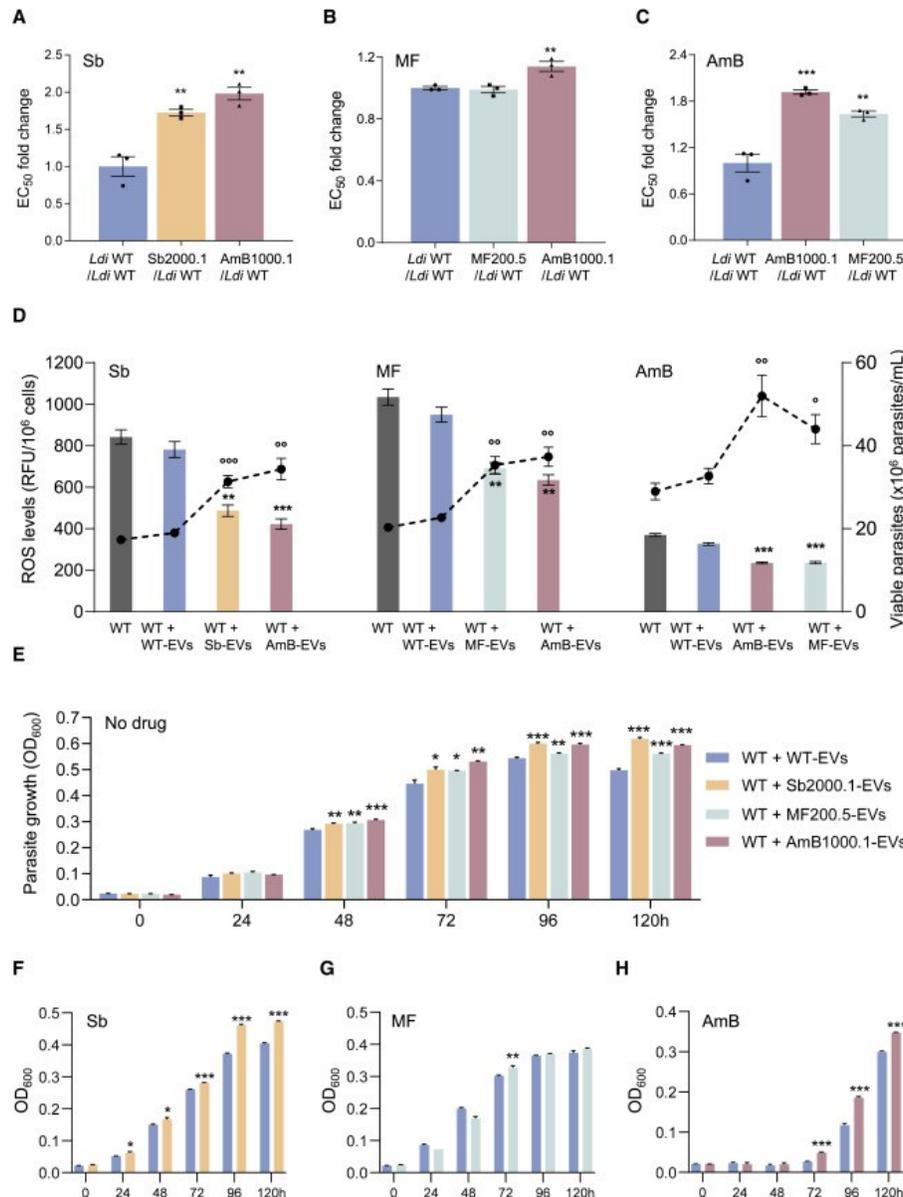
**Fig 5.** Demonstration of HGT events leading to the transmission of artificial plasmid containing *BSD* and *mCherry* genes

**(A)** Schematic representation of the pLEXY-*BSD-mCherry* plasmid. **(B)** PCR confirmation of the presence of the pLEXY-*BSD-mCherry* (*BSD* gene) in *L. infantum* *BSD-mCherry* and its vesicles. **(C)** Dose-response assays to evaluate the phenotype of recipient parasites after medium sharing in co-culture Transwell assays. **(D)** EC<sub>50</sub> fold-change comparison between conditions depicted in (C). **(E)** Dose-response assays in recipient parasites after exposure to purified EVs. **(F)** EC<sub>50</sub> fold-change comparison between conditions depicted in (E). **(G)** Dose-response assays in recipient parasites after their nucleofection and selection with purified EVs. **(H)** EC<sub>50</sub> fold-change comparison between conditions depicted in (G). In (C), (E), and (G), percentages of survival were calculated and normalized to the untreated control. Each data point represents the average  $\pm$  SE ( $n = 3$  biological replicates). Differences were statistically evaluated by one-tailed unpaired t test (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ).



**Fig 6.** Detection of *mCherry* signal by fluorescence microscopy in naive recipient parasites after exposure to *BSD-mCherry*-EVs

Promastigotes (107) corresponding to each strain/condition were washed and plated in black 24-well plates with flat and clear bottom for high-throughput microscopy. Microscopy images were captured with a Cytation 5 machine (BioTek) equipped with the Texas red filter cube (ex/em 586/647 nm). The results are representative of three biological replicates with similar data.



**Fig 7.** Evaluation of the impact of drug-resistant EVs on the drug-sensitivity profile, control of ROS, and general fitness of WT drug-sensitive parasites

**(A–C)** Evaluation of phenotypic changes (EC<sub>50</sub> fold change) in *L. infantum* WT sensitive parasites after 7 days of medium sharing (Transwell assays) with Sb2000.1, MF200.5, and AmB1000.1 *L. infantum* drug-resistant strains. **(D)** Measurement of drug-induced (Sb, MF, and AmB) ROS accumulation (DCFDA fluorescence; Cytation 5; ex/em 485/535 nm) in *L. infantum* WT cells in the presence or absence of purified EVs (WT or drug resistant). Graphs represents the number of viable promastigotes normalized to 10<sup>6</sup> cells/mL (points) and DCFDA fluorescence normalized to 10<sup>6</sup> promastigotes (bars). **(E)** Parasite growth in the presence of purified EVs was measured (Cytation 5; OD<sub>600</sub>) every 24 h for 6 days in drug-free media. **(F–H)** Parasite growth in the presence of purified EVs was measured (Cytation 5; OD<sub>600</sub>) every 24 h for 6 days in medium containing Sb, MF, or AmB. In **(A–H)**, the results are representative of three biological replicates with similar data. Each data point represents the average ± SEM. Differences were statistically evaluated by one-tailed unpaired t test (\*<sup>o</sup>p ≤ 0.05, \*\*<sup>oo</sup>p ≤ 0.01, \*\*\*<sup>ooo</sup>p ≤ 0.001).

## Supplemental information

Document S1. Figures S1–S7 and Tables S1–S5. [Download .pdf \(3.02 MB\)](#)

Data S1. DNA-seq differential gene expression analysis of *Leishmania infantum* Sb2001 versus *Leishmania infantum* WT, related to STAR Methods. [Download .xlsx \(1.52 MB\)](#)

Data S2. *Leishmania infantum* WT proteomic data after clustering and filtering, related to STAR Methods. [Download .xlsx \(.26 MB\)](#)

## Declaration of interests

All authors declare no competing interests.

## Références

- Akopyants, N.S., Kimblin, N., Secundino, N., Patrick, R., Peters, N., Lawyer, P., Dobson, D.E., Beverley, S.M., and Sacks, D.L. (2009). Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science* 324, 265–268. <https://doi.org/10.1126/science.1169464>.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. [Online]. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Aslett, M., Aurrecochea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B.P., Carrington, M., Depledge, D.P., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., et al. (2010). TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res.* 38, D457–D462. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp851>.
- Atayde, V., Aslan, H., Townsend, S., Hassani, K., Kamhawi, S., and Olivier, M. (2015). Exosome secretion by the parasitic Protozoan *Leishmania* within the sand fly midgut. *Cell Rep.* 13, 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.058>.
- Atayde, V.D., da Silva Lira Filho, A., Chaparro, V., Zimmermann, A., Martel, C., Jaramillo, M., and Olivier, M. (2019). Exploitation of the *Leishmania* exosomal pathway by *Leishmania* RNA virus 1. *Nat. Microbiol.* 4, 714–723. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0352-y>.
- Balaj, L., Lessard, R., Dai, L., Cho, Y.J., Pomeroy, S.L., Breakefield, X.O., and Skog, J. (2011). Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat. Commun.* 2, 180. <https://doi.org/10.1038/ncomms1180>.
- Bellotti, C., Lang, K., Kuplennik, N., Sosnik, A., and Steinfeld, R. (2021). Highgrade extracellular vesicles preparation by combined size-exclusion and affinity chromatography. *Sci. Rep.* 11, 10550. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90022-y>.
- Berg, M., García-Hernández R., Cuypers, B., Vanaerschot, M., Manzano, J.I., Poveda, J.A., Ferragut, J.A., Castanys, S., Dujardin, J.C., and Gamarro, F. (2015). Experimental resistance to drug combinations in *Leishmania donovani* metabolic and phenotypic adaptations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 2242–2255. <https://doi.org/10.1128/AAC.04231-14>.
- Beverley, S.M. (1991). Gene amplification in *Leishmania*. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 417–444. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.45.100191.002221>.
- Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Brotherton, M.C., Bourassa, S., Leprohon, P., Légaré D., Poirier, G.G., Droit, A., and Ouellette, M. (2013). Proteomic and genomic analyses of antimony resistant *Leishmania infantum* mutant. *PLoS One* 8, e81899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081899>.

- Brotherton, M.C., Bourassa, S., Légaré D., Poirier, G.G., Droit, A., and Ouellette, M. (2014). Quantitative proteomic analysis of amphotericin B resistance in *Leishmania infantum*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 4, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.05.002>.
- Bussotti, G., Gouzou, E., Côrtes Boité M., Kherachi, I., Harrat, Z., Eddaikra, N., Mottram, J.C., Antoniou, M., Christodoulou, V., Bali, A., et al. (2018). *Leishmania* genome dynamics during environmental adaptation reveal strainspecific differences in gene copy number variation, karyotype instability, and telomeric amplification. *mBio* 9, e01399–18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01399-18>.
- Calvo-Álvarez, E., Álvarez-Velilla, R., Jiménez M., Molina, R., Pérez-Pertejo Y., Balaña-Fouce R., and Reguera, R.M. (2014). First evidence of intraclonal genetic exchange in trypanosomatids using two *Leishmania infantum* fluorescent transgenic clones. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3075. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003075>.
- Da Silva Lira Filho, A., Fajardo, E.F., Chang, K.P., Cle´ment, P., and Olivier, M. (2022). *Leishmania* exosomes/extracellular vesicles containing GP63 are essential for enhance cutaneous leishmaniasis development upon Co-inoculation of *Leishmania amazonensis* and its exosomes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 709258. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.709258>.
- Dell'Annunziata, F., Folliero, V., Giugliano, R., De Filippis, A., Santarcangelo, C., Izzo, V., Daglia, M., Galdiero, M., Arciola, C.R., and Franci, G. (2021). Gene transfer potential of outer membrane vesicles of gram-negative bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 5985. <https://doi.org/10.3390/ijms22115985>.
- Dey, R., Joshi, A.B., Oliveira, F., Pereira, L., Guimaraes-Costa, A.B., Serafim, ~ T.D., de Castro, W., Coutinho-Abreu, I.V., Bhattacharya, P., Townsend, S., et al. (2018). Gut microbes egested during bites of infected sand flies augment severity of leishmaniasis via inflammasome-derived IL-1b. *Cell Host Microbe* 23, 134–143.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.002>.
- Dong, G., Wagner, V., Minguez-Menendez, A., Fernandez-Prada, C., and Olivier, M. (2021). Extracellular vesicles and leishmaniasis: current knowledge and promising avenues for future development. *Mol. Immunol.* 135, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.04.003>.
- Douanne, N., Dong, G., Douanne, M., Olivier, M., and Fernandez-Prada, C. (2020a). Unravelling the proteomic signature of extracellular vesicles released by drug-resistant *Leishmania infantum* parasites. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008439. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008439>.
- Douanne, N., Wagner, V., Roy, G., Leprohon, P., Ouellette, M., and FernandezPrada, C. (2020b). MRPA-independent mechanisms of antimony resistance in *Leishmania infantum*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 13, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.03.003>.
- Downing, T., Imamura, H., Decuyper, S., Clark, T.G., Coombs, G.H., Cotton, J.A., Hilley, J.D., de Doncker, S., Maes, I., Mottram, J.C., et al. (2011). Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Res.* 21, 2143–2156. <https://doi.org/10.1101/gr.123430.111>.
- Droese, S. (2013). Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 578–587. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.01.004>.
- El Fadili, K., Messier, N., Leprohon, P., Roy, G., Guimond, C., Trudel, N., Saravia, N.G., Papadopoulou, B., Legare, D., and Ouellette, M. (2005). Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1988–1993. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1988-1993.2005>.
- Elzanowska, J., Semira, C., and Costa-Silva, B. (2021). DNA in extracellular vesicles: biological and clinical aspects. *Mol. Oncol.* 15, 1701–1714. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12777>.
- Fernández-Prada, C., Vincent, I.M., Brotherton, M.C., Roberts, M., Roy, G., Rivas, L., Leprohon, P., Smith, T.K., and 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 Negl. Trop. Dis.* 10, e0005171. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005171>.
- Fernández-Prada, C., Douanne, N., Minguez-Menendez, A., Pena, J., Tunes, L.G., Pires, D.E.V., and Monte-Neto, R.L. (2019). Repurposed molecules: a new hope in tackling neglected infectious diseases. In *In Silico Drug Design*, K. Roy, ed. (Academic Press), pp. 119–160. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816125-8.00005-5>.
- Gadelha, A.P.R., Brigagao, C.M., da Silva, M.B., Rodrigues, A.B.M., Guimaraes, A.C.R., Paiva, F., de Souza, W., and Henriques, C. (2020). Insights ~ about the structure of farnesyl diphosphate synthase (FPPS) and the activity of

- bisphosphonates on the proliferation and ultrastructure of *Leishmania* and *Giardia*. *Parasit. Vectors* 13, 168. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04019-z>.
- García-Alcalde, F., Okonechnikov, K., Carbonell, J., Cruz, L.M., Goetz, S., Tarazona, S., Dopazo, J., Meyer, T.F., and Conesa, A. (2012). Qualimap: evaluating next-generation sequencing alignment data. *Bioinformatics* 28, 2678–2679. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts503>.
  - Gotz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Williams, T.D., Nagaraj, S.H., Nueda, M.J., Robles, M., Talon, M., Dopazo, J., and Conesa, A. (2008). Highthroughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.* 36, 3420–3435. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn176>.
  - Grunebast, J., and Clos, J. (2020). *Leishmania*: responding to environmental signals and challenges without regulated transcription. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 18, 4016–4023. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.058>.
  - Guimond, C., Trudel, N., Brochu, C., Marquis, N., El Fadili, A., Peytavi, R., Briand, G., Richard, D., Messier, N., Papadopoulou, B., et al. (2003). Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* 31, 5886–5896. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg806>.
  - Hassani, K., Shio, M.T., Martel, C., Faubert, D., and Olivier, M. (2014). Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of *Leishmania* exosomes. *PLoS One* 9, e95007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095007>.
  - Kahlert, C., Melo, S.A., Protopopov, A., Tang, J., Seth, S., Koch, M., Zhang, J., Weitz, J., Chin, L., Futreal, A., and Kalluri, R. (2014). Identification of doublestranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J. Biol. Chem.* 289, 3869–3875. <https://doi.org/10.1074/jbc.C113.532267>.
  - Langdon, W.B. (2015). Performance of genetic programming optimised Bowtie2 on genome comparison and analytic testing (GCAT) benchmarks. *BioData Min.* 8, 1. <https://doi.org/10.1186/s13040-014-0034-0>.
  - Lee, T.H., Chennakrishnaiah, S., Meehan, B., Montermini, L., Garnier, D., D’Asti, E., Hou, W., Magnus, N., Gayden, T., Jabado, N., et al. (2016). Barriers to horizontal cell transformation by extracellular vesicles containing oncogenic H-ras. *Oncotarget* 7, 51991–52002. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10627>.
  - Leprohon, P., Legare, D., Raymond, F., Madore, E., Hardiman, G., Corbeil, J., and Ouellette, M. (2009). Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Res.* 37, 1387–1399. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1069>.
  - Leprohon, P., Fernandez-Prada, C., Gazanion, É, Monte-Neto, R., and Ouellette, M. (2015). Drug resistance analysis by next generation sequencing in *Leishmania*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 5, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.09.005>. *Cell Reports* 40, 111121, July 19, 2022 15 Article II OPEN ACCESS
  - Li, H. (2013). Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. Preprint at arXiv. 1303.3997.
  - Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
  - Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>.
  - Louradour, I., Ferreira, T.R., Ghosh, K., Shaik, J., and Sacks, D. (2020). In vitro generation of *Leishmania* hybrids. *Cell Rep.* 31, 107507. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.071>.
  - Louradour, I., Ferreira, T.R., Duge, E., Karunaweera, N., Paun, A., and Sacks, D. (2022). Stress conditions promote *Leishmania* hybridization in vitro marked by expression of the ancestral gamete fusogen HAP2 as revealed by singlecell RNA-seq. *Elife* 11, e73488. <https://doi.org/10.7554/eLife.73488>.
  - Monte-Neto, R.L., Fernandez-Prada, C., and Moretti, N.S. (2022). Sex under pressure: stress facilitates *Leishmania* in vitro hybridization. *Trends Parasitol.* 38, 274–276. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.02.001>.
  - Moreira, W., Leprohon, P., and Ouellette, M. (2011). Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. *Cell Death Dis.* 2, e201. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.83>.
  - Mukherjee, A., Padmanabhan, P.K., Singh, S., Roy, G., Girard, I., Chatterjee, M., Ouellette, M., and Madhubala, R. (2007). Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 204–211. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl494>.
  - Pereira, L.O.R., Sousa, C.S., Ramos, H.C.P., Torres-Santos, E.C., Pinheiro, L.S., Alves, M.R., Cuervo, P., Romero, G.A.S., Boité, M.C., Porrozzi, R., and Cupolillo, E. (2021). Insights from *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in vitro behavior and intercellular communication. *Parasit. Vectors* 14, 556. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05057-x>.

- Picard, T. (2018). <http://broadinstitute.github.io/picard/>.
- Qin, Y., Guo, Z., Huang, H., Zhu, L., Dong, S., Zhu, Y.G., Cui, L., and Huang, Q. (2022). Widespread of potential pathogen-derived extracellular vesicles carrying antibiotic resistance genes in indoor dust. *Environ. Sci. Technol.* 56, 5653–5663. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c08654>.
- Ramírez, F., Ryan, D.P., Gruning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A.S., Heyne, S., Dundar, F., and Manke, T. (2016). deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* 44, W160–W165. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw257>.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
- Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., and Mesirov, J.P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 29, 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>.
- Romano, A., Inbar, E., Debrabant, A., Charmoy, M., Lawyer, P., RibeiroGomes, F., Barhoumi, M., Grigg, M., Shaik, J., Dobson, D., et al. (2014). Cross-species genetic exchange between visceral and cutaneous strains of *Leishmania* in the sand fly vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 16808–16813. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415109111>.
- Silverman, J.M., Clos, J., deOliveira, C.C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, C., Foster, L.J., and Reiner, N.E. (2010). An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J. Cell Sci.* 123, 842–852. <https://doi.org/10.1242/jcs.056465>.
- Stoten, C.L., and Carlton, J.G. (2018). ESCRT-dependent control of membrane remodelling during cell division. *Semin. Cell Dev. Biol.* 74, 50–65. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.035>.
- Sundar, S., and Singh, B. (2018). Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis. *Expert Opin. Ther. Targets* 22, 467–486. <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1472241>.
- Tripp, C.A., Myler, P.J., and Stuart, K. (1991). A DNA sequence (LD1) which occurs in several genomic organizations in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 47, 151–160. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90174-5](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90174-5).
- Ubeda, J.M., Le´gare´, D., Raymond, F., Ouameur, A., Boisvert, S., Rigault, P., Corbeil, J., Tremblay, M.J., Olivier, M., Papadopoulou, B., and Ouellette, M. (2008). Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. *Genome Biol.* 9, R115. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-7-r115>.
- Ubeda, J.M., Raymond, F., Mukherjee, A., Plourde, M., Gingras, H., Roy, G., Lapointe, A., Leprohon, P., Papadopoulou, B., Corbeil, J., and Ouellette, M. (2014). Genome-wide stochastic adaptive DNA amplification at direct and inverted DNA repeats in the parasite *Leishmania*. *PLoS Biol.* 12, e1001868. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001868>.
- UniProt Consortium (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 47, D506–D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>.
- Vagner, T., Spinelli, C., Minciacci, V.R., Balaj, L., Zandian, M., Conley, A., Zijlstra, A., Freeman, M.R., Demichelis, F., De, S., et al. (2018). Large extracellular vesicles carry most of the tumour DNA circulating in prostate cancer patient plasma. *J. Extracell. Vesicles* 7, 1505403. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1505403>.
- Van Bockstal, L., Hendrickx, S., Maes, L., and Caljon, G. (2020). Sand fly studies predict transmission potential of drug-resistant *Leishmania*. *Trends Parasitol.* 36, 785–795. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.06.006>.
- Vaughan, E.E., and Dean, D.A. (2006). Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules. *Mol. Ther.* 13, 422–428. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.10.004>.
- Verner Z., Čermáková P., Škodová I., Kováčová B., Lukeš J., Horváth A.. (2014). Comparative analysis of respiratory chain and oxidative phosphorylation in *Leishmania tarentolae*, *Crithidia fasciculata*, *Phytomonas serpens* and procyclic stage of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 193, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.02.003>.
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P.R.M., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borra` s, F.E., Buzas, E.I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., et al. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* 4, 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>.
- Yin, L., Zhang, H., Tang, Z., Xu, J., Yin, D., Zhang, Z., Yuan, X., Zhu, M., Zhao, S., Li, X., and Liu, X. (2021). rMVP: a memory-efficient, visualization-enhanced, and parallel-accelerated tool for genome-wide association study. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 19, 619–628. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2020.10.007>.
- Zhang, C., Ji, Q., Yang, Y., Li, Q., and Wang, Z. (2018). Exosome: function and role in cancer metastasis and drug resistance. *Technol. Cancer Res. Treat.* 17, 153303381876345. <https://doi.org/10.1177/1533033818763450>.



## Partie 4 - [Discussion]

Les antimicrobiens sont nécessaires pour le traitement, le contrôle et la prévention des infections, mais leur utilisation abusive et non contrôlée a entraîné l'émergence et la propagation de souches microbiennes résistantes. Bien que l'évolution de la résistance aux médicaments soit l'un des plus grands défis dans la lutte contre les maladies infectieuses, le(s) mécanisme(s) conduisant à la propagation de la résistance reste à l'heure actuelle encore mal compris. Ceci constitue un problème de santé publique et vétérinaire d'ampleur mondiale, où la recherche reste indispensable.

Dans le cas de la leishmaniose, la résistance aux médicaments est un phénomène présent depuis plusieurs années. Comme présenté dans la [Partie 1](#), le contrôle de la maladie repose principalement sur la chimiothérapie, en raison de l'absence de vaccin efficace. Cependant, le manque de molécules homologuées disponibles entraîne une utilisation commune des produits entre les chiens et les humains et favorise par conséquent l'émergence et la propagation de souches résistantes aux médicaments. Grâce au développement de nouvelles technologies (en particulier les approches -omiques [481], et revu par [482]), plusieurs modifications/adaptations mises en place par le protozoaire pour assurer sa survie dans les conditions de stress environnementales (telles que la pression médicamenteuse) ont ainsi pu être identifiées. En raison des nombreux changements génomiques (aneuploidie [224, 225, 251], amplifications géniques [256, 258], SNP [263-266], délétions [257], ...) mises en place par *Leishmania*, les chercheurs l'ont qualifié comme étant un parasite doté d'une « incroyable plasticité génomique » ; une caractéristique qui rend d'ailleurs difficile la compréhension de la résistance.

Par ailleurs, ces dernières années, l'intérêt de la communauté scientifique s'est beaucoup orienté sur l'étude des vésicules extracellulaires (EVs) (revu par [752, 753]). Bien que les travaux concernés aient majoritairement des thématiques d'études en lien avec la biologie des cellules humaines, plusieurs études ont permis d'acquérir des connaissances sur les EVs de différents pathogènes. Bon nombre d'entre eux sont en effet capables de produire ces vésicules, et *Leishmania* en fait partie. Il est d'ailleurs maintenant connu que les EVs du protozoaire font partie intégrante de son cycle de vie, et qu'elles constituent de puissants médiateurs dans la communication intercellulaire. Plus précisément, les EVs de *Leishmania* jouent un rôle clé dans l'infection, la survie du parasite et l'ampleur des lésions. Par conséquent, les travaux réalisés ont permis de reconnaître l'importance des EVs du parasite dans les interactions parasite-cellules réceptrices, ainsi que de découvrir que ces vésicules pouvaient être un composant phare des interactions parasite-parasite. En effet, après avoir mis en évidence une sécrétion naturelle des EVs par le parasite au sein du

## Partie 4 [Discussion]

vecteur, des travaux ont permis de révéler que ces vésicules pouvaient également servir d'enveloppe virale au virus LRV1 et assurer sa transmission à d'autres parasites [950]. Cependant, bien que diverses caractéristiques clés aient été découvertes sur les EVs de *Leishmania*, aucune étude n'avait encore été effectuée sur les EVs libérées par des souches résistantes aux médicaments. Pour ces diverses raisons, nous avons voulu mieux comprendre les rôles potentiels des EVs de *Leishmania*, dans son développement et dans la propagation de souches résistantes aux médicaments.

Nous avons commencé par isoler et caractériser les EVs libérées par la forme promastigote de trois souches de *L. infantum* résistantes aux médicaments (à l'antimoine (Sb2000.1), à la miltefosine (MF200.5) et à l'amphotéricine B (AmB1000.1)), ainsi que leur homologue WT. Comme présenté dans la [Partie 1](#), ces médicaments sont présents sur la LME de l'OMS pour le traitement de la leishmaniose. Plus précisément, même si leur introduction sur le marché date de plusieurs années, et que leur toxicité est connue, les antimoiines pentavalents (Sb<sup>V</sup>) sont considérés comme des médicaments de première intention, autant pour lutter contre la leishmaniose humaine que pour la leishmaniose canine (LCan) (revu par [345, 357]). Grâce à son efficacité et à sa forme orale, la miltefosine (MF) a quant à elle été considérée comme une percée majeure dans le développement d'agents chimiothérapeutiques contre *Leishmania* [377]. Due à l'émergence grandissante de la résistance au Sb<sup>V</sup>, la MF a notamment été approuvée comme premier traitement oral pour la LV indienne [376], et comme médicament de premier choix contre la LCan, dans les pays d'Europe du Sud [373]. De même, les formulations lipidiques d'Amphotéricine B (AmB) (moins toxiques que les formulations précédentes) ont été utilisées chez de nombreux patients atteints de leishmaniose réfractaire au Sb<sup>V</sup> (revu par [358]), et comme 2<sup>nd</sup> ou 3<sup>ème</sup> choix pour le traitement de la LCan [40, 346]. Bien que chacun de ces médicaments possède des mécanismes d'action spécifiques, plusieurs travaux ont rapporté la capacité de *Leishmania* à les détourner et à développer une résistance ; phénomène notamment illustré par la plasticité génomique du protozoaire, précédemment évoquée. Par conséquent, il est acquis que la résistance aux médicaments est un ensemble de mécanismes complexes, et c'est notamment pour ces raisons que l'étude de différentes souches résistantes nous a semblé pertinente. En effet, sachant que les cargaisons des EVs sont le reflet des cellules donneuses [817] et que les fonctions de ces vésicules semblent étroitement liées à leur composition [951], la mise en évidence d'un modèle relationnel entre ces différents aspects nous a semblé être un complément de connaissances indispensables.

Étant donné que les parasites MF200.5 et AmB1000.1 ont tendance à développer une rigidité membranaire accrue suite à des changements marqués dans différentes espèces de lipides (principalement dans les stérols et les phospholipides) [265, 469], et que la biogénèse des EXOs favorise l'enrichissement des stérols



## Partie 4 [Discussion]

dans les cellules eucaryotes [1114], nous nous sommes demandés si des répercussions seraient observables chez les EVs de ces souches (soient les MF200.5-EVs et les AmB1000.1-EVs). Grâce aux analyses microscopiques (TEM) et de NTA, nous avons effectivement pu constater des différences morphologiques notables chez les MF200.5-EVs et chez les AmB1000.1-EVs. Toutefois, des analyses complémentaires telles qu'une analyse spécifique des lipides serait pertinente afin d'identifier précisément les modifications lipidiques responsables de ces changements et de valider (ou non) la corrélation avec les souches résistantes parentales. En accord avec des rapports précédents, nous avons également constaté une augmentation significative de la taille modale des EVs libérées par les souches résistantes MF200.5 et AmB1000.1 [1115]. Étonnamment, nous n'avons pas mis en évidence ce genre d'observation chez les EVs de la souche Sb2000.1, résistante à l'antimoine. Toutefois, nos analyses de la distribution et de l'hétérogénéité des EVs des quatre souches étudiées étaient conforme aux rapports précédents, en indiquant des différences significatives entre chaque souche [886].

Bien que la biogénèse des EVs soit plus ou moins comprise chez les mammifères, le processus précis de la formation des EVs chez *Leishmania* n'a pas encore été totalement identifié (revu par [1116], laissant quelques lacunes dans la compréhension de certains mécanismes, tels que ceux liés au tri des protéines. Ces dernières font d'ailleurs parties des principaux constituants des EVs, et chez des souches *Leishmania* WT, elles ont fait l'objet de plusieurs études [1104, 1108]. Comme indiqué précédemment, sachant que les cargaisons des EVs sont le résultat des mécanismes de tri des protéines ainsi que le reflet de la composition des cellules donneuses [817], il nous a donc semblé judicieux de poursuivre nos analyses par l'étude de la signature protéique des EVs des souches de *Leishmania* résistantes aux médicaments. Conformément aux recommandations MISEV [736], nous avons commencé par identifier les marqueurs protéiques spécifiques, précédemment signalés pour les EVs de *Leishmania*, tels que la métalloprotéase GP63, l'énolase, les protéines de choc thermique HSP70 et HSP83, ainsi que le facteur d'élongation 1 alpha. La suite de nos analyses nous a permis d'identifier plusieurs corrélations entre le protéome des souches résistantes aux médicaments et la composition de leur EVs respectives, telles que l'enrichissement de certaines protéines. De plus, nous avons également identifié un sous-ensemble intéressant de neuf protéines présentes uniquement dans les EVs libérées par les souches résistantes aux médicaments (et donc absentes dans les vésicules de la souche contrôle WT). Il s'agissait notamment de l'histone H3, du facteur de transcription de type histone central (CBF/NF-Y) et de diverses protéines ribosomiques ; des protéines dont le rôle potentiel dans la résistance aux médicaments est soutenu par plusieurs travaux [250, 1117, 1118] et revu par [1119], et dont nous avons discuté dans l'[article 1](#).



## Partie 4 [Discussion]

Nous avons également relevé la présence de protéines uniques enrichies dans les EVs des souches résistantes aux médicaments. De même que pour le sous-ensemble de protéines précédemment indiqué, plusieurs d'entre elles ont été identifiées comme des acteurs clés de divers processus favorisant la survie de *Leishmania* et/ou la résistance aux médicaments. Les liens les plus saillants ont été discutés dans l'[article 1](#), mais pour remettre en contexte on retiendra notamment **(i)** dans les Sb2000.1-EVs (antimoine) : l'ubiquitine ligase contenant le domaine SPRY (dégradation du iNOS), une protéine semblable à l'écotine (inhibition des peptidases) et des protéines ribosomiques (traduction des protéines) ; **(ii)** dans les MF200.5-EVs (miltefosine) : la cystéine-peptidase B (CPB) (facteur de virulence), les hélicases d'ARN (prévention des dommages médiés par les ROS) et les protéines impliquées dans les voies glycolytiques et lipidiques ; et **(iii)** dans les Amb1000.1-EVs (amphotéricine B) : la trypanothione synthétase (TryS) (défense contre les dommages oxydants), la protéine 14-3-3 protein-like (facteur de virulence), et la protéine MRPA (séquestration des conjugués de thiols ; résistance à l'antimoine) ; cette dernière étant également présente dans nos réplicats (2/3) des Sb2000.1-EVs. L'ensemble de ces résultats nous a ainsi permis de valider notre [première hypothèse](#) (selon laquelle *les EVs libérées par les parasites Leishmania résistants aux médicaments pourraient contenir des protéines uniques et différemment enrichies selon les mécanismes de résistance aux médicaments impliqués dans la survie de leur lignée cellulaire parentale*) et de mettre en évidence les premiers maillons de notre modèle relationnel, précédemment évoqué.

Par ailleurs, la transmission de molécules (en particulier d'information génétique) est une des fonctions des EVs qui suscite un intérêt grandissant, en raison des conséquences potentielles engendrées, notamment dans un contexte pathologique. Le « transfert horizontal » d'acides nucléiques par l'intermédiaire des EVs a d'ailleurs été rapidement considéré comme un nouveau mécanisme d'échange entre les cellules [817], et a souligné la complexité par laquelle les cellules peuvent communiquer. Bien que la plupart des travaux s'intéressant à ce nouveau concept se soient essentiellement concentrés sur les ARNs, le transfert horizontal de gènes (HGT) des EVs a également été abordé et confirmé par divers travaux (revu par [897]). Chez *Leishmania*, des échanges génétiques lors d'un cycle sexuel ont été démontrés pendant la croissance et le développement au sein du phlébotome vecteur [1120], mais l'implication des EVs dans un tel mécanisme n'avait jamais été démontré, ni même chez d'autres parasites eucaryotes. Pourtant, les découvertes obtenues sur le LRV1 [950] montrent bien que les EVs du protozoaire peuvent potentiellement servir de navette pour le transfert d'acides nucléiques.

Par conséquent, au vu de nos découvertes sur la cargaison des EVs libérées par les souches résistantes aux médicaments, et considérant que les EVs constituent des acteurs clés pour la transmission de molécules,



## Partie 4 [Discussion]

nous avons voulu approfondir nos analyses en nous intéressant de plus près à la composition en acides nucléiques des EVs libérées par la souche résistante au Sb. L'explication de ce choix reposait notamment sur une caractéristique génomique spécifique à cette souche, à savoir sa capacité à former des amplifications extrachromosomiques (aussi nommées « amplicons circulaires ») contenant le gène de résistance *mrpA* et présent sur le locus H du chromosome 23 [256, 555]. Ce gène code pour la protéine MRPA (un transporteur ABC (« *ATP-binding cassette* ») qui séquestre le Sb (conjugué métal-thiol) dans des vésicules intracellulaires (situées près de la poche flagellaire du parasite), et qui sont ensuite exocytées [521, 556]. Comme indiqué précédemment, cette protéine était présente dans nos réplicats (2/3) des Sb2000.1-EVs, ce qui nous a amené à nous demander si les amplicons circulaires contenant le gène de résistance *mrpA* faisaient ou non également parti de la composition de ces vésicules. À plus large échelle nous nous sommes également demandé si les EVs de *Leishmania* pouvaient simplement contenir de l'ADN et si oui (ce que nous supposons), si cet ADN pouvait varier en fonction de la résistance aux médicaments des souches parentales, comme nous l'avons mis en évidence pour la signature moléculaire protéique. Bien que la présence d'ADN dans les EVs a fait l'objet de peu d'études (en comparaison à l'intérêt porté à l'ARN), différents travaux ont tout de même permis d'identifier divers types d'ADN associés aux EVs [858], tels que l'ADNsb [859], l'ADNdb [860, 861] et l'ADNmt [862]. De plus, en accord avec les propos précédents selon lesquels les cargaisons des EVs sont le reflet des cellules donneuses et des mécanismes de tri régulés, des études ont montré que (i) les EVs dérivées de tumeurs contiennent de l'ADN qui reflète le statut génétique de la tumeur [859], et (ii) que la teneur en ADN diffère selon les catégories et les sous-types d'EVs (validant ainsi le possible conditionnement sélectif de l'ADN dans les EVs) [863, 864]. D'autre part, tel que discuté dans l'[article 2](#), des travaux récents ont démontré la présence de gènes de résistance aux antibiotiques dans des vésicules bactériennes [945]. Ainsi, en accord avec ces informations, nos analyses ont révélé que des fragments de presque tout le génome des souches *L. infantum* WT et Sb2000.1 étaient présents dans leurs EVs respectives. Dans les Sb2000.1-EVs, nos résultats ont également mis en évidence un enrichissement majeur au niveau de la région codant pour le gène *mrpA* (ainsi que la présence de l'amplicon) reflétant ainsi les traits génétiques de la souche résistante à l'antimoine, et par conséquent soutenant la possibilité d'un potentiel transfère du gène (et donc de la résistance).

Pour garantir des HGTs, il est important que l'ADN soit protégé de la dégradation lors de son transit entre les cellules. Dans cette mesure, nous avons constaté que l'amplicon était présent à l'extérieur des Sb2000.1-EVs, mais qu'il faisait également parti de la composition interne des vésicules. La manière précise dont il est encapsulé dans les EVs reste incertain, mais tel que discuté dans l'[article 2](#), les connaissances actuelles



## Partie 4 [Discussion]

nous amènent à penser que l'absorption des amplicons dans les EVs est liée à la machinerie ESCRT ; récemment identifiée comme un acteur clé de la division cellulaire et du remodelage de la membrane mitotique [1121]. De plus, bien que la taille de l'amplicon paraisse conséquente pour des petites EVs que sont les vésicules de notre étude, la présence de gros fragments d'ADN génomique a déjà été observée dans des petites EVs produites par des cellules cancéreuses [860], soutenant ainsi notre découverte.

Une fois l'association amplicon-EVs confirmée, nous avons exploré si ces EVs pouvaient être impliquées dans des événements de HGTs chez les promastigotes. Comme énoncé précédemment, les EVs de *Leishmania* font partie intégrante de son cycle de vie, et constituent de puissants médiateurs dans la communication intercellulaire, à la fois dans les interactions parasite-cellules cibles et parasite-parasite. Par conséquent, la possibilité du protozoaire à transférer des gènes de résistance *via* des événements de HGTs pourraient potentiellement expliquer la propagation de la résistance aux médicaments ; un aspect inquiétant que nous avons voulu vérifier. Le gène *mrpA* étant naturellement présent dans le génome de la souche *L. infantum* WT, nous avons jugé pertinent d'utiliser une souche hypersensible au Sb (*Ldi-mrpA<sup>-/-</sup>*) [559] pour nos expériences, afin de pouvoir confirmer le transfert du gène par le biais de diverses analyses, dont celle de l'ADN. Ainsi, nous avons exposé la souche *Ldi-mrpA<sup>-/-</sup>* aux Sb2000.1-EVs, au moyen de différentes approches expérimentales, et sans pression médicamenteuse, afin de ne pas engendrer chez le protozoaire des réponses au stress qui auraient pu perturber nos analyses. Bien que quelques variations aient été observées entre les différentes approches, nos résultats des tests dose-réponse en présence de concentrations croissantes de Sb ont démontré que les parasites receveurs exposés aux Sb2000.1-EVs avaient des niveaux de résistance accrus par rapport à ceux exposés aux EVs de la souche *Ldi-mrpA<sup>-/-</sup>*. Comme souhaité, le succès de l'événement HGT a également pu être confirmé par une amplification PCR ciblant la séquence codante complète du gène *mrpA*, réalisé sur l'ADN total des parasites receveurs après leur exposition aux EVs.

En soutien de nos résultats, des travaux récents ont montré une sensibilité réduite aux médicaments chez des parasites sensibles au Sb mis en culture avec des parasites résistants [1122], ainsi que la capacité du protozoaire à effectuer des échanges génomiques (*in vitro* et dans le phlébotome vecteur) par la formation d'hybrides intra- et inter-espèces [1123]. Ces résultats soulignent un problème majeur d'un point de vue clinique, dans le sens où de tels événements pourraient être à l'origine d'une réponse médiocre au traitement (voire inefficace) chez les patients atteints de leishmaniose [1123]. De plus, l'inter-spécificité évoquée par les auteurs rend plus inquiétantes les répercussions des échanges, puisque cela étend la problématique aux différentes formes de leishmaniose ; un aspect que nous avons également abordé. En effet, nous avons



## Partie 4 [Discussion]

montré que la résistance au méthotrexate (MTX) a été efficacement transférée de la souche résistante *L. major* MTX60.4 à la souche sensible *L. infantum* WT, dans les différentes approches expérimentales. Ainsi, non seulement nous avons démontré pour la première fois la présence d'évènements de HGTs chez les parasites eucaryotes, *via* les vésicules extracellulaires (ce qui valide notre [seconde hypothèse](#), selon laquelle les EVs des parasites *Leishmania* résistants aux médicaments pourraient être impliqués dans l'acquisition de gènes de résistance aux médicaments, en constituant un mécanisme de HGT), mais également que ce nouveau mécanisme d'échange génétique induit par les EVs peut favoriser la propagation de la résistance et/ou de la multirésistance aux médicaments. En effet, considérant que plusieurs espèces de *Leishmania* (avec des profils de sensibilité différents) peuvent se retrouver dans un même phlébotome, nos résultats soutiennent que des *Leishmania* naïfs pourraient potentiellement recevoir simultanément du matériel génétique intra- et interspécifique, acquérir plusieurs gènes de résistance et ainsi développer une multirésistance ; un aspect qu'il serait pertinent de vérifier *via* des études complémentaires, *in vitro* et surtout *in vivo* chez des phlébotomes. Il convient d'ailleurs de préciser qu'étant donné que l'intérêt pour la propagation de la résistance aux médicaments chez le vecteur n'a attiré l'attention des chercheurs que récemment (revu par [1124]), des études complémentaires chez le phlébotome participerait à l'enrichissement des connaissances sur des aspects ignorés, qui sont pourtant d'une grande importance.

Dans le but de vérifier le succès des événements de HGTs, nous avons ensuite répété nos expériences en utilisant un plasmide synthétique contenant le gène *mCherry*, qui code pour une protéine fluorescente rouge. Ainsi, grâce à la fluorescence nous avons constaté que l'expression de la protéine *mCherry* nécessitait jusqu'à 72 heures, soutenant ainsi la transmission du gène plutôt que de la protéine elle-même. De plus, nos résultats ont indiqué une transformation d'environ 20% de la population parasitaire, et ce en l'absence de toute pression de sélection médicamenteuse ; un taux d'efficacité de HGT d'ailleurs comparable à celui rapporté dans d'autres travaux [1120, 1125]. Bien que ce chiffre paraisse relativement bas, sachant que *Leishmania* présente une croissance exponentielle et considérant que les parasites « transformés » puissent à leur tour retransmettre du matériel propice à la résistance *via* leurs EVs, 20% de parasites nouvellement résistants pourrait très vite amener à des chiffres encore plus inquiétants ; un autre aspect qu'il serait également intéressant de vérifier, notamment pour apporter des réponses aux questions suivantes : le matériel transmis intègre-t-il le génome de *Leishmania* ? La résistance peut-elle être transmise sur plusieurs générations de parasites ? En l'absence de pression médicamenteuse, les parasites nouvellement résistants perdent-ils leur capacité à résister au médicament concerné ? Les EVs des parasites nouvellement résistants contiennent-elles également des traits de résistance ? etc. De plus, en continuité de nos remarques

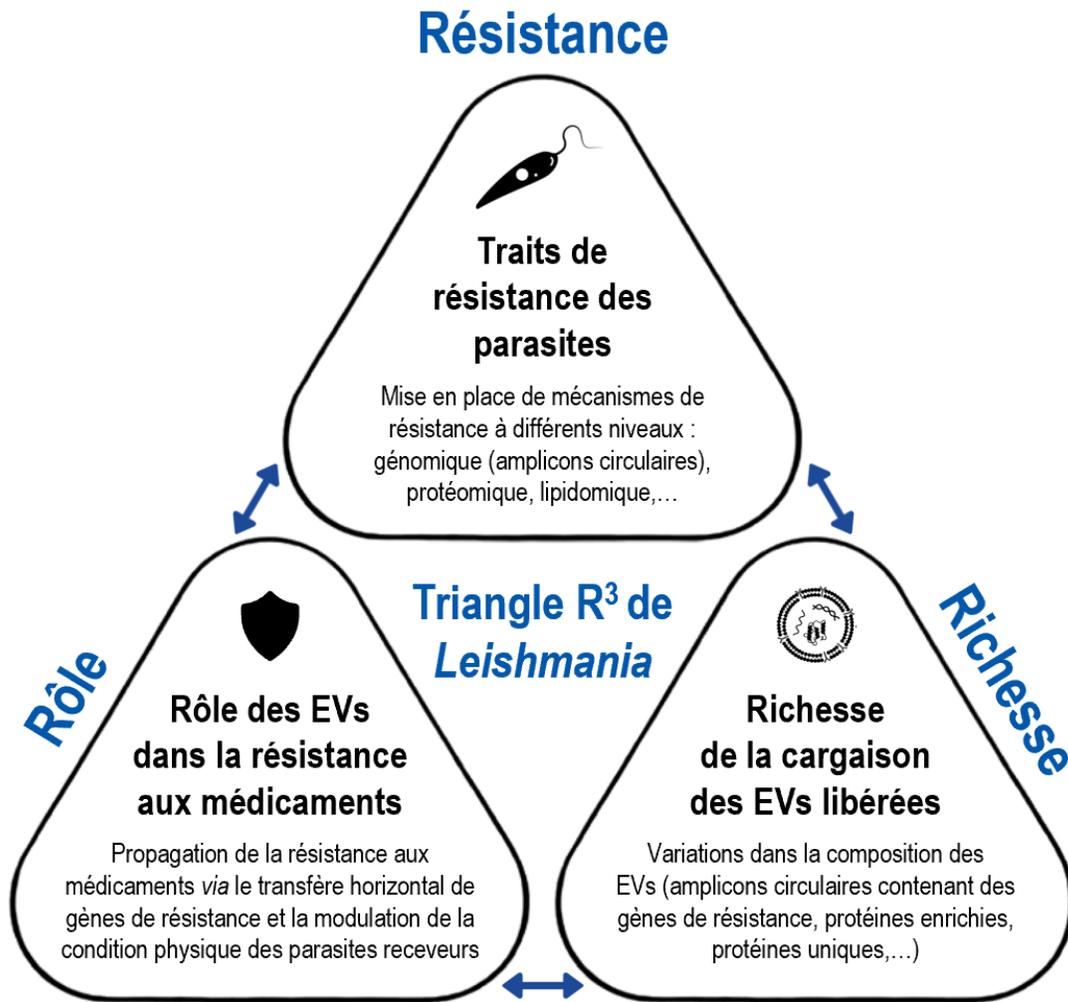
## Partie 4 [Discussion]

précédentes (sur l'intérêt nouveau de la communauté scientifique pour les études sur les phlébotomes, dans le contexte de la résistance aux médicaments), un autre point pertinent peut s'ajouter : la capacité de transmission des parasites nouvellement résistants, par les phlébotomes.

Finalement, un autre aspect important en lien avec les questions évoquées ci-avant est notamment le fait que les adaptations/modifications génétiques conférant la résistance médicamenteuse, développées par le parasite et/ou nouvellement acquises (*via* les EVs) doivent garantir la survie de *Leishmania*, autant chez l'hôte mammifère qu'au sein du phlébotome vecteur (revu par [1124]). Par conséquent, nous avons exploré l'implication potentielle des EVs des parasites résistants dans la modulation du contrôle redox et dans la tolérance au stress, chez les parasites naïfs. En ce sens, nous avons démontré une croissance améliorée, couplée à une tolérance accrue ou à une production réduite de ROS, chez les parasites WT ayant reçu les EVs des souches résistantes puis exposés à des concentrations élevées de divers médicaments. Par ailleurs, au vu des connaissances actuelles et de nos découvertes sur la composition en protéines des EVs des souches résistantes aux médicaments, nous avons également souhaité vérifier la transmission potentielle de résistance croisée, par les vésicules. Dans cette mesure, nous avons confirmé un phénotype de résistance croisée entre AmB et MF, tel que rapporté précédemment [265]. Nous avons également démontré pour la première fois une résistance croisée au Sb, chez les parasites naïfs exposés aux AmB1000.1-EVs. L'explication de cette dernière pourrait notamment provenir de la présence de la protéine MRPA dans les AmB1000.1-EVs, comme l'ont montré nos résultats de l'[article 1](#). Afin de mieux comprendre les effets des EVs sur les parasites, nous avons finalement jugé pertinent de nous intéresser à la reprogrammation potentielle du protéome de *Leishmania* pendant sa phase stationnaire (cinquième jour de croissance) à la suite d'une exposition initiale à dose unique aux EVs des souches résistantes aux médicaments. Sans surprise, nous avons constaté des changements dans les schémas d'expression des protéines des parasites receveurs, et dont les variations étaient en liens avec les traits de résistance des parasites donneurs. Ces résultats (discutés dans l'[article 2](#)) complètent nos découvertes et valident notre [troisième hypothèse](#), selon laquelle *les EVs des parasites Leishmania résistants aux médicaments pourraient potentiellement être impliquées dans la modulation du contrôle redox et dans la tolérance au stress des parasites naïfs*.

Finalement, mis ensembles nos travaux nous permettent de terminer la représentation de notre modèle relationnel (nommé « Triangle **R**<sup>3</sup> de *Leishmania* »), qui met en lien les traits de **Résistance** des parasites, la **Richesse** de la cargaison des EVs libérées et le **Rôle** de ces dernières dans le phénomène de la résistance aux médicaments (Figure 21).





**Figure 21.** Triangle R<sup>3</sup> (Résistance-Richesse-Rôle) de *Leishmania*.

Modèle relationnel (nommé « Triangle R<sup>3</sup> de *Leishmania* ») proposé pour illustrer les liens observés entre les traits de **Résistance** des parasites *Leishmania*, la **Richesse** de la cargaison des EVs libérées et le **Rôle** de ces dernières dans le phénomène de la résistance aux médicaments. Abréviation : EVs (vésicules extracellulaires) ; © Noélie Douanne, 2023



## Partie 5 - [Conclusion]

Cette étude nous a permis d'effectuer la première caractérisation comparative des EVs de *Leishmania* dans le contexte de la résistance aux médicaments et de montrer que la résistance peut induire des changements dans la morphologie, la taille, la distribution et le contenu en protéines des EVs. De plus, en accord avec des rapports précédents, nous avons montré que les cargaisons des EVs sont le reflet des cellules donneuses, puisque nos résultats ont démontré que les EVs libérées par les parasites résistants aux médicaments contiennent des protéines uniques et différemment enrichies selon les mécanismes de résistance impliqués dans la survie de leur lignée cellulaire parentale. Par ailleurs, nous avons démontré pour la première fois la présence de gènes de résistance dans les EVs, ainsi que l'existence d'un nouveau mécanisme de transfert de gène de résistance, entre les protozoaires, par le biais de ces EVs. Nous avons également montré que les EVs des parasites *Leishmania* résistants aux médicaments ont la capacité de moduler la condition physique des promastigotes en améliorant leur tolérance au stress environnemental (diminution de l'accumulation des ROS) et en modifiant le protéome basal des parasites receveurs ; permettant ainsi leur survie et leur propagation. Mises ensembles, ces découvertes ont une importance majeure dans la compréhension de la résistance médicamenteuse puisqu'elles nous ont permis de proposer un modèle relationnel (nommé « Triangle R<sup>3</sup> de *Leishmania* »), qui met en lien les traits de Résistance des parasites, la Richesse de la cargaison des EVs libérées et le Rôle de ces dernières dans le phénomène de la résistance aux médicaments. De plus, nos découvertes pourront servir de support pour le développement de nouveaux tests diagnostiques et de nouvelles approches thérapeutiques, basés sur les profils des EVs. Ainsi, nous contribuons à l'enrichissement de la littérature en apportant un complément de connaissances d'importance majeur dans la compréhension des EVs et de leur rôle dans le phénomène de la résistance aux médicaments.

Finalement, nos travaux ouvrent également la voie à un nouvel axe de recherche sur lequel nous travaillons, et qui est basé sur l'utilisation des EVs, mais cette fois-ci dans un contexte de « manipulation parasitaire » visant à lutter contre la propagation de la résistance aux médicaments, et plus précisément à favoriser la destruction du parasite. Pour mieux comprendre, nous venons de démontrer que *Leishmania* exploite ses EVs pour garantir la propagation de gènes de résistance, *via* des événements de HGTs. Ainsi, à la vue de cette découverte, nous pensons que nous pouvons exploiter ce mécanisme afin de déjouer la stratégie du protozoaire et de resensibiliser les parasites résistants. En guise de cheval de Troie, les EVs modifiées et chargées en « éléments tueurs » (tels que des gènes codant pour une protéine favorisant l'entrée du médicament), permettrait ainsi le transfert « caché » d'éléments propices à la destruction de *Leishmania*.



## Références bibliographiques

1. Akhoundi, M., et al., *A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies*. PLoS Negl Trop Dis, 2016. **10**(3): p. e0004349.
2. Poinar, G., Jr. and R. Poinar, *Paleoleishmania proterus n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber*. Protist, 2004. **155**(3): p. 305-10.
3. Steverding, D., *The history of leishmaniasis*. Parasit Vectors, 2017. **10**(1): p. 82.
4. Zink, A.R., et al., *Leishmaniasis in ancient Egypt and Upper nubia*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(10): p. 1616-7.
5. Leishman, W.B., *On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. 1903*. Indian J Med Res, 2006. **123**(3): p. 1252-4; discussion 79.
6. Donovan, C., *On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. 1903*. Natl Med J India, 1994. **7**(4): p. 196, 201-2.
7. Ross, R., *Note on the Bodies Recently Described by Leishman and Donovan*. Br Med J, 1903. **2**(2237): p. 1261-2.
8. Sergent Ed, S.É., Parrot L, Donatien A, Béquet M., *Transmission du clou de Biskra par le phlébotome (Phlebotomus papatasi Scop.)*. C R Hebd Séances Acad Sci. , 1921.
9. World Health, O., *Control of the leishmaniasis*. World Health Organ Tech Rep Ser, 2010(949): p. xii-xiii, 1-186, back cover.
10. Killick-Kendrick, R., *Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review*. Med Vet Entomol, 1990. **4**(1): p. 1-24.
11. Cecilio, P., A. Cordeiro-da-Silva, and F. Oliveira, *Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with Leishmania parasites*. Commun Biol, 2022. **5**(1): p. 305.
12. Coutinho, M.T., et al., *Participation of Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis*. Vet Parasitol, 2005. **128**(1-2): p. 149-55.
13. Cruz, I., et al., *Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users*. Lancet, 2002. **359**(9312): p. 1124-5.
14. Rosypal, A.C., et al., *Transplacental transmission of a North American isolate of Leishmania infantum in an experimentally infected beagle*. J Parasitol, 2005. **91**(4): p. 970-2.
15. Pagliano, P., et al., *Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literature*. J Antimicrob Chemother, 2005. **55**(2): p. 229-33.
16. Ready, P.D., *Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents*. Annu Rev Entomol, 2013. **58**: p. 227-50.
17. Berdjane-Brouk, Z., et al., *First detection of Leishmania major DNA in Sergentomyia (Spelaemyia) darlingi from cutaneous leishmaniasis foci in Mali*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e28266.
18. Nzelu, C.O., et al., *First detection of Leishmania tropica DNA and Trypanosoma species in Sergentomyia sand flies (Diptera: Psychodidae) from an outbreak area of cutaneous leishmaniasis in Ghana*. PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(2): p. e2630.
19. Kamhawi, S., et al., *A role for insect galectins in parasite survival*. Cell, 2004. **119**(3): p. 329-41.
20. Roque, A.L. and A.M. Jansen, *Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas*. Int J Parasitol Parasites Wildl, 2014. **3**(3): p. 251-62.



## Références bibliographiques

21. Baneth, G., et al., *Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one*. Trends Parasitol, 2008. **24**(7): p. 324-30.
22. Burza, S., S.L. Croft, and M. Boelaert, *Leishmaniasis*. Lancet, 2018. **392**(10151): p. 951-970.
23. Cantacessi, C., et al., *The past, present, and future of Leishmania genomics and transcriptomics*. Trends Parasitol, 2015. **31**(3): p. 100-8.
24. Al-Salem, W., J.R. Herricks, and P.J. Hotez, *A review of visceral leishmaniasis during the conflict in South Sudan and the consequences for East African countries*. Parasit Vectors, 2016. **9**(1): p. 460.
25. Soni, M. and J.V. Pratap, *Development of Novel Anti-Leishmanials: The Case for Structure-Based Approaches*. Pathogens, 2022. **11**(8).
26. Alvar, J., et al., *Canine leishmaniosis*. Adv Parasitol, 2004. **57**: p. 1-88.
27. Wagner, V., N. Douanne, and C. Fernandez-Prada, *Leishmania infantum infection in a dog imported from Morocco*. Can Vet J, 2020. **61**(9): p. 963-965.
28. Desjeux, P., *The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2001. **95**(3): p. 239-43.
29. Jacobson, R.L., *Leishmaniasis in an era of conflict in the Middle East*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2011. **11**(3): p. 247-58.
30. Bispo, A.J.B., et al., *Pulmonary involvement in human visceral leishmaniasis: Clinical and tomographic evaluation*. PLoS One, 2020. **15**(1): p. e0228176.
31. van Griensven, J. and E. Diro, *Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens*. Infect Dis Clin North Am, 2019. **33**(1): p. 79-99.
32. Shaw, J.J., *Taxonomy of the genus Leishmania: present and future trends and their implications*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1994. **89**(3): p. 471-8.
33. van Griensven, J. and E. Diro, *Visceral leishmaniasis*. Infect Dis Clin North Am, 2012. **26**(2): p. 309-22.
34. Diro, E., et al., *Atypical manifestations of visceral leishmaniasis in patients with HIV in north Ethiopia: a gap in guidelines for the management of opportunistic infections in resource poor settings*. Lancet Infect Dis, 2015. **15**(1): p. 122-9.
35. Bilgic-Temel, A., D.F. Murrell, and S. Uzun, *Cutaneous leishmaniasis: A neglected disfiguring disease for women*. Int J Womens Dermatol, 2019. **5**(3): p. 158-165.
36. Gurel, M.S., B. Tekin, and S. Uzun, *Cutaneous leishmaniasis: A great imitator*. Clin Dermatol, 2020. **38**(2): p. 140-151.
37. Zijlstra, E.E., et al., *Post-kala-azar dermal leishmaniasis*. Lancet Infect Dis, 2003. **3**(2): p. 87-98.
38. Abongomera, C., et al., *A Comparison of the Effectiveness of Sodium Stibogluconate Monotherapy to Sodium Stibogluconate and Paromomycin Combination for the Treatment of Severe Post Kala Azar Dermal Leishmaniasis in South Sudan - A Retrospective Cohort Study*. PLoS One, 2016. **11**(9): p. e0163047.
39. den Boer, M., et al., *Safety and Effectiveness of Short-Course AmBisome in the Treatment of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis: A Prospective Cohort Study in Bangladesh*. Clin Infect Dis, 2018. **67**(5): p. 667-675.
40. Solano-Gallego, L., et al., *Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis*. Vet Parasitol, 2009. **165**(1-2): p. 1-18.

## Références bibliographiques

41. Baneth, G., et al., *Canine leishmaniosis caused by Leishmania major and Leishmania tropica: comparative findings and serology*. Parasit Vectors, 2017. **10**(1): p. 113.
42. Vaselek, S., *Canine leishmaniosis in Balkan - A review of occurrence and epidemiology*. Acta Trop, 2021. **224**: p. 106110.
43. Sales, K.G., et al., *Identification of phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR*. Parasit Vectors, 2015. **8**: p. 230.
44. Asfaram, S., M. Fakhar, and S.H. Teshnizi, *Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniosis? A systematic review with meta-analysis*. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis, 2019. **25**: p. e20190012.
45. Pennisi, M.G. and M.F. Persichetti, *Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog?* Vet Parasitol, 2018. **251**: p. 131-137.
46. Baneth, G. and L. Solano-Gallego, *Leishmaniasis*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2022. **52**(6): p. 1359-1375.
47. Abramo, F., et al., *Skin Lesions in Feline Leishmaniosis: A Systematic Review*. Pathogens, 2021. **10**(4).
48. van der Lugt, J.J., J.F. Carlyon, and D.T. de Waal, *Cutaneous leishmaniasis in a sheep*. J S Afr Vet Assoc, 1992. **63**(2): p. 74-7.
49. Han, S., et al., *Epidemiological survey of sheep as potential hosts for Leishmania in China*. BMC Vet Res, 2018. **14**(1): p. 378.
50. Lobsiger, L., et al., *An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland*. Vet Parasitol, 2010. **169**(3-4): p. 408-14.
51. Gazzonis, A.L., et al., *Detection of Leishmania spp. in Chronic Dermatitis: Retrospective Study in Exposed Horse Populations*. Pathogens, 2022. **11**(6).
52. Ortega-Garcia, M.V., et al., *Equine infection with Leishmania spp. in Costa Rica: Study of five cases*. Vet Med Sci, 2021. **7**(6): p. 2234-2239.
53. Uzun, S., et al., *Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of cutaneous leishmaniasis in Turkey*. Int J Dermatol, 2018. **57**(8): p. 973-982.
54. Durdu, M., M. Baba, and D. Seckin, *More experiences with the Tzanck smear test: cytologic findings in cutaneous granulomatous disorders*. J Am Acad Dermatol, 2009. **61**(3): p. 441-50.
55. Romero, G.A., et al., *Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by Leishmania (Viannia) braziliensis or Leishmania (Viannia) guyanensis in Brazil*. Acta Trop, 2005. **93**(1): p. 49-56.
56. Srivastava, P., et al., *Unusual case of resistance to amphotericin B in visceral leishmaniasis in a region in India where leishmaniasis is not endemic*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(8): p. 3088-91.
57. Saberi, R., et al., *Identification of Leishmania species using N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase gene in a zoonotic cutaneous leishmaniasis focus of Iran*. J Vector Borne Dis, 2018. **55**(1): p. 14-19.
58. Akhoundi, M., et al., *Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis*. Mol Aspects Med, 2017. **57**: p. 1-29.
59. Hajjaran, H., et al., *The Geographical Distribution of Human Cutaneous and Visceral Leishmania Species Identified by Molecular Methods in Iran: A Systematic Review With Meta-Analysis*. Front Public Health, 2021. **9**: p. 661674.

## Références bibliographiques

60. Aronson, N., 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): p. 24-45.
61. Hennig, D.W., "Herausgegeben vom Deutschen entomologischen institut, Berlin-Friedrichshagen" (*Foundations of a theory of phylogenetic systematics*). 1950.
62. Sogin, M.L., *Early evolution and the origin of eukaryotes*. Curr Opin Genet Dev, 1991. **1**(4): p. 457-63.
63. (WHO), W.H.O., *Leishmania: Taxonomy and phylogeny: applications to ecology and epidemiology: International colloquium CNRS/INSERM/WHO 2-6 July 1984*. 1984. p. 537.
64. Iatta, R., et al., *Leishmania tarentolae and Leishmania infantum in humans, dogs and cats in the Pelagie archipelago, southern Italy*. PLoS Negl Trop Dis, 2021. **15**(9): p. e0009817.
65. Pombi, M., et al., *Molecular detection of Leishmania (Sauroleishmania) tarentolae in human blood and Leishmania (Leishmania) infantum in Sergentomyia minuta: unexpected host-parasite contacts*. Med Vet Entomol, 2020. **34**(4): p. 470-475.
66. Dostalova, A. and P. Volf, *Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview*. Parasit Vectors, 2012. **5**: p. 276.
67. R.Telford, S., *The Kinetoplastid Hemoflagellates of Reptiles*, in *Parasitic Protozoa (Second Edition)*. 1995. p. Pages 161-223.
68. Molyneux, D.H., *The leishmaniasis in Biology and Medicine*, ed. E. R. Peters. Vol. Volume 96. 1988.
69. Kamhawi, S., *Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?* Trends Parasitol, 2006. **22**(9): p. 439-45.
70. Schlein, Y., *Leishmania and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission*. Parasitol Today, 1993. **9**(7): p. 255-8.
71. Pimenta, P.F., et al., *A novel role for the peritrophic matrix in protecting Leishmania from the hydrolytic activities of the sand fly midgut*. Parasitology, 1997. **115 ( Pt 4)**: p. 359-69.
72. Rogers, M.E., M.L. Chance, and P.A. Bates, *The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of Leishmania mexicana by the sandfly Lutzomyia longipalpis*. Parasitology, 2002. **124**(Pt 5): p. 495-507.
73. Walters, L.L., et al., *Life cycle of Leishmania major (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae)*. J Med Entomol, 1993. **30**(4): p. 699-718.
74. Bates, P.A., *The developmental biology of Leishmania promastigotes*. Exp Parasitol, 1994. **79**(2): p. 215-8.
75. Bates, P.A. and L. Tetley, *Leishmania mexicana: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH*. Exp Parasitol, 1993. **76**(4): p. 412-23.
76. Zakai, H.A., M.L. Chance, and P.A. Bates, *In vitro stimulation of metacyclogenesis in Leishmania braziliensis, L. donovani, L. major and L. mexicana*. Parasitology, 1998. **116 ( Pt 4)**: p. 305-9.
77. Zilberstein, D. and M. Shapira, *The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites*. Annu Rev Microbiol, 1994. **48**: p. 449-70.
78. Schlein, Y. and H. Romano, *Leishmania major and L. donovani: effects on proteolytic enzymes of Phlebotomus papatasi (Diptera, Psychodidae)*. Exp Parasitol, 1986. **62**(3): p. 376-80.

## Références bibliographiques

79. Dillon, R.J. and R.P. Lane, *Influence of Leishmania infection on blood-meal digestion in the sandflies Phlebotomus papatasi and P. langeroni*. Parasitol Res, 1993. **79**(6): p. 492-6.
80. Telleria, E.L., et al., *Trypsin-like serine proteases in Lutzomyia longipalpis--expression, activity and possible modulation by Leishmania infantum chagasi*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10697.
81. Dostalova, A., et al., *The midgut transcriptome of Phlebotomus (Larroussius) perniciosus, a vector of Leishmania infantum: comparison of sugar fed and blood fed sand flies*. BMC Genomics, 2011. **12**: p. 223.
82. Secundino, N., et al., *Proteophosphoglycan confers resistance of Leishmania major to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies*. Cell Microbiol, 2010. **12**(7): p. 906-18.
83. Gossage, S.M., M.E. Rogers, and P.A. Bates, *Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle*. Int J Parasitol, 2003. **33**(10): p. 1027-34.
84. Schlein, Y., R.L. Jacobson, and J. Shlomai, *Chitinase secreted by Leishmania functions in the sandfly vector*. Proc Biol Sci, 1991. **245**(1313): p. 121-6.
85. Ramalho-Ortigao, J.M., et al., *Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors Lutzomyia longipalpis and Phlebotomus papatasi*. Insect Mol Biol, 2005. **14**(6): p. 703-12.
86. Sadlova, J. and P. Volf, *Peritrophic matrix of Phlebotomus duboscqi and its kinetics during Leishmania major development*. Cell Tissue Res, 2009. **337**(2): p. 313-25.
87. Bates, P.A., *Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies*. Int J Parasitol, 2007. **37**(10): p. 1097-106.
88. Killick-Kendrick, R., D.H. Molyneux, and R.W. Ashford, *Leishmania in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1974. **187**(1089): p. 409-19.
89. Myskova, J., et al., *A lipophosphoglycan-independent development of Leishmania in permissive sand flies*. Microbes Infect, 2007. **9**(3): p. 317-24.
90. Dobson, D.E., et al., *Leishmania major survival in selective Phlebotomus papatasi sand fly vector requires a specific SCG-encoded lipophosphoglycan galactosylation pattern*. PLoS Pathog, 2010. **6**(11): p. e1001185.
91. Kamhawi, S., et al., *The vectorial competence of Phlebotomus sergenti is specific for Leishmania tropica and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment*. Parasitology, 2000. **121 ( Pt 1)**: p. 25-33.
92. Mahoney, A.B., et al., *Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control Leishmania donovani-sand fly interactions*. Biochemistry, 1999. **38**(31): p. 9813-23.
93. Pimenta, P.F., et al., *Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of Leishmania is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 9155-9.
94. Soares, R.P., et al., *Leishmania tropica: intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different Phlebotomus species*. Exp Parasitol, 2004. **107**(1-2): p. 105-14.

## Références bibliographiques

95. Sunter, J.D., et al., *Leishmania flagellum attachment zone is critical for flagellar pocket shape, development in the sand fly, and pathogenicity in the host*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(13): p. 6351-6360.
96. Sacks, D.L., *Metacyclogenesis in Leishmania promastigotes*. Exp Parasitol, 1989. **69**(1): p. 100-3.
97. Sacks, D.L. and P.V. Perkins, *Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes*. Science, 1984. **223**(4643): p. 1417-9.
98. Saraiva, E.M., et al., *Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of Leishmania major in Phlebotomus papatasi*. Parasitology, 1995. **111** (Pt 3): p. 275-87.
99. Turco, S.J. and A. Descoteaux, *The lipophosphoglycan of Leishmania parasites*. Annu Rev Microbiol, 1992. **46**: p. 65-94.
100. Stierhof, Y.D., et al., *Filamentous proteophosphoglycan secreted by Leishmania promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors*. Eur J Cell Biol, 1999. **78**(10): p. 675-89.
101. Belkaid, Y., et al., *Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of Leishmania major infection in the mouse ear dermis*. J Exp Med, 1998. **188**(10): p. 1941-53.
102. Titus, R.G. and J.M. Ribeiro, *Salivary gland lysates from the sand fly Lutzomyia longipalpis enhance Leishmania infectivity*. Science, 1988. **239**(4845): p. 1306-8.
103. Rogers, M.E., et al., *Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG*. Nature, 2004. **430**(6998): p. 463-7.
104. Rogers, M.E., *The role of leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the Mammalian host*. Front Microbiol, 2012. **3**: p. 223.
105. Kramer, L.D. and G.D. Ebel, *Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes*. Adv Virus Res, 2003. **60**: p. 187-232.
106. Norris, L.C., et al., *Frequency of multiple blood meals taken in a single gonotrophic cycle by Anopheles arabiensis mosquitoes in Macha, Zambia*. Am J Trop Med Hyg, 2010. **83**(1): p. 33-7.
107. Das, S., et al., *Beyond the entomological inoculation rate: characterizing multiple blood feeding behavior and Plasmodium falciparum multiplicity of infection in Anopheles mosquitoes in northern Zambia*. Parasit Vectors, 2017. **10**(1): p. 45.
108. Alexander, J., A.R. Satoskar, and D.G. Russell, *Leishmania species: models of intracellular parasitism*. J Cell Sci, 1999. **112** Pt 18: p. 2993-3002.
109. Ramamoorthy, R., et al., *Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of Leishmania donovani chagasi promastigotes to an infectious form*. J Biol Chem, 1992. **267**(3): p. 1888-95.
110. Brittingham, A., et al., *Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis*. J Immunol, 1995. **155**(6): p. 3102-11.
111. Serafim, T.D., et al., *Sequential blood meals promote Leishmania replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity*. Nat Microbiol, 2018. **3**(5): p. 548-555.
112. Opperdoes, F.R. and G.H. Coombs, *Metabolism of Leishmania: proven and predicted*. Trends Parasitol, 2007. **23**(4): p. 149-58.

## Références bibliographiques

113. Blum, J.J. and F.R. Opperdoes, *Secretion of sucrase by Leishmania donovani*. J Eukaryot Microbiol, 1994. **41**(3): p. 228-31.
114. Rosenzweig, D., et al., *Retooling Leishmania metabolism: from sand fly gut to human macrophage*. FASEB J, 2008. **22**(2): p. 590-602.
115. Kimblin, N., et al., *Quantification of the infectious dose of Leishmania major transmitted to the skin by single sand flies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(29): p. 10125-30.
116. Handman, E., *Cell biology of Leishmania*. Adv Parasitol, 1999. **44**: p. 1-39.
117. van Zandbergen, G., et al., *Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(37): p. 13837-42.
118. Wanderley, J.L., et al., *Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5733.
119. Ferreira, T., *Relevance of multi-species phenotypic assays in Leishmania early drug discovery*. 2019.
120. Merle, N.S., et al., *Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 262.
121. Elmahallawy, E.K., A.A.M. Alkhaldi, and A.A. Saleh, *Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research*. Biomed Pharmacother, 2021. **139**: p. 111671.
122. Hermoso, T., et al., *Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system*. EMBO J, 1991. **10**(13): p. 4061-7.
123. Puentes, S.M., et al., *Serum resistance of metacyclic stage Leishmania major promastigotes is due to release of C5b-9*. J Immunol, 1990. **145**(12): p. 4311-6.
124. Filho, A.A.P., et al., *Evasion of the complement system by Leishmania through the uptake of factor H, a complement regulatory protein*. Acta Trop, 2021. **224**: p. 106152.
125. Pereira-Filho, A.A., et al., *Evasion of the complement system by Leishmania through the uptake of C4bBP, a complement regulatory protein, and probably by the action of GP63 on C4b molecules deposited on parasite surface*. Acta Trop, 2023. **242**: p. 106908.
126. Podinovskaia, M. and A. Descoteaux, *Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction*. Future Microbiol, 2015. **10**(1): p. 111-29.
127. Costa-da-Silva, A.C., et al., *Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview*. Trop Med Infect Dis, 2022. **7**(4).
128. Cecilio, P., et al., *Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 480.
129. Laufs, H., et al., *Intracellular survival of Leishmania major in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors*. Infect Immun, 2002. **70**(2): p. 826-35.
130. Peters, N.C., et al., *In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies*. Science, 2008. **321**(5891): p. 970-4.
131. Aga, E., et al., *Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite Leishmania major*. J Immunol, 2002. **169**(2): p. 898-905.
132. Muller, K., et al., *Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of Leishmania major infection in mice*. Med Microbiol Immunol, 2001. **190**(1-2): p. 73-6.

## Références bibliographiques

133. Rubin-Bejerano, I., et al., *Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in Saccharomyces cerevisiae and Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 11007-12.
134. Sunderkotter, C., et al., *Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages in vitro and in vivo*. J Immunol, 1993. **151**(9): p. 4891-901.
135. Rogers, M., et al., *Proteophosphoglycans regurgitated by Leishmania-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival*. PLoS Pathog, 2009. **5**(8): p. e1000555.
136. Rogers, M.E., et al., *Leishmania infantum proteophosphoglycans regurgitated by the bite of its natural sand fly vector, Lutzomyia longipalpis, promote parasite establishment in mouse skin and skin-distant tissues*. Microbes Infect, 2010. **12**(11): p. 875-9.
137. Rochael, N.C., et al., *Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by Leishmania parasites*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 18302.
138. Regli, I.B., et al., *Survival Mechanisms Used by Some Leishmania Species to Escape Neutrophil Killing*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1558.
139. Kilpatrick, L.E., et al., *Regulation of TNF mediated antiapoptotic signaling in human neutrophils: role of delta-PKC and ERK1/2*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(6): p. 1512-21.
140. Sarkar, A., et al., *Infection of neutrophil granulocytes with Leishmania major activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis*. Med Microbiol Immunol, 2013. **202**(1): p. 25-35.
141. Chagas, A.C., et al., *Lundep, a sand fly salivary endonuclease increases Leishmania parasite survival in neutrophils and inhibits Xlla contact activation in human plasma*. PLoS Pathog, 2014. **10**(2): p. e1003923.
142. van Zandbergen, G., et al., *Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages*. J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6521-5.
143. Peters, N.C. and D.L. Sacks, *The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis*. Cell Microbiol, 2009. **11**(9): p. 1290-6.
144. Olivier, M., D.J. Gregory, and G. Forget, *Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(2): p. 293-305.
145. Rodriguez, N.E., et al., *Stage-specific pathways of Leishmania infantum chagasi entry and phagosome maturation in macrophages*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19000.
146. Majumder, S., et al., *Leishmania-induced biphasic ceramide generation in macrophages is crucial for uptake and survival of the parasite*. J Infect Dis, 2012. **205**(10): p. 1607-16.
147. Ueno, N. and M.E. Wilson, *Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival*. Trends Parasitol, 2012. **28**(8): p. 335-44.
148. Polando, R., et al., *The roles of complement receptor 3 and Fc gamma receptors during Leishmania phagosome maturation*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(6): p. 921-32.
149. Kumar, G.A., et al., *Leishmania donovani Internalizes into Host Cells via Caveolin-mediated Endocytosis*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 12636.
150. Desjardins, M. and A. Descoteaux, *Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan*. J Exp Med, 1997. **185**(12): p. 2061-8.

## Références bibliographiques

151. Holm, A., et al., *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC $\alpha$  and defective phagosome maturation. *Cell Microbiol*, 2001. **3**(7): p. 439-47.
152. Rocco-Machado, N., et al., *Leishmania amazonensis* ferric iron reductase (LFR1) is a bifunctional enzyme: Unveiling a NADPH oxidase activity. *Free Radic Biol Med*, 2019. **143**: p. 341-353.
153. Mitra, B., et al., *Iron uptake controls the generation of Leishmania infective forms through regulation of ROS levels*. *J Exp Med*, 2013. **210**(2): p. 401-16.
154. Forestier, C.L., et al., *Imaging host cell-Leishmania interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process*. *Cell Host Microbe*, 2011. **9**(4): p. 319-30.
155. Ndjamen, B., et al., *Leishmania parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments*. *Cell Microbiol*, 2010. **12**(10): p. 1480-94.
156. Srivastav, S., et al., *Leishmania donovani* prevents oxidative burst-mediated apoptosis of host macrophages through selective induction of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins. *J Biol Chem*, 2014. **289**(2): p. 1092-105.
157. Basu Ball, W., et al., *Uncoupling protein 2 negatively regulates mitochondrial reactive oxygen species generation and induces phosphatase-mediated anti-inflammatory response in experimental visceral leishmaniasis*. *J Immunol*, 2011. **187**(3): p. 1322-32.
158. Van Assche, T., et al., *Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology*. *Free Radic Biol Med*, 2011. **51**(2): p. 337-51.
159. Chaparro, V., et al., *Transcriptional profiling of macrophages reveals distinct parasite stage-driven signatures during early infection by Leishmania donovani*. *Sci Rep*, 2022. **12**(1): p. 6369.
160. Saha, S., et al., *Leishmania donovani* Targets Host Transcription Factor NRF2 To Activate Antioxidant Enzyme HO-1 and Transcriptional Repressor ATF3 for Establishing Infection. *Infect Immun*, 2021. **89**(7): p. e0076420.
161. Reverte, M., et al., *The antioxidant response favors Leishmania parasites survival, limits inflammation and reprograms the host cell metabolism*. *PLoS Pathog*, 2021. **17**(3): p. e1009422.
162. Vomund, S., et al., *Nrf2, the Master Regulator of Anti-Oxidative Responses*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(12).
163. Campbell, K.A., et al., *CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to Leishmania major*. *Immunity*, 1996. **4**(3): p. 283-9.
164. Soong, L., et al., *Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to Leishmania amazonensis infection*. *Immunity*, 1996. **4**(3): p. 263-73.
165. Slupphaug, G., B. Kavli, and H.E. Krokan, *The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage*. *Mutat Res*, 2003. **531**(1-2): p. 231-51.
166. Singh, A.K., et al., *Proteomic-based approach to gain insight into reprogramming of THP-1 cells exposed to Leishmania donovani over an early temporal window*. *Infect Immun*, 2015. **83**(5): p. 1853-68.
167. Buates, S. and G. Matlashewski, *General suppression of macrophage gene expression during Leishmania donovani infection*. *J Immunol*, 2001. **166**(5): p. 3416-22.

## Références bibliographiques

168. Bayer-Santos, E., M.M. Marini, and J.F. da Silveira, *Non-coding RNAs in Host-Pathogen Interactions: Subversion of Mammalian Cell Functions by Protozoan Parasites*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 474.
169. Zhang, Y., et al., *Overview of Histone Modification*. Adv Exp Med Biol, 2021. **1283**: p. 1-16.
170. Marr, A.K., et al., *Leishmania donovani infection causes distinct epigenetic DNA methylation changes in host macrophages*. PLoS Pathog, 2014. **10**(10): p. e1004419.
171. Calegari-Silva, T.C., et al., *Leishmania amazonensis downregulates macrophage iNOS expression via Histone Deacetylase 1 (HDAC1): a novel parasite evasion mechanism*. Eur J Immunol, 2018. **48**(7): p. 1188-1198.
172. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *Regulation of chromatin by histone modifications*. Cell Res, 2011. **21**(3): p. 381-95.
173. Parmar, N., P. Chandrakar, and S. Kar, *Leishmania donovani Subverts Host Immune Response by Epigenetic Reprogramming of Macrophage M(Lipopolysaccharides + IFN-gamma)/M(IL-10) Polarization*. J Immunol, 2020. **204**(10): p. 2762-2778.
174. Muxel, S.M., et al., *Leishmania (Leishmania) amazonensis induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 44141.
175. Nunes, S., et al., *Integrated Analysis Reveals That miR-193b, miR-671, and TREM-1 Correlate With a Good Response to Treatment of Human Localized Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania braziliensis*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 640.
176. Singh, A.K., et al., *MicroRNA expression profiling of Leishmania donovani-infected host cells uncovers the regulatory role of MIR30A-3p in host autophagy*. Autophagy, 2016. **12**(10): p. 1817-1831.
177. Tiwari, N., et al., *Identification and Characterization of miRNAs in Response to Leishmania donovani Infection: Delineation of Their Roles in Macrophage Dysfunction*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 314.
178. Afrin, F., I. Khan, and H.A. Hemeg, *Leishmania-Host Interactions-An Epigenetic Paradigm*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 492.
179. Farrow, A.L., et al., *Leishmania-induced repression of selected non-coding RNA genes containing B-box element at their promoters in alternatively polarized M2 macrophages*. Mol Cell Biochem, 2011. **350**(1-2): p. 47-57.
180. Dillon, L.A., et al., *Simultaneous transcriptional profiling of Leishmania major and its murine macrophage host cell reveals insights into host-pathogen interactions*. BMC Genomics, 2015. **16**: p. 1108.
181. Jawed, J.J., S. Dutta, and S. Majumdar, *Functional aspects of T cell diversity in visceral leishmaniasis*. Biomed Pharmacother, 2019. **117**: p. 109098.
182. Antoine, J.C., et al., *H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of Leishmania-infected macrophages and internalized by amastigotes of L. amazonensis and L. mexicana*. J Cell Sci, 1999. **112 ( Pt 15)**: p. 2559-70.
183. Martinez-Lopez, M., et al., *Leishmania Hijacks Myeloid Cells for Immune Escape*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 883.
184. Christophe Filippi, L.M., Valérie Julia et Nicolas Glaichenhaus, *Immunity against Leishmania*. médecine/sciences, 2001. **Volume 17**(Med Sci (Paris)): p. 1120 - 1128.

## Références bibliographiques

185. Vannier-Santos, M.A., A. Martiny, and W. de Souza, *Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading*. *Curr Pharm Des*, 2002. **8**(4): p. 297-318.
186. Luckheeram, R.V., et al., *CD4(+)T cells: differentiation and functions*. *Clin Dev Immunol*, 2012. **2012**: p. 925135.
187. Rodrigues, I.A., et al., *Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response*. *Mediators Inflamm*, 2015. **2015**: p. 835910.
188. Wherry, E.J., et al., *Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(3): p. 225-34.
189. Kaushal, H., et al., *Role of CD8(+) T cells in protection against Leishmania donovani infection in healed Visceral Leishmaniasis individuals*. *BMC Infect Dis*, 2014. **14**: p. 653.
190. Rub, A., et al., *Cholesterol depletion associated with Leishmania major infection alters macrophage CD40 signalosome composition and effector function*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(3): p. 273-80.
191. Cameron, P., et al., *Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by Leishmania mexicana amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway*. *J Immunol*, 2004. **173**(5): p. 3297-304.
192. de Freitas, E.S.R. and E. von Stebut, *Unraveling the Role of Immune Checkpoints in Leishmaniasis*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 620144.
193. Young, J. and P.E. Kima, *The Leishmania Parasitophorous Vacuole Membrane at the Parasite-Host Interface*. *Yale J Biol Med*, 2019. **92**(3): p. 511-521.
194. Canton, J. and P.E. Kima, *Interactions of pathogen-containing compartments with the secretory pathway*. *Cell Microbiol*, 2012. **14**(11): p. 1676-86.
195. Kima, P.E. and W. Dunn, *Exploiting calnexin expression on phagosomes to isolate Leishmania parasitophorous vacuoles*. *Microb Pathog*, 2005. **38**(4): p. 139-45.
196. Garin, J., et al., *The phagosome proteome: insight into phagosome functions*. *J Cell Biol*, 2001. **152**(1): p. 165-80.
197. Saunders, E.C., et al., *Leishmania mexicana can utilize amino acids as major carbon sources in macrophages but not in animal models*. *Mol Microbiol*, 2018. **108**(2): p. 143-158.
198. Naderer, T., et al., *Intracellular Survival of Leishmania major Depends on Uptake and Degradation of Extracellular Matrix Glycosaminoglycans by Macrophages*. *PLoS Pathog*, 2015. **11**(9): p. e1005136.
199. Schaible, U.E., et al., *Parasitophorous vacuoles of Leishmania mexicana acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes*. *J Cell Sci*, 1999. **112 ( Pt 5)**: p. 681-93.
200. Cyrino, L.T., et al., *In vivo and in vitro Leishmania amazonensis infection induces autophagy in macrophages*. *Tissue Cell*, 2012. **44**(6): p. 401-8.
201. Melo, R.C. and A.M. Dvorak, *Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy?* *PLoS Pathog*, 2012. **8**(7): p. e1002729.
202. Fairlamb, A.H. and A. Cerami, *Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida*. *Annu Rev Microbiol*, 1992. **46**: p. 695-729.
203. Colotti, G. and A. Ilari, *Polyamine metabolism in Leishmania: from arginine to trypanothione*. *Amino Acids*, 2011. **40**(2): p. 269-85.

## Références bibliographiques

204. Goldman-Pinkovich, A., et al., *An Arginine Deprivation Response Pathway Is Induced in Leishmania during Macrophage Invasion*. PLoS Pathog, 2016. **12**(4): p. e1005494.
205. da Silva, M.F. and L.M. Floeter-Winter, *Arginase in Leishmania*. Subcell Biochem, 2014. **74**: p. 103-17.
206. Wanasen, N. and L. Soong, *L-arginine metabolism and its impact on host immunity against Leishmania infection*. Immunol Res, 2008. **41**(1): p. 15-25.
207. Hamza, I. and H.A. Dailey, *One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(9): p. 1617-32.
208. Ponka, P., *Cell biology of heme*. Am J Med Sci, 1999. **318**(4): p. 241-56.
209. Cassat, J.E. and E.P. Skaar, *Iron in infection and immunity*. Cell Host Microbe, 2013. **13**(5): p. 509-519.
210. Weinberg, E.D., *Iron, infection, and neoplasia*. Clin Physiol Biochem, 1986. **4**(1): p. 50-60.
211. Oppenheimer, S.J., *Iron and its relation to immunity and infectious disease*. J Nutr, 2001. **131**(2S-2): p. 616S-633S; discussion 633S-635S.
212. Laranjeira-Silva, M.F., I. Hamza, and J.M. Perez-Victoria, *Iron and Heme Metabolism at the Leishmania-Host Interface*. Trends Parasitol, 2020. **36**(3): p. 279-289.
213. Flannery, A.R., R.L. Renberg, and N.W. Andrews, *Pathways of iron acquisition and utilization in Leishmania*. Curr Opin Microbiol, 2013. **16**(6): p. 716-21.
214. Koreny, L., M. Obornik, and J. Lukes, *Make it, take it, or leave it: heme metabolism of parasites*. PLoS Pathog, 2013. **9**(1): p. e1003088.
215. Chang, C.S. and K.P. Chang, *Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of Leishmania mexicana amazonensis*. Mol Biochem Parasitol, 1985. **16**(3): p. 267-76.
216. Campos-Salinas, J., et al., *A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in Leishmania*. Mol Microbiol, 2011. **79**(6): p. 1430-44.
217. Soares, M.P. and I. Hamza, *Macrophages and Iron Metabolism*. Immunity, 2016. **44**(3): p. 492-504.
218. Miguel, D.C., et al., *Heme uptake mediated by LHR1 is essential for Leishmania amazonensis virulence*. Infect Immun, 2013. **81**(10): p. 3620-6.
219. Silva, R., et al., *Heme oxygenase-1 in protozoan infections: A tale of resistance and disease tolerance*. PLoS Pathog, 2020. **16**(7): p. e1008599.
220. Dixon, S.J. and B.R. Stockwell, *The role of iron and reactive oxygen species in cell death*. Nat Chem Biol, 2014. **10**(1): p. 9-17.
221. Ivens, A.C., et al., *The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major*. Science, 2005. **309**(5733): p. 436-42.
222. Peacock, C.S., et al., *Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease*. Nat Genet, 2007. **39**(7): p. 839-47.
223. Rogers, M.B., et al., *Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of Leishmania*. Genome Res, 2011. **21**(12): p. 2129-42.
224. Downing, T., et al., *Whole genome sequencing of multiple Leishmania donovani clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance*. Genome Res, 2011. **21**(12): p. 2143-56.

## Références bibliographiques

225. Real, F., et al., *The genome sequence of Leishmania (Leishmania) amazonensis: functional annotation and extended analysis of gene models*. DNA Res, 2013. **20**(6): p. 567-81.
226. Camacho, E., et al., *Leishmania Mitochondrial Genomes: Maxicircle Structure and Heterogeneity of Minicircles*. Genes (Basel), 2019. **10**(10).
227. Imamura, H. and J.C. Dujardin, *A Guide to Next Generation Sequence Analysis of Leishmania Genomes*. Methods Mol Biol, 2019. **1971**: p. 69-94.
228. Simpson, L., *The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution*. Annu Rev Microbiol, 1987. **41**: p. 363-82.
229. Jensen, R.E. and P.T. Englund, *Network news: the replication of kinetoplast DNA*. Annu Rev Microbiol, 2012. **66**: p. 473-91.
230. Simpson, L., et al., *Comparison of the Mitochondrial Genomes and Steady State Transcriptomes of Two Strains of the Trypanosomatid Parasite, Leishmania tarentolae*. PLoS Negl Trop Dis, 2015. **9**(7): p. e0003841.
231. Simpson, L. and J. Shaw, *RNA editing and the mitochondrial cryptogenes of kinetoplastid protozoa*. Cell, 1989. **57**(3): p. 355-66.
232. Wincker, P., et al., *The Leishmania genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(9): p. 1688-94.
233. Britto, C., et al., *Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World Leishmania genomes*. Gene, 1998. **222**(1): p. 107-17.
234. Bernardis, A., N. van Harten-Loosbroek, and P. Borst, *Modification of telomeric DNA in Trypanosoma brucei; a role in antigenic variation?* Nucleic Acids Res, 1984. **12**(10): p. 4153-70.
235. Pays, E., et al., *Possible DNA modification in GC dinucleotides of Trypanosoma brucei telomeric sequences; relationship with antigen gene transcription*. Nucleic Acids Res, 1984. **12**(13): p. 5235-47.
236. Gommers-Ampt, J.H., et al., *The identification of hydroxymethyluracil in DNA of Trypanosoma brucei*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(9): p. 2039-43.
237. Gommers-Ampt, J., J. Lutgerink, and P. Borst, *A novel DNA nucleotide in Trypanosoma brucei only present in the mammalian phase of the life-cycle*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(8): p. 1745-51.
238. Borst, P. and R. Sabatini, *Base J: discovery, biosynthesis, and possible functions*. Annu Rev Microbiol, 2008. **62**: p. 235-51.
239. van Leeuwen, F., et al., *beta-D-glucosyl-hydroxymethyluracil is a conserved DNA modification in kinetoplastid protozoans and is abundant in their telomeres*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2366-71.
240. van Leeuwen, F., et al., *Localization of the modified base J in telomeric VSG gene expression sites of Trypanosoma brucei*. Genes Dev, 1997. **11**(23): p. 3232-41.
241. Dooijes, D., et al., *Base J originally found in kinetoplastida is also a minor constituent of nuclear DNA of Euglena gracilis*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(16): p. 3017-21.
242. Genest, P.A., et al., *Telomeric localization of the modified DNA base J in the genome of the protozoan parasite Leishmania*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(7): p. 2116-24.
243. Cross, M., et al., *The modified base J is the target for a novel DNA-binding protein in kinetoplastid protozoans*. EMBO J, 1999. **18**(22): p. 6573-81.

## Références bibliographiques

244. Reynolds, D.L., et al., *Base J represses genes at the end of polycistronic gene clusters in Leishmania major by promoting RNAP II termination*. Mol Microbiol, 2016. **101**(4): p. 559-74.
245. Kieft, R., et al., *Identification of a novel base J binding protein complex involved in RNA polymerase II transcription termination in trypanosomes*. PLoS Genet, 2020. **16**(2): p. e1008390.
246. Jensen, B.C., et al., *Chromatin-Associated Protein Complexes Link DNA Base J and Transcription Termination in Leishmania*. mSphere, 2021. **6**(1).
247. Hazelbaker, D.Z. and S. Buratowski, *Transcription: base J blocks the way*. Curr Biol, 2012. **22**(22): p. R960-2.
248. Silmon de Monerri, N.C. and K. Kim, *Pathogens hijack the epigenome: a new twist on host-pathogen interactions*. Am J Pathol, 2014. **184**(4): p. 897-911.
249. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
250. Dacher, M., et al., *Incorporation and influence of Leishmania histone H3 in chromatin*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(22): p. 11637-11648.
251. Mannaert, A., et al., *Adaptive mechanisms in pathogens: universal aneuploidy in Leishmania*. Trends Parasitol, 2012. **28**(9): p. 370-6.
252. Lachaud, L., et al., *Constitutive mosaic aneuploidy is a unique genetic feature widespread in the Leishmania genus*. Microbes Infect, 2014. **16**(1): p. 61-6.
253. Sterkers, Y., et al., *Parasexuality and mosaic aneuploidy in Leishmania: alternative genetics*. Trends Parasitol, 2014. **30**(9): p. 429-35.
254. Ford, C.B., et al., *The evolution of drug resistance in clinical isolates of Candida albicans*. Elife, 2015. **4**: p. e00662.
255. Refsnider, J.M., et al., *Genomic Correlates of Virulence Attenuation in the Deadly Amphibian Chytrid Fungus, Batrachochytrium dendrobatidis*. G3 (Bethesda), 2015. **5**(11): p. 2291-8.
256. Leprohon, P., et al., *Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant Leishmania infantum*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(5): p. 1387-99.
257. Ubeda, J.M., et al., *Modulation of gene expression in drug resistant Leishmania is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy*. Genome Biol, 2008. **9**(7): p. R115.
258. Laffitte, M.N., et al., *Plasticity of the Leishmania genome leading to gene copy number variations and drug resistance*. F1000Res, 2016. **5**: p. 2350.
259. Dumetz, F., et al., *Modulation of Aneuploidy in Leishmania donovani during Adaptation to Different In Vitro and In Vivo Environments and Its Impact on Gene Expression*. mBio, 2017. **8**(3).
260. Ubeda, J.M., et al., *Genome-wide stochastic adaptive DNA amplification at direct and inverted DNA repeats in the parasite Leishmania*. PLoS Biol, 2014. **12**(5): p. e1001868.
261. Laffitte, M.C., et al., *Formation of linear amplicons with inverted duplications in Leishmania requires the MRE11 nuclease*. PLoS Genet, 2014. **10**(12): p. e1004805.
262. Genois, M.M., et al., *Roles of Rad51 paralogs for promoting homologous recombination in Leishmania infantum*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(5): p. 2701-15.

## Références bibliographiques

263. Laffitte, M.C., et al., *Deep-sequencing revealing mutation dynamics in the miltefosine transporter gene in Leishmania infantum selected for miltefosine resistance*. Parasitol Res, 2016. **115**(10): p. 3699-703.
264. Perez-Victoria, F.J., et al., *Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from Leishmania involved in drug resistance*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 49965-71.
265. Fernandez-Prada, C., 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): p. e0005171.
266. Bifeld, E., et al., *Geographical sequence variation in the Leishmania major virulence factor P46*. Infect Genet Evol, 2015. **30**: p. 195-205.
267. Thomas, M.C. and C.M. Chiang, *The general transcription machinery and general cofactors*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2006. **41**(3): p. 105-78.
268. Lee, T.I. and R.A. Young, *Transcription of eukaryotic protein-coding genes*. Annu Rev Genet, 2000. **34**: p. 77-137.
269. Juven-Gershon, T., et al., *The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(3): p. 253-9.
270. Mathis, D.J. and P. Chambon, *The SV40 early region TATA box is required for accurate in vitro initiation of transcription*. Nature, 1981. **290**(5804): p. 310-5.
271. Baumann, M., J. Pontiller, and W. Ernst, *Structure and basal transcription complex of RNA polymerase II core promoters in the mammalian genome: an overview*. Mol Biotechnol, 2010. **45**(3): p. 241-7.
272. Saito, R.M., M.G. Elgort, and D.A. Campbell, *A conserved upstream element is essential for transcription of the Leishmania tarentolae mini-exon gene*. EMBO J, 1994. **13**(22): p. 5460-9.
273. Myler, P.J., et al., *The Leishmania genome project: new insights into gene organization and function*. Med Microbiol Immunol, 2001. **190**(1-2): p. 9-12.
274. Tosato, V., et al., *Secondary DNA structure analysis of the coding strand switch regions of five Leishmania major Friedlin chromosomes*. Curr Genet, 2001. **40**(3): p. 186-94.
275. Worthey, E.A., et al., *Leishmania major chromosome 3 contains two long convergent polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(14): p. 4201-10.
276. Martinez-Calvillo, S., et al., *Transcription initiation and termination on Leishmania major chromosome 3*. Eukaryot Cell, 2004. **3**(2): p. 506-17.
277. Martinez-Calvillo, S., et al., *Transcription of Leishmania major Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region*. Mol Cell, 2003. **11**(5): p. 1291-9.
278. Dubessay, P., et al., *The switch region on Leishmania major chromosome 1 is not required for mitotic stability or gene expression, but appears to be essential*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(17): p. 3692-7.
279. Lee, M.G. and L.H. Van der Ploeg, *Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I*. Annu Rev Microbiol, 1997. **51**: p. 463-89.
280. Monnerat, S., et al., *Genomic organization and gene expression in a chromosomal region of Leishmania major*. Mol Biochem Parasitol, 2004. **134**(2): p. 233-43.

## Références bibliographiques

281. Clayton, C.E., *Life without transcriptional control? From fly to man and back again*. EMBO J, 2002. **21**(8): p. 1881-8.
282. Ouellette, M., et al., [*Studies on the parasite Leishmania in the post-genomic era*]. Med Sci (Paris), 2003. **19**(10): p. 900-9.
283. Cohen-Freue, G., et al., *Global gene expression in Leishmania*. Int J Parasitol, 2007. **37**(10): p. 1077-86.
284. Haile, S. and B. Papadopoulou, *Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa*. Curr Opin Microbiol, 2007. **10**(6): p. 569-77.
285. Clayton, C. and M. Shapira, *Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias*. Mol Biochem Parasitol, 2007. **156**(2): p. 93-101.
286. Lahav, T., et al., *Multiple levels of gene regulation mediate differentiation of the intracellular pathogen Leishmania*. FASEB J, 2011. **25**(2): p. 515-25.
287. Azevedo, A., et al., *Leishmania major phosphoglycerate kinase transcript and protein stability contributes to differences in isoform expression levels*. Exp Parasitol, 2015. **159**: p. 222-6.
288. Brandau, S., A. Dresel, and J. Clos, *High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus Leishmania*. Biochem J, 1995. **310** ( Pt 1): p. 225-32.
289. Bringaud, F., et al., *Members of a large retroposon family are determinants of post-transcriptional gene expression in Leishmania*. PLoS Pathog, 2007. **3**(9): p. 1291-307.
290. Azizi, H., C. Dumas, and B. Papadopoulou, *The Pumilio-domain protein PUF6 contributes to SIDER2 retroposon-mediated mRNA decay in Leishmania*. RNA, 2017. **23**(12): p. 1874-1885.
291. Boucher, N., et al., *A common mechanism of stage-regulated gene expression in Leishmania mediated by a conserved 3'-untranslated region element*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19511-20.
292. Dumas, C., et al., *A novel class of developmentally regulated noncoding RNAs in Leishmania*. Eukaryot Cell, 2006. **5**(12): p. 2033-46.
293. Trouiller, P., et al., *Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure*. Lancet, 2002. **359**(9324): p. 2188-94.
294. Wilson, A.L., et al., *The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases*. PLoS Negl Trop Dis, 2020. **14**(1): p. e0007831.
295. Grimaldi, G., Jr., et al., *The effect of removing potentially infectious dogs on the numbers of canine Leishmania infantum infections in an endemic area with high transmission rates*. Am J Trop Med Hyg, 2012. **86**(6): p. 966-71.
296. Werneck, G.L., et al., *Effectiveness of insecticide spraying and culling of dogs on the incidence of Leishmania infantum infection in humans: a cluster randomized trial in Teresina, Brazil*. PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(10): p. e3172.
297. Dantas-Torres, F., et al., *Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health*. Emerg Infect Dis, 2019. **25**(12): p. 1-4.
298. Graciano, R.C.D., et al., *Recent Patents Applications in Red Biotechnology: A Mini-Review*. Recent Pat Biotechnol, 2019. **13**(3): p. 170-186.
299. Busvine, J., *Disease Transmission by Insects: Its Discovery and 90 Years of Effort to Prevent it*. illustrée ed. 361 pages.

## Références bibliographiques

300. de, A.J., [*Prevention of kala-azar in Ceara, Brazil*]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1961. **3**: p. 175-80.
301. Deane, L.M., M.P. Deane, and J.E. Alencar, [*Control of Phlebotomus longipalpis by DDT house spraying endemic foci of kala-azar in Ceara*]. Rev Bras Malariol Doencas Trop, 1955. **7**(1): p. 131-41.
302. Lun, Z.R., et al., *Visceral Leishmaniasis in China: an Endemic Disease under Control*. Clin Microbiol Rev, 2015. **28**(4): p. 987-1004.
303. Pathirage, D.R.K., et al., *Insecticide susceptibility of the sand fly leishmaniasis vector Phlebotomus argentipes in Sri Lanka*. Parasit Vectors, 2020. **13**(1): p. 246.
304. Davies, C.R., et al., *The fall and rise of Andean cutaneous leishmaniasis: transient impact of the DDT campaign in Peru*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1994. **88**(4): p. 389-93.
305. Rahman, M.M., *Insecticide substitutes for DDT to control mosquitoes may be causes of several diseases*. Environ Sci Pollut Res Int, 2013. **20**(4): p. 2064-9.
306. Lara-Silva, F.O., et al., *Evaluation of chemical spraying and environmental management efficacy in areas with minor previous application of integrated control actions for visceral leishmaniasis in Brazil*. Acta Trop, 2017. **176**: p. 109-113.
307. Otranto, D. and F. Dantas-Torres, *The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health*. Trends Parasitol, 2013. **29**(7): p. 339-45.
308. Alexander, B. and M. Maroli, *Control of phlebotomine sandflies*. Med Vet Entomol, 2003. **17**(1): p. 1-18.
309. Kazimoto, T.A., et al., *Impact of 4% Deltamethrin-Impregnated Dog Collars on the Prevalence and Incidence of Canine Visceral Leishmaniasis*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2018. **18**(7): p. 356-363.
310. Foglia Manzillo, V., et al., *Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of Leishmania infection in kennelled stray dogs*. Vet Parasitol, 2006. **142**(1-2): p. 142-5.
311. Jalilnavaz, M.R., et al., *Application of Flumethrin Pour-On on Reservoir Dogs and Its Efficacy against Sand Flies in Endemic Focus of Visceral Leishmaniasis, Meshkinshahr, Iran*. J Arthropod Borne Dis, 2016. **10**(1): p. 78-86.
312. Gomez, S.A., et al., *Phlebotomine mortality effect of systemic insecticides administered to dogs*. Parasit Vectors, 2018. **11**(1): p. 230.
313. Courtenay, O., et al., *Insecticide-impregnated dog collars reduce infantile clinical visceral leishmaniasis under operational conditions in NW Iran: A community-wide cluster randomised trial*. PLoS Negl Trop Dis, 2019. **13**(3): p. e0007193.
314. Gavgani, A.S., et al., *Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial*. Lancet, 2002. **360**(9330): p. 374-9.
315. S.H.P. Parakrama Karunaratne, W.A.P.P.D.S., Thilini Chathurika Weeraratne and Sinnathamby Noble Surendran, *Insecticide resistance in mosquitoes: Development, mechanisms and monitoring*. Ceylon Journal of Science 47(4), 2018.
316. Surendran, S.N., et al., *Molecular and biochemical characterization of a sand fly population from Sri Lanka: evidence for insecticide resistance due to altered esterases and insensitive acetylcholinesterase*. Bull Entomol Res, 2005. **95**(4): p. 371-80.

## Références bibliographiques

317. Bhattacharya, S.K., et al., *Elimination of leishmaniasis (kala-azar) from the Indian subcontinent is technically feasible & operationally achievable*. Indian J Med Res, 2006. **123**(3): p. 195-6.
318. Chowdhury, R., et al., *Susceptibility of field-collected Phlebotomus argentipes (Diptera: Psychodidae) sand flies from Bangladesh and Nepal to different insecticides*. Parasit Vectors, 2018. **11**(1): p. 336.
319. WHO. *WHO Takes a Position on Genetically Modified Mosquitoes.*; Available from: <https://www.who.int/news/item/14-10-2020-who-takes-a-position-on-genetically-modified-mosquitoes> ((accessed on 1 December 2022).
320. Hammond, A.M. and R. Galizi, *Gene drives to fight malaria: current state and future directions*. Pathog Glob Health, 2017. **111**(8): p. 412-423.
321. Flores, H.A. and S.L. O'Neill, *Controlling vector-borne diseases by releasing modified mosquitoes*. Nat Rev Microbiol, 2018. **16**(8): p. 508-518.
322. Karimian, F., et al., *Aerobic midgut microbiota of sand fly vectors of zoonotic visceral leishmaniasis from northern Iran, a step toward finding potential paratransgenic candidates*. Parasit Vectors, 2019. **12**(1): p. 10.
323. Gunathilaka, N., et al., *The Diversity of Midgut Bacteria among Wild-Caught Phlebotomus argentipes (Psychodidae: Phlebotominae), the Vector of Leishmaniasis in Sri Lanka*. Biomed Res Int, 2020. **2020**: p. 5458063.
324. D'Amelio, E., S. Salemi, and R. D'Amelio, *Anti-Infectious Human Vaccination in Historical Perspective*. Int Rev Immunol, 2016. **35**(3): p. 260-90.
325. Bordenave, G., *Louis Pasteur (1822-1895)*. Microbes Infect, 2003. **5**(6): p. 553-60.
326. Plotkin, S., *History of vaccination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(34): p. 12283-7.
327. Nerlich, A., *Paleopathology and Paleomicrobiology of Malaria*. Microbiol Spectr, 2016. **4**(6).
328. Palatnik-de-Sousa, C.B. and D. Nico, *The Delay in the Licensing of Protozoal Vaccines: A Comparative History*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 204.
329. Ross, R., *The role of the mosquito in the evolution of the malarial parasite: the recent researches of Surgeon-Major Ronald Ross, I.M.S. 1898*. Yale J Biol Med, 2002. **75**(2): p. 103-5.
330. Okwor, I., et al., *Protective immunity and vaccination against cutaneous leishmaniasis*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 128.
331. Nadim, A., et al., *Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis*. Bull Soc Pathol Exot Filiales, 1983. **76**(4): p. 377-83.
332. Khamesipour, A., et al., *Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis*. Vaccine, 2005. **23**(28): p. 3642-8.
333. Mohebbali, M., A. Nadim, and A. Khamesipour, *An overview of leishmanization experience: A successful control measure and a tool to evaluate candidate vaccines*. Acta Trop, 2019. **200**: p. 105173.
334. Pacheco-Fernandez, T., et al., *Revival of Leishmanization and Leishmanin*. Front Cell Infect Microbiol, 2021. **11**: p. 639801.
335. Greenblatt, C.L., *The present and future of vaccination for cutaneous leishmaniasis*. Prog Clin Biol Res, 1980. **47**: p. 259-85.

## Références bibliographiques

336. Seyed, N., N.C. Peters, and S. Rafati, *Translating Observations From Leishmanization Into Non-Living Vaccines: The Potential of Dendritic Cell-Based Vaccination Strategies Against Leishmania*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1227.
337. Moafi, M., et al., *Leishmania Vaccines Entered in Clinical Trials: A Review of Literature*. *Int J Prev Med*, 2019. **10**: p. 95.
338. Yamamoto, D.S., H. Nagumo, and S. Yoshida, *Flying vaccinator; a transgenic mosquito delivers a Leishmania vaccine via blood feeding*. *Insect Mol Biol*, 2010. **19**(3): p. 391-8.
339. Miro, G., et al., *Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniasis*. *Trends Parasitol*, 2017. **33**(9): p. 718-730.
340. Solano-Gallego, L., et al., *Diagnostic Challenges in the Era of Canine Leishmania infantum Vaccines*. *Trends Parasitol*, 2017. **33**(9): p. 706-717.
341. Palatnik-de-Sousa, C.B., *Vaccines for canine leishmaniasis*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 69.
342. Das, S., et al., *Modular multiantigen T cell epitope-enriched DNA vaccine against human leishmaniasis*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(234): p. 234ra56.
343. Kamhawi, S., F. Oliveira, and J.G. Valenzuela, *Using humans to make a human leishmaniasis vaccine*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(234): p. 234fs18.
344. Freitas-Junior, L.H., et al., *Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it?* *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 2012. **2**: p. 11-9.
345. Reguera, R.M., et al., *Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis*. *Vet Parasitol*, 2016. **227**: p. 98-114.
346. Noli, C. and S.T. Auxilia, *Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review*. *Vet Dermatol*, 2005. **16**(4): p. 213-32.
347. Segarra, S., et al., *Prevention of disease progression in Leishmania infantum-infected dogs with dietary nucleotides and active hexose correlated compound*. *Parasit Vectors*, 2018. **11**(1): p. 103.
348. SALZER, A., *Nomenclature of organometallic compounds of the transition elements*. *Pure Appl. Chem*, 1999. **Vol. 71, No. 8**,.
349. Gustavo A.S. Romero, J.S.A.V.e.P.D.M., *Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético.*, in *In: 7 Congresso Brasileiro de Medicina Tropical de São Paulo*,. 1912: São Paulo, Brazil. .
350. Di Cristina G, C.G., *Sulla terapia della leishmaniosi interna. Sulla terapia della leishmaniosi interna*. *Pathologica*. 1915;7:82–83. 1915.
351. Cook, G.C., *Leonard Rogers KCSI FRCP FRS (1868-1962) and the founding of the Calcutta School of Tropical Medicine*. *Notes Rec R Soc Lond*, 2006. **60**(2): p. 171-81.
352. Brahmachari, U.N., *Chemotherapy of antimonial compounds in kala-azar infection. Part IV. Further observations on the therapeutic values of urea stibamine*. By U.N. Brahmachari, 1922. *Indian J Med Res*, 1989. **89**: p. 393-404.
353. Brahmachari, U.N., *A New Form of Cutaneous Leishmaniasis-Dermal Leishmanoid*. *Ind Med Gaz*, 1922. **57**(4): p. 125-127.
354. Bhattacharyya, P., *The Antimony Test in the Early Diagnosis of Kala-Azar*. *Ind Med Gaz*, 1928. **63**(3): p. 123-126.
355. Kikuth W, S.H., *Contribution to the progress of antimony therapy of kala-azar*. *Chinese Medical Journal*., 1937. **Vol.52 No.3**.

## Références bibliographiques

356. Goodwin, L.G., *Pentostam (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1995. **89**(3): p. 339-41.
357. Capela, R., R. Moreira, and F. Lopes, *An Overview of Drug Resistance in Protozoal Diseases*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(22).
358. Singh, S. and R. Sivakumar, *Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis*. J Infect Chemother, 2004. **10**(6): p. 307-15.
359. Olliaro, P.L., et al., *Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(12): p. 763-74.
360. Jha, T.K., *Evaluation of diamidine compound (pentamidine isethionate) in the treatment resistant cases of kala-azar occurring in North Bihar, India*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1983. **77**(2): p. 167-70.
361. Thakur, C.P., M. Kumar, and A.K. Pandey, *Comparison of regimes of treatment of antimony-resistant kala-azar patients: a randomized study*. Am J Trop Med Hyg, 1991. **45**(4): p. 435-41.
362. Jha, S.N., N.K. Singh, and T.K. Jha, *Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial*. J Assoc Physicians India, 1991. **39**(4): p. 314-6.
363. Ouellette, M., J. Drummel-Smith, and B. Papadopoulou, *Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments*. Drug Resist Updat, 2004. **7**(4-5): p. 257-66.
364. Haldar, A.K., P. Sen, and S. Roy, *Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions*. Mol Biol Int, 2011. **2011**: p. 571242.
365. Berman, J.D., *Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years*. Clin Infect Dis, 1997. **24**(4): p. 684-703.
366. Sundar, S., *Treatment of visceral leishmaniasis*. Med Microbiol Immunol, 2001. **190**(1-2): p. 89-92.
367. Williams, D., et al., *Comparison of the efficacy of free and non-ionic-surfactant vesicular formulations of paromomycin in a murine model of visceral leishmaniasis*. J Pharm Pharmacol, 1998. **50**(12): p. 1351-6.
368. Lindoso, J.A.L., et al., *Review of the current treatments for leishmaniasis*. Res Rep Trop Med, 2012. **3**: p. 69-77.
369. Chunge, C.N., et al., *Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1990. **84**(2): p. 221-5.
370. den Boer, M.L., et al., *Developments in the treatment of visceral leishmaniasis*. Expert Opin Emerg Drugs, 2009. **14**(3): p. 395-410.
371. Pfaller, M.A. and J.J. Marr, *Antileishmanial effect of allopurinol*. Antimicrob Agents Chemother, 1974. **5**(5): p. 469-72.
372. Saenz, R.E., et al., *Treatment of American cutaneous leishmaniasis with orally administered allopurinol riboside*. J Infect Dis, 1989. **160**(1): p. 153-8.
373. Mattin, M.J., et al., *The frequency and distribution of canine leishmaniasis diagnosed by veterinary practitioners in Europe*. Vet J, 2014. **200**(3): p. 410-9.
374. Leonard, R., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of 6% miltefosine solution, a topical chemotherapy in cutaneous metastases from breast cancer*. J Clin Oncol, 2001. **19**(21): p. 4150-9.
375. Croft, S.L., et al., *The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against Leishmania donovani*. Biochem Pharmacol, 1987. **36**(16): p. 2633-6.

## Références bibliographiques

376. Sundar, S., et al., *Short-course of oral miltefosine for treatment of visceral leishmaniasis*. Clin Infect Dis, 2000. **31**(4): p. 1110-3.
377. Sundar, S., et al., *Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2006. **100 Suppl 1**: p. S26-33.
378. Barone, J.A., *Domperidone: a peripherally acting dopamine2-receptor antagonist*. Ann Pharmacother, 1999. **33**(4): p. 429-40.
379. Reddymasu, S.C., I. Soykan, and R.W. McCallum, *Domperidone: review of pharmacology and clinical applications in gastroenterology*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(9): p. 2036-45.
380. Woosley, K.P., *The problem of gastric atony*. Clin Tech Small Anim Pract, 2004. **19**(1): p. 43-8.
381. Gomez-Ochoa, P., et al., *Lactating females Syrian hamster (Mesocricetus auratus) show protection against experimental Leishmania infantum infection*. Vet Parasitol, 2003. **116**(1): p. 61-4.
382. Gomez-Ochoa, P., et al., *Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial*. Vet J, 2009. **179**(2): p. 259-63.
383. Lanaro, E., *Efficacy of a combined therapy with meglumine antimoniate and domperidone for treatment of canine leishmaniosis*. , in *73o Congresso Internazionale Multisala SCIVAC*. 2011.
384. Oliva, G., V. Foglia Manzillo, and A. Pagano, *[Canine leishmaniasis: evolution of the chemotherapeutic protocols]*. Parassitologia, 2004. **46**(1-2): p. 231-4.
385. Valladares, J.E., et al., *Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with Leishmania infantum*. Vet Parasitol, 1998. **75**(1): p. 33-40.
386. Belloli, C., et al., *Disposition of antimony and aminosidine in dogs after administration separately and together: implications for therapy of leishmaniasis*. Res Vet Sci, 1995. **58**(2): p. 123-7.
387. Rhalem, A., et al., *Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment*. Vet Immunol Immunopathol, 1999. **71**(1): p. 69-76.
388. Roberts, C.W., et al., *Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa*. Mol Biochem Parasitol, 2003. **126**(2): p. 129-42.
389. Torchilin, V.P., *Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(2): p. 145-60.
390. Sundar, S., et al., *Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations*. Clin Infect Dis, 2004. **38**(3): p. 377-83.
391. Mondal, D., et al., *Efficacy and safety of single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in a rural public hospital in Bangladesh: a feasibility study*. Lancet Glob Health, 2014. **2**(1): p. e51-7.
392. Kshirsagar, N.A., *Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis*. Lancet Glob Health, 2014. **2**(4): p. e203.
393. Sundar, S., et al., *Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India*. N Engl J Med, 2010. **362**(6): p. 504-12.

## Références bibliographiques

394. Croft, S.L. and P. Olliaro, *Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(10): p. 1478-83.
395. Belloli, C., et al., *Disposition of antimony and aminosidine combination after multiple subcutaneous injections in dogs*. Vet J, 1999. **157**(3): p. 315-21.
396. Poli, A., et al., *Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis*. Vet Parasitol, 1997. **71**(4): p. 263-71.
397. el-On, J., et al., *Topical treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania major: a double-blind control study*. J Am Acad Dermatol, 1992. **27**(2 Pt 1): p. 227-31.
398. A.P.S. Matos, A.L.V., M.I. Ré, E. Ricci-Júnior, C. Holandino,, *A review of current treatments strategies based on paromomycin for leishmaniasis*. Journal of Drug Delivery Science and Technology,, 2020. **Volume 57**,.
399. Baneth, G. and S.E. Shaw, *Chemotherapy of canine leishmaniosis*. Vet Parasitol, 2002. **106**(4): p. 315-24.
400. Saridomichelakis, M.N., et al., *Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniosis (Leishmania infantum) in the endemic areas*. Vet Parasitol, 2005. **130**(3-4): p. 199-205.
401. Torres, M., et al., *Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol*. Vet J, 2011. **188**(3): p. 346-51.
402. Noli, C. and M.N. Saridomichelakis, *An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by Leishmania infantum (syn. L. chagasi)*. Vet J, 2014. **202**(3): p. 425-35.
403. Mateo, M., et al., *Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis*. Parasitol Res, 2009. **105**(1): p. 155-62.
404. Sindermann, H. and J. Engel, *Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2006. **100 Suppl 1**: p. S17-20.
405. Sundar, S. and P.L. Olliaro, *Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management*. Ther Clin Risk Manag, 2007. **3**(5): p. 733-40.
406. Sabate, D., et al., *A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area*. Prev Vet Med, 2014. **115**(1-2): p. 56-63.
407. Gomez-Ochoa, P., et al., *Use of the nitroblue tetrazolium reduction test for the evaluation of Domperidone effects on the neutrophilic function of healthy dogs*. Vet Immunol Immunopathol, 2012. **146**(1): p. 97-9.
408. (WHO), e. *Model List of Essential Medicines*. Available from: <https://list.essentialmeds.org/>.
409. VetCompanion. *Clinical resources for veterinary medicine*. Available from: <https://vetcompanion.com/monographs>.
410. Koutinas, A.F., et al., *Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996)*. J Am Anim Hosp Assoc, 1999. **35**(5): p. 376-83.

## Références bibliographiques

411. Zaghoul, I.Y. and M. Al-Jasser, *Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of antimony in hamsters*. Ann Trop Med Parasitol, 2004. **98**(8): p. 793-800.
412. Oliveira, L.F., et al., *Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World*. Acta Trop, 2011. **118**(2): p. 87-96.
413. Serrano, D.R., et al., *Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations*. Int J Pharm, 2013. **447**(1-2): p. 38-46.
414. Manna, L., et al., *Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis*. Vet J, 2009. **182**(3): p. 441-5.
415. Frezard, F., C. Demicheli, and R.R. Ribeiro, *Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs*. Molecules, 2009. **14**(7): p. 2317-36.
416. Shaked-Mishan, P., et al., *Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in Leishmania donovani*. J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 3971-6.
417. Gourbal, B., et al., *Drug uptake and modulation of drug resistance in Leishmania by an aquaglyceroporin*. J Biol Chem, 2004. **279**(30): p. 31010-7.
418. Brochu, C., et al., *Antimony uptake systems in the protozoan parasite Leishmania and accumulation differences in antimony-resistant parasites*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(10): p. 3073-9.
419. Sereno, D., et al., *Axenically grown amastigotes of Leishmania infantum used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(12): p. 3097-102.
420. Ferreira Cdos, S., et al., *Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione*. Biometals, 2003. **16**(3): p. 441-6.
421. Yan, S., et al., *Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony(III) and trypanothione*. J Biol Inorg Chem, 2003. **8**(6): p. 689-97.
422. Nozaki, T., et al., *Characterization of transsulfuration and cysteine biosynthetic pathways in the protozoan hemoflagellate, Trypanosoma cruzi. Isolation and molecular characterization of cystathionine beta-synthase and serine acetyltransferase from Trypanosoma*. J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6516-23.
423. Williams, R.A., et al., *3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase of Leishmania contains an unusual C-terminal extension and is involved in thioredoxin and antioxidant metabolism*. J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1480-6.
424. Grondin, K., et al., *Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene gsh1 and of the ABC transporter gene pgpA in arsenite-resistant Leishmania tarentolae*. EMBO J, 1997. **16**(11): p. 3057-65.
425. Flohe, L., H.J. Hecht, and P. Steinert, *Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(9-10): p. 966-84.
426. Frezard, F., et al., *Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(3): p. 913-6.
427. Yan, S., et al., *Rapid reduction of pentavalent antimony by trypanothione: potential relevance to antimonial activation*. Chem Commun (Camb), 2003(2): p. 266-7.

## Références bibliographiques

428. Denton, H., J.C. McGregor, and G.H. Coombs, *Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1*. *Biochem J*, 2004. **381**(Pt 2): p. 405-12.
429. Zhou, Y., et al., *Leishmania major LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(36): p. 37445-51.
430. Balana-Fouce, R., et al., *The pharmacology of leishmaniasis*. *Gen Pharmacol*, 1998. **30**(4): p. 435-43.
431. Berman, J.D., *Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies*. *Rev Infect Dis*, 1988. **10**(3): p. 560-86.
432. Wyllie, S., M.L. Cunningham, and A.H. Fairlamb, *Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen Leishmania donovani*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(38): p. 39925-32.
433. Muller, S., et al., *Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites*. *Trends Parasitol*, 2003. **19**(7): p. 320-8.
434. Sereno, D., et al., *Antimonial-mediated DNA fragmentation in Leishmania infantum amastigotes*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001. **45**(7): p. 2064-9.
435. Berman, J.D., D. Waddell, and B.D. Hanson, *Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1985. **27**(6): p. 916-20.
436. Berman, J.D., J.V. Gallalee, and J.M. Best, *Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in Leishmania mexicana amastigotes*. *Biochem Pharmacol*, 1987. **36**(2): p. 197-201.
437. Walker, J. and N.G. Saravia, *Inhibition of Leishmania donovani promastigote DNA topoisomerase I and human monocyte DNA topoisomerases I and II by antimonial drugs and classical antitopoisomerase agents*. *J Parasitol*, 2004. **90**(5): p. 1155-62.
438. Chakraborty, A.K. and H.K. Majumder, *Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of Leishmania donovani*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988. **152**(2): p. 605-11.
439. Chai, Y., et al., *Complexation of antimony (Sb(V)) with guanosine 5'-monophosphate and guanosine 5'-diphospho-D-mannose: formation of both mono- and bis-adducts*. *J Inorg Biochem*, 2005. **99**(12): p. 2257-63.
440. Demicheli, C., et al., *Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1570**(3): p. 192-8.
441. Martin, J.L., et al., *A role for adenine nucleotides in the sensing mechanism to purine starvation in Leishmania donovani*. *Mol Microbiol*, 2016. **101**(2): p. 299-313.
442. Amer, A.O. and M.S. Swanson, *A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage*. *Curr Opin Microbiol*, 2002. **5**(1): p. 56-61.
443. Rais, S., et al., *Sodium stibogluconate (Pentostam) potentiates oxidant production in murine visceral leishmaniasis and in human blood*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. **44**(9): p. 2406-10.
444. Mookerjee Basu, J., et al., *Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in Leishmania donovani-infected macrophages*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006. **50**(5): p. 1788-97.

## Références bibliographiques

445. Murray, H.W. and C.F. Nathan, *Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral Leishmania donovani*. J Exp Med, 1999. **189**(4): p. 741-6.
446. Liew, F.Y., et al., *Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine*. J Immunol, 1990. **144**(12): p. 4794-7.
447. Hu, L., et al., *Azaterphenyl diamidines as antileishmanial agents*. Bioorg Med Chem Lett, 2008. **18**(1): p. 247-51.
448. Johnson, R., et al., *Interaction of cationic diamidines with Leishmania infantum DNA*. Biol Chem, 1998. **379**(7): p. 925-30.
449. Cortazar, T.M., G.H. Coombs, and J. Walker, *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, 2007. **116**(4): p. 475-82.
450. Mukherjee, A., et al., *Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in Leishmania donovani*. Mol Biochem Parasitol, 2006. **145**(1): p. 1-10.
451. Goto, H. and J.A. Lindoso, *Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2010. **8**(4): p. 419-33.
452. Mehta, A. and C. Shaha, *Apoptotic death in Leishmania donovani promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 11798-813.
453. Calonge, M., et al., *Effects of cationic diamidines on polyamine content and uptake on Leishmania infantum in in vitro cultures*. Biochem Pharmacol, 1996. **52**(6): p. 835-41.
454. Basselin, M., G.H. Coombs, and M.P. Barrett, *Putrescine and spermidine transport in Leishmania*. Mol Biochem Parasitol, 2000. **109**(1): p. 37-46.
455. Ramos, H., et al., *Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions*. J Membr Biol, 1996. **152**(1): p. 65-75.
456. Goad, L.J., G.G. Holz, Jr., and D.H. Beach, *Sterols of Leishmania species. Implications for biosynthesis*. Mol Biochem Parasitol, 1984. **10**(2): p. 161-70.
457. Lamy-Freund, M.T., V.F. Ferreira, and S. Schreier, *Mechanism of inactivation of the polyene antibiotic amphotericin B. Evidence for radical formation in the process of autooxidation*. J Antibiot (Tokyo), 1985. **38**(6): p. 753-7.
458. Kumar, A., et al., *Ascorbate peroxidase, a key molecule regulating amphotericin B resistance in clinical isolates of Leishmania donovani*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(10): p. 6172-84.
459. Davis, B.D., *Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides*. Microbiol Rev, 1987. **51**(3): p. 341-50.
460. Jhingran, A., et al., *Paromomycin: uptake and resistance in Leishmania donovani*. Mol Biochem Parasitol, 2009. **164**(2): p. 111-7.
461. Maarouf, M., et al., *Ribosomes of Leishmania are a target for the aminoglycosides*. Parasitol Res, 1995. **81**(5): p. 421-5.
462. Maarouf, M., et al., *In vivo interference of paromomycin with mitochondrial activity of Leishmania*. Exp Cell Res, 1997. **232**(2): p. 339-48.
463. Maarouf, M., et al., *Biochemical alterations in paromomycin-treated Leishmania donovani promastigotes*. Parasitol Res, 1997. **83**(2): p. 198-202.

## Références bibliographiques

464. Chawla, B., et al., *Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin -susceptible -resistant Leishmania donovani*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26660.
465. Nelson, D.J., et al., *Metabolism of pyrazolo(3,4-d)pyrimidines in Leishmania braziliensis and Leishmania donovani. Allopurinol, oxipurinol, and 4-aminopyrazolo(3,4-d)pyrimidine*. J Biol Chem, 1979. **254**(10): p. 3959-64.
466. Marr, J.J., R.L. Berens, and D.J. Nelson, *Purine metabolism in Leishmania donovani and Leishmania braziliensis*. Biochim Biophys Acta, 1978. **544**(2): p. 360-71.
467. Chawla, B. and R. Madhubala, *Drug targets in Leishmania*. J Parasit Dis, 2010. **34**(1): p. 1-13.
468. Rakotomanga, M., et al., *Miltefosine affects lipid metabolism in Leishmania donovani promastigotes*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(4): p. 1425-30.
469. Rakotomanga, M., M. Saint-Pierre-Chazalet, and P.M. Loiseau, *Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant Leishmania donovani promastigotes and consequences for drug-membrane interactions*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(7): p. 2677-86.
470. Luque-Ortega, J.R. and L. Rivas, *Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in Leishmania donovani promastigotes*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(4): p. 1327-32.
471. Verma, N.K. and C.S. Dey, *Possible mechanism of miltefosine-mediated death of Leishmania donovani*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(8): p. 3010-5.
472. Wadhone, P., et al., *Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response*. J Immunol, 2009. **182**(11): p. 7146-54.
473. Perez-Victoria, F.J., S. Castanys, and F. Gamarro, *Leishmania donovani resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(8): p. 2397-403.
474. Perez-Victoria, F.J., et al., *Mechanisms of experimental resistance of Leishmania to miltefosine: Implications for clinical use*. Drug Resist Updat, 2006. **9**(1-2): p. 26-39.
475. Perez-Victoria, F.J., et al., *Phospholipid translocation and miltefosine potency require both L. donovani miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in Leishmania parasites*. J Biol Chem, 2006. **281**(33): p. 23766-75.
476. Majumder, B., R. Biswas, and U. Chattopadhyay, *Prolactin regulates antitumor immune response through induction of tumoricidal macrophages and release of IL-12*. Int J Cancer, 2002. **97**(4): p. 493-500.
477. Oliveira, A.G., et al., *Influence of the nutritional status in the clinical and therapeutical evolution in adults and elderly with American Tegumentary Leishmaniasis*. Acta Trop, 2013. **128**(1): p. 36-40.
478. Passos, S.R., et al., *Clinical treatment of cutaneous leishmaniasis in dogs with furazolidone and domperidone*. Int J Antimicrob Agents, 2014. **44**(5): p. 463-5.
479. Cavalera, M.A., et al., *Effect of domperidone (leisguard(R)) on antibody titers, inflammatory markers and creatinine in dogs with leishmaniosis and chronic kidney disease*. Parasit Vectors, 2021. **14**(1): p. 525.
480. Bottger, E.C. and B. Springer, *Tuberculosis: drug resistance, fitness, and strategies for global control*. Eur J Pediatr, 2008. **167**(2): p. 141-8.

## Références bibliographiques

481. Kaur, G. and B. Rajput, *Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in leishmania*. J Parasitol Res, 2014. **2014**: p. 726328.
482. Van den Kerkhof, M., et al., *Experimental Strategies to Explore Drug Action and Resistance in Kinetoplastid Parasites*. Microorganisms, 2020. **8**(6).
483. Berg, M., et al., *(Post-) Genomic approaches to tackle drug resistance in Leishmania*. Parasitology, 2013. **140**(12): p. 1492-505.
484. Decuypere, S., et al., *Molecular mechanisms of drug resistance in natural Leishmania populations vary with genetic background*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(2): p. e1514.
485. Ashutosh, S. Sundar, and N. Goyal, *Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania*. J Med Microbiol, 2007. **56**(Pt 2): p. 143-53.
486. Beverley, S.M., *Gene amplification in Leishmania*. Annu Rev Microbiol, 1991. **45**: p. 417-44.
487. Singh, R., et al., *Overexpression of histone H2A modulates drug susceptibility in Leishmania parasites*. Int J Antimicrob Agents, 2010. **36**(1): p. 50-7.
488. Gazanion, E., et al., *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): p. E3012-21.
489. Kramer, S., *Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids*. Mol Biochem Parasitol, 2012. **181**(2): p. 61-72.
490. Rastrojo, A., et al., *Genomic and transcriptomic alterations in Leishmania donovani lines experimentally resistant to antileishmanial drugs*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist, 2018. **8**(2): p. 246-264.
491. Paape, D. and T. Aebischer, *Contribution of proteomics of Leishmania spp. to the understanding of differentiation, drug resistance mechanisms, vaccine and drug development*. J Proteomics, 2011. **74**(9): p. 1614-24.
492. Akpunarlieva, S., et al., *Integration of proteomics and metabolomics to elucidate metabolic adaptation in Leishmania*. J Proteomics, 2017. **155**: p. 85-98.
493. Singh, A.K., et al., *A quantitative proteomic screen to identify potential drug resistance mechanism in alpha-difluoromethylornithine (DFMO) resistant Leishmania donovani*. J Proteomics, 2014. **102**: p. 44-59.
494. Berg, M., et al., *LC-MS metabolomics from study design to data-analysis - using a versatile pathogen as a test case*. Comput Struct Biotechnol J, 2013. **4**: p. e201301002.
495. Scheltema, R.A., et al., *The potential of metabolomics for Leishmania research in the post-genomics era*. Parasitology, 2010. **137**(9): p. 1291-302.
496. Shaw, C.D., et al., *Genomic and Metabolomic Polymorphism among Experimentally Selected Paromomycin-Resistant Leishmania donovani Strains*. Antimicrob Agents Chemother, 2019. **64**(1).
497. Gutierrez Guarnizo, S.A., et al., *Metabolite Biomarkers of Leishmania Antimony Resistance*. Cells, 2021. **10**(5).
498. Hotez, P.J., *NTDs V.2.0: "blue marble health"--neglected tropical disease control and elimination in a shifting health policy landscape*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(11): p. e2570.

## Références bibliographiques

499. Vanderslott, S., *Moving From Outsider to Insider Status Through Metrics: The Inclusion of “Neglected Tropical Diseases” Into the Sustainable Development Goals*. Journal of Human Development and Capabilities 2019. **20**(4): p. 418-435.
500. Organization, W.H., *Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: A road map for neglected tropical diseases 2021–2030*. 2021.
501. Engels, D., *Neglected tropical diseases in the Sustainable Development Goals*. Lancet, 2016. **387**(10015): p. 223-4.
502. Nascimento de Melo, S., et al., *Worldwide and Brazilian scientific publications on Leishmaniasis in the first 19 years of 21st century: a bibliometric study*. J Infect Dev Ctries, 2022. **16**(4): p. 675-682.
503. Ramos, J.M., G. Gonzalez-Alcaide, and M. Bolanos-Pizarro, *Bibliometric analysis of leishmaniasis research in Medline (1945-2010)*. Parasit Vectors, 2013. **6**: p. 55.
504. Torres, F., et al., *LeishDB: a database of coding gene annotation and non-coding RNAs in Leishmania braziliensis*. Database (Oxford), 2017. **2017**.
505. Doyle, M.A., et al., *LeishCyc: a biochemical pathways database for Leishmania major*. BMC Syst Biol, 2009. **3**: p. 57.
506. Herrera, G., et al., *An interactive database of Leishmania species distribution in the Americas*. Sci Data, 2020. **7**(1): p. 110.
507. Beneke, T., et al., *A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids*. R Soc Open Sci, 2017. **4**(5): p. 170095.
508. Martel, D., et al., *Characterisation of Casein Kinase 1.1 in Leishmania donovani Using the CRISPR Cas9 Toolkit*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 4635605.
509. Aslett, M., et al., *TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D457-62.
510. Brincat, A. and M. Hofmann, *Automated extraction of genes associated with antibiotic resistance from the biomedical literature*. Database (Oxford), 2022. **2022**(2022).
511. Coderre, J.A., et al., *Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant Leishmania tropica*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(8): p. 2132-6.
512. Dewes, H., H.L. Ostergaard, and L. Simpson, *Impaired drug uptake in methotrexate resistant Crithidia fasciculata without changes in dihydrofolate reductase activity or gene amplification*. Mol Biochem Parasitol, 1986. **19**(2): p. 149-61.
513. Bhattacharya, A., et al., *Coupling chemical mutagenesis to next generation sequencing for the identification of drug resistance mutations in Leishmania*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 5627.
514. Mwenechanya, R., et al., *Sterol 14alpha-demethylase mutation leads to amphotericin B resistance in Leishmania mexicana*. PLoS Negl Trop Dis, 2017. **11**(6): p. e0005649.
515. Yaszynski, M., et al., *Drug resistance in leishmaniasis: current drug-delivery systems and future perspectives*. Future Med Chem, 2013. **5**(15): p. 1877-88.
516. Ouellette, M., F. Fase-Fowler, and P. Borst, *The amplified H circle of methotrexate-resistant leishmania tarentolae contains a novel P-glycoprotein gene*. EMBO J, 1990. **9**(4): p. 1027-33.
517. Klokouzas, A., et al., *ABC transporters and drug resistance in parasitic protozoa*. Int J Antimicrob Agents, 2003. **22**(3): p. 301-17.

## Références bibliographiques

518. Gottesman, M.M., T. Fojo, and S.E. Bates, *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 48-58.
519. Leprohon, P., et al., *Modulation of Leishmania ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites*. Eukaryot Cell, 2006. **5**(10): p. 1713-25.
520. Coelho, A.C., S.M. Beverley, and P.C. Cotrim, *Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in Leishmania major*. Mol Biochem Parasitol, 2003. **130**(2): p. 83-90.
521. El Fadili, K., 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): p. 1988-93.
522. Castanys-Munoz, E., et al., *A novel ATP-binding cassette transporter from Leishmania is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids*. Mol Microbiol, 2007. **64**(5): p. 1141-53.
523. Tejera Nevado, P., et al., *A Telomeric Cluster of Antimony Resistance Genes on Chromosome 34 of Leishmania infantum*. Antimicrob Agents Chemother, 2016. **60**(9): p. 5262-75.
524. Vergnes, B., et al., *A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in Leishmania donovani clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(1): p. 88-101.
525. Patino, L.H., 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): p. 9485.
526. Das, S., et al., *Over-expression of 60s ribosomal L23a is associated with cellular proliferation in SAG resistant clinical isolates of Leishmania donovani*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(12): p. e2527.
527. Hefnawy, A., et al., *Exploiting Knowledge on Leishmania Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs*. Trends Parasitol, 2017. **33**(3): p. 162-174.
528. Karamysheva, Z.N., S.A. Gutierrez Guarnizo, and A.L. Karamyshev, *Regulation of Translation in the Protozoan Parasite Leishmania*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(8).
529. Haimeur, A., et al., *Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant Leishmania tarentolae*. Mol Biochem Parasitol, 2000. **108**(1): p. 131-5.
530. Mandal, G., et al., *Increased levels of thiols protect antimony unresponsive Leishmania donovani field isolates against reactive oxygen species generated by trivalent antimony*. Parasitology, 2007. **134**(Pt 12): p. 1679-87.
531. Mukhopadhyay, R., et al., *Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in Leishmania*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(19): p. 10383-7.
532. Watkins, W.M. and M. Mosobo, *Treatment of Plasmodium falciparum malaria with pyrimethamine-sulfadoxine: selective pressure for resistance is a function of long elimination half-life*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1993. **87**(1): p. 75-8.
533. Read, A.F. and S. Huijben, *Evolutionary biology and the avoidance of antimicrobial resistance*. Evol Appl, 2009. **2**(1): p. 40-51.

## Références bibliographiques

534. Lira, R., et al., *Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of Leishmania donovani*. J Infect Dis, 1999. **180**(2): p. 564-7.
535. Vanaerschot, M., et al., *Drug resistance in vectorborne parasites: multiple actors and scenarios for an evolutionary arms race*. FEMS Microbiol Rev, 2014. **38**(1): p. 41-55.
536. Sereno, D., C. Maia, and K. Ait-Oudhia, *Antimony resistance and environment: Elusive links to explore during Leishmania life cycle*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist, 2012. **2**: p. 200-3.
537. Yardley, V., et al., *American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility?* J Infect Dis, 2006. **194**(8): p. 1168-75.
538. Ponte-Sucre, A., et al., *Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge*. PLoS Negl Trop Dis, 2017. **11**(12): p. e0006052.
539. Adai, V., et al., *Association of the Endobiont Double-Stranded RNA Virus LRV1 With Treatment Failure for Human Leishmaniasis Caused by Leishmania braziliensis in Peru and Bolivia*. J Infect Dis, 2016. **213**(1): p. 112-21.
540. Bourreau, E., et al., *Presence of Leishmania RNA Virus 1 in Leishmania guyanensis Increases the Risk of First-Line Treatment Failure and Symptomatic Relapse*. J Infect Dis, 2016. **213**(1): p. 105-11.
541. Weeks, R., et al., *LRV1 viral particles in Leishmania guyanensis contain double-stranded or single-stranded RNA*. J Virol, 1992. **66**(3): p. 1389-93.
542. Patterson, J.L., *Viruses of protozoan parasites*. Exp Parasitol, 1990. **70**(1): p. 111-3.
543. Hartley, M.A., et al., *Leishmania RNA virus: when the host pays the toll*. Front Cell Infect Microbiol, 2012. **2**: p. 99.
544. Beiting, D.P., *Protozoan parasites and type I interferons: a cold case reopened*. Trends Parasitol, 2014. **30**(10): p. 491-8.
545. Dorlo, T.P., et al., *Failure of miltefosine in visceral leishmaniasis is associated with low drug exposure*. J Infect Dis, 2014. **210**(1): p. 146-53.
546. Newton, P.N., M.D. Green, and F.M. Fernandez, *Impact of poor-quality medicines in the 'developing' world*. Trends Pharmacol Sci, 2010. **31**(3): p. 99-101.
547. Alicia Ponte-Sucre, E.D.M.P.-N., *The Concept of Fitness and Drug Resistance in Leishmania*, in *Drug Resistance in Leishmania Parasites - Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments*, A.P.-S.E.D.a.M. Padro'n-Nieves, Editor. 2013, Springer, Vienna. p. pp 431-449.
548. Alvar, J., et al., *The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years*. Clin Microbiol Rev, 2008. **21**(2): p. 334-59, table of contents.
549. van Griensven, J., et al., *Leishmaniasis in immunosuppressed individuals*. Clin Microbiol Infect, 2014. **20**(4): p. 286-99.
550. Perry, M.R., et al., *Chronic exposure to arsenic in drinking water can lead to resistance to antimonial drugs in a mouse model of visceral leishmaniasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(49): p. 19932-7.
551. Dey, S., et al., *High level arsenite resistance in Leishmania tarentolae is mediated by an active extrusion system*. Mol Biochem Parasitol, 1994. **67**(1): p. 49-57.
552. Marquis, N., et al., *Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant Leishmania*. Mol Microbiol, 2005. **57**(6): p. 1690-9.

## Références bibliographiques

553. Monte-Neto, R., et al., *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): p. e0003476.
554. Leprohon, P., et al., *Drug resistance analysis by next generation sequencing in Leishmania*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist, 2015. **5**(1): p. 26-35.
555. Mukherjee, A., et al., *Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of Leishmania donovani*. J Antimicrob Chemother, 2007. **59**(2): p. 204-11.
556. Legare, D., et al., *ABC proteins of Leishmania*. J Bioenerg Biomembr, 2001. **33**(6): p. 469-74.
557. Balber, A.E., *The pellicle and the membrane of the flagellum, flagellar adhesion zone, and flagellar pocket: functionally discrete surface domains of the bloodstream form of African trypanosomes*. Crit Rev Immunol, 1990. **10**(3): p. 177-201.
558. Webster, P. and D.G. Russell, *The flagellar pocket of trypanosomatids*. Parasitol Today, 1993. **9**(6): p. 201-6.
559. Douanne, N., et al., *MRPA-independent mechanisms of antimony resistance in Leishmania infantum*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist, 2020. **13**: p. 28-37.
560. Decuypere, S., et al., *Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in Leishmania donovani isolates from Nepal*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(11): p. 4616-21.
561. Mandal, G., et al., *Functionality of drug efflux pumps in antimonial resistant Leishmania donovani field isolates*. Indian J Biochem Biophys, 2009. **46**(1): p. 86-92.
562. Ariyanayagam, M.R. and A.H. Fairlamb, *Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids*. Mol Biochem Parasitol, 2001. **115**(2): p. 189-98.
563. Vergnes, B., et al., *A single amino acid substitution (H451Y) in Leishmania calcium-dependent kinase SCAMK confers high tolerance and resistance to antimony*. J Antimicrob Chemother, 2019. **74**(11): p. 3231-3239.
564. Garg, M. and N. Goyal, *MAPK1 of Leishmania donovani modulates antimony susceptibility by downregulating P-glycoprotein efflux pumps*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(7): p. 3853-63.
565. Ashutosh, et al., *Downregulation of mitogen-activated protein kinase 1 of Leishmania donovani field isolates is associated with antimony resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(1): p. 518-25.
566. Choudhury, K., et al., *Identification of a Leishmania infantum gene mediating resistance to miltefosine and SbIII*. Int J Parasitol, 2008. **38**(12): p. 1411-23.
567. Rugani, J.N., et al., *Antimony resistance in Leishmania (Viannia) braziliensis clinical isolates from atypical lesions associates with increased ARM56/ARM58 transcripts and reduced drug uptake*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2019. **114**: p. e190111.
568. Chen, F., et al., *Identification of a novel fused gene family implicates convergent evolution in eukaryotic calcium signaling*. BMC Genomics, 2018. **19**(1): p. 306.
569. Ouakad, M., et al., *Increased metacyclogenesis of antimony-resistant Leishmania donovani clinical lines*. Parasitology, 2011. **138**(11): p. 1392-9.
570. Sundar, S., *Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis*. Trop Med Int Health, 2001. **6**(11): p. 849-54.

## Références bibliographiques

571. Basselin, M., et al., *Resistance to pentamidine in Leishmania mexicana involves exclusion of the drug from the mitochondrion*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(12): p. 3731-8.
572. Coelho, A.C., et al., *Intracellular location of the ABC transporter PRP1 related to pentamidine resistance in Leishmania major*. Mol Biochem Parasitol, 2006. **150**(2): p. 378-83.
573. Gallis, H.A., R.H. Drew, and W.W. Pickard, *Amphotericin B: 30 years of clinical experience*. Rev Infect Dis, 1990. **12**(2): p. 308-29.
574. Alvar, J., S. Croft, and P. Olliaro, *Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis*. Adv Parasitol, 2006. **61**: p. 223-74.
575. Young, L.Y., C.M. Hull, and J. Heitman, *Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in Candida lusitanae*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(9): p. 2717-24.
576. Purkait, B., et al., *Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of Leishmania donovani*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(2): p. 1031-41.
577. Mbongo, N., et al., *Mechanism of amphotericin B resistance in Leishmania donovani promastigotes*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(2): p. 352-7.
578. Al-Mohammed, H.I., M.L. Chance, and P.A. Bates, *Production and characterization of stable amphotericin-resistant amastigotes and promastigotes of Leishmania mexicana*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(8): p. 3274-80.
579. De Stasio, E.A., et al., *Mutations in 16S ribosomal RNA disrupt antibiotic--RNA interactions*. EMBO J, 1989. **8**(4): p. 1213-6.
580. Maeda, K., et al., *Isolation of paromamine inactivated by Pseudomonas aeruginosa*. J Antibiot (Tokyo), 1968. **21**(7): p. 458-9.
581. Maarouf, M., et al., *Development and characterization of paromomycin-resistant Leishmania donovani promastigotes*. Parasite, 1998. **5**(2): p. 167-73.
582. Bhandari, V., et al., *Elucidation of cellular mechanisms involved in experimental paromomycin resistance in Leishmania donovani*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(5): p. 2580-5.
583. Jain, R., et al., *Leishmania cell surface prohibitin: role in host-parasite interaction*. Cell Microbiol, 2010. **12**(4): p. 432-52.
584. Welburn, S.C. and N.B. Murphy, *Prohibitin and RACK homologues are up-regulated in trypanosomes induced to undergo apoptosis and in naturally occurring terminally differentiated forms*. Cell Death Differ, 1998. **5**(7): p. 615-22.
585. Yasur-Landau, D., et al., *Allopurinol Resistance in Leishmania infantum from Dogs with Disease Relapse*. PLoS Negl Trop Dis, 2016. **10**(1): p. e0004341.
586. Solano-Gallego, L., et al., *LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis*. Parasit Vectors, 2011. **4**: p. 86.
587. Manna, L., et al., *Long-term follow-up of dogs with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol*. Parasit Vectors, 2015. **8**: p. 289.
588. Yasur-Landau, D., et al., *Resistance of Leishmania infantum to allopurinol is associated with chromosome and gene copy number variations including decrease in the S-*

## Références bibliographiques

- adenosylmethionine synthetase (METK) gene copy number*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 2018. **8**(3): p. 403-410.
589. Reguera, R.M., et al., *Cloning expression and characterization of methionine adenosyltransferase in Leishmania infantum promastigotes*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(5): p. 3158-67.
590. Reguera, R.M., et al., *S-Adenosylmethionine in protozoan parasites: functions, synthesis and regulation*. *Mol Biochem Parasitol*, 2007. **152**(1): p. 1-10.
591. Srivastava, S., et al., *Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India*. *Parasit Vectors*, 2017. **10**(1): p. 49.
592. Shaw, C.D., et al., *In vitro selection of miltefosine resistance in promastigotes of Leishmania donovani from Nepal: genomic and metabolomic characterization*. *Mol Microbiol*, 2016. **99**(6): p. 1134-48.
593. Perez-Victoria, J.M., et al., *Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant Leishmania tropica and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001. **45**(9): p. 2468-74.
594. Armitage, E.G., et al., *Complex Interplay between Sphingolipid and Sterol Metabolism Revealed by Perturbations to the Leishmania Metabolome Caused by Miltefosine*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018. **62**(5).
595. Mishra, J. and S. Singh, *Miltefosine resistance in Leishmania donovani involves suppression of oxidative stress-induced programmed cell death*. *Exp Parasitol*, 2013. **135**(2): p. 397-406.
596. Das, M., et al., *Miltefosine-unresponsive Leishmania donovani has a greater ability than miltefosine-responsive L. donovani to resist reactive oxygen species*. *FEBS J*, 2013. **280**(19): p. 4807-15.
597. Deep, D.K., et al., *Increased miltefosine tolerance in clinical isolates of Leishmania donovani is associated with reduced drug accumulation, increased infectivity and resistance to oxidative stress*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017. **11**(6): p. e0005641.
598. Carnielli, J.B., et al., *Proteomic analysis of the soluble proteomes of miltefosine-sensitive and -resistant Leishmania infantum chagasi isolates obtained from Brazilian patients with different treatment outcomes*. *J Proteomics*, 2014. **108**: p. 198-208.
599. Travi, B.L. and G. Miro, *Use of domperidone in canine visceral leishmaniasis: gaps in veterinary knowledge and epidemiological implications*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2018. **113**(11): p. e180301.
600. Stearns, S.C., *Life history evolution: successes, limitations, and prospects*. *Naturwissenschaften*, 2000. **87**(11): p. 476-86.
601. Orr, H.A., *Fitness and its role in evolutionary genetics*. *Nat Rev Genet*, 2009. **10**(8): p. 531-9.
602. Borrell, S. and S. Gagneux, *Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2009. **13**(12): p. 1456-66.
603. Natera, S., et al., *Leishmania spp.: proficiency of drug-resistant parasites*. *Int J Antimicrob Agents*, 2007. **29**(6): p. 637-42.
604. M.Beverley, S., *Chapter 6 - Genetic and genomic approaches to the analysis of Leishmania virulence*, in *Molecular Medical Parasitology*, T.W.N.a.R.W.K. J. Joseph Marr, Editor. 2003. p. 111-122.

## Références bibliographiques

605. Geretti, A.M., *The clinical significance of viral fitness*. J HIV Ther, 2005. **10**(1): p. 6-10.
606. Hogberg, L.D., A. Heddini, and O. Cars, *The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances*. Trends Pharmacol Sci, 2010. **31**(11): p. 509-15.
607. Gagneux, S., et al., *The competitive cost of antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis*. Science, 2006. **312**(5782): p. 1944-6.
608. Sereno, D., et al., *Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotype during the in vitro life cycle of Leishmania infantum: implications for the spread of chemoresistance in endemic areas*. Acta Trop, 2001. **80**(3): p. 195-205.
609. Agnew, P., et al., *In vitro growth of Leishmania amazonensis promastigotes resistant to pentamidine is dependent on interactions among strains*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(6): p. 1928-9.
610. Vanaerschot, M., et al., *Antimonial resistance in Leishmania donovani is associated with increased in vivo parasite burden*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23120.
611. Lee, H.H., et al., *Bacterial charity work leads to population-wide resistance*. Nature, 2010. **467**(7311): p. 82-5.
612. William, S., et al., *Stability and reproductive fitness of Schistosoma mansoni isolates with decreased sensitivity to praziquantel*. Int J Parasitol, 2001. **31**(10): p. 1093-100.
613. Peyron, F., et al., *Fitness of Toxoplasma gondii is not related to DHFR single-nucleotide polymorphism during congenital toxoplasmosis*. Int J Parasitol, 2004. **34**(10): p. 1169-75.
614. Hastings, I.M. and M.J. Donnelly, *The impact of antimalarial drug resistance mutations on parasite fitness, and its implications for the evolution of resistance*. Drug Resist Updat, 2005. **8**(1-2): p. 43-50.
615. Garcia-Hernandez, R., et al., *Fitness of Leishmania donovani parasites resistant to drug combinations*. PLoS Negl Trop Dis, 2015. **9**(4): p. e0003704.
616. Whitaker, J.W., G.A. McConkey, and D.R. Westhead, *The transferome of metabolic genes explored: analysis of the horizontal transfer of enzyme encoding genes in unicellular eukaryotes*. Genome Biol, 2009. **10**(4): p. R36.
617. Akiba, T., et al., *On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of Shigella*. Jpn J Microbiol, 1960. **4**: p. 219-27.
618. Syvanen, M., *Cross-species gene transfer; implications for a new theory of evolution*. J Theor Biol, 1985. **112**(2): p. 333-43.
619. McInnes, R.S., et al., *Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome*. Curr Opin Microbiol, 2020. **53**: p. 35-43.
620. Hegstad, K., et al., *Role of Horizontal Gene Transfer in the Development of Multidrug Resistance in Haemophilus influenzae*. mSphere, 2020. **5**(1).
621. Golz, J.C. and K. Stingl, *Natural Competence and Horizontal Gene Transfer in Campylobacter*. Curr Top Microbiol Immunol, 2021. **431**: p. 265-292.
622. Awanish Kumar, S.C.P.a.M.S., *Slow pace of antileishmanial drug development*. Parasitology Open, 2018. **Volume 4**.
623. Zhang, W., J. Pei, and L. Lai, *Computational Multitarget Drug Design*. J Chem Inf Model, 2017. **57**(3): p. 403-412.
624. Brogi, S., et al., *Editorial: In silico Methods for Drug Design and Discovery*. Front Chem, 2020. **8**: p. 612.

## Références bibliographiques

625. Koutsoukas, A., et al., *From in silico target prediction to multi-target drug design: current databases, methods and applications*. J Proteomics, 2011. **74**(12): p. 2554-74.
626. Bora, N. and A.N. Jha, *In silico Metabolic Pathway Analysis Identifying Target Against Leishmaniasis - A Kinetic Modeling Approach*. Front Genet, 2020. **11**: p. 179.
627. Ogungbe, I.V., J.D. Ng, and W.N. Setzer, *Interactions of antiparasitic alkaloids with Leishmania protein targets: a molecular docking analysis*. Future Med Chem, 2013. **5**(15): p. 1777-99.
628. Lorenzo, V.P., et al., *Structure- and Ligand-Based Approaches to Evaluate Aporphynic Alkaloids from Annonaceae as Multi-Target Agent Against Leishmania donovani*. Curr Pharm Des, 2016. **22**(34): p. 5196-5203.
629. . Improving and Accelerating Therapeutic Development for Nervous System Disorders: Workshop Summary. 2014, Washington (DC).
630. Wu, Z., et al., *Network-Based Methods for Prediction of Drug-Target Interactions*. Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 1134.
631. Madani Tonekaboni, S.A., et al., *Predictive approaches for drug combination discovery in cancer*. Brief Bioinform, 2018. **19**(2): p. 263-276.
632. Magalingam, K.B., et al., *Current Concepts of Neurodegenerative Mechanisms in Alzheimer's Disease*. Biomed Res Int, 2018. **2018**: p. 3740461.
633. Tavares, J., et al., *Differential effects of polyamine derivative compounds against Leishmania infantum promastigotes and axenic amastigotes*. Int J Parasitol, 2005. **35**(6): p. 637-46.
634. Vannier-Santos, M.A., et al., *The putrescine analogue 1,4-diamino-2-butanone affects polyamine synthesis, transport, ultrastructure and intracellular survival in Leishmania amazonensis*. Microbiology (Reading), 2008. **154**(Pt 10): p. 3104-3111.
635. Roberts, S.C., et al., *Leishmania donovani polyamine biosynthetic enzyme overproducers as tools to investigate the mode of action of cytotoxic polyamine analogs*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(2): p. 438-45.
636. Kandpal, M., et al., *Correlation between inhibition of growth and arginine transport of Leishmania donovani promastigotes in vitro by diamidines*. Life Sci, 1996. **59**(7): p. PL75-80.
637. Heby, O., L. Persson, and M. Rentala, *Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis*. Amino Acids, 2007. **33**(2): p. 359-66.
638. Coward, J.K. and A.E. Pegg, *Specific multisubstrate adduct inhibitors of aminopropyltransferases and their effect on polyamine biosynthesis in cultured cells*. Adv Enzyme Regul, 1987. **26**: p. 107-13.
639. Khomutov, A.R., *Inhibition of enzymes of polyamine biosynthesis by substrate-like O-substituted hydroxylamines*. Biochemistry (Mosc), 2002. **67**(10): p. 1159-67.
640. Manhas, R., et al., *Identification and functional characterization of a novel bacterial type asparagine synthetase A: a tRNA synthetase paralog from Leishmania donovani*. J Biol Chem, 2014. **289**(17): p. 12096-12108.
641. Singh, J., et al., *L-Asparaginase of Leishmania donovani: Metabolic target and its role in Amphotericin B resistance*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist, 2017. **7**(3): p. 337-349.

## Références bibliographiques

642. Mukherjee, S., et al., *Sterol methyltransferase is required for optimal mitochondrial function and virulence in Leishmania major*. Mol Microbiol, 2019. **111**(1): p. 65-81.
643. Vannier-Santos, M.A., et al., *Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in Leishmania*. J Eukaryot Microbiol, 1995. **42**(4): p. 337-46.
644. Al-Abdely, H.M., et al., *Efficacy of the triazole SCH 56592 against Leishmania amazonensis and Leishmania donovani in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniasis*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(12): p. 2910-4.
645. Lorente, S.O., et al., *Novel azasterols as potential agents for treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(8): p. 2937-50.
646. Fernandes Rodrigues, J.C., et al., *In vitro activities of ER-119884 and E5700, two potent squalene synthase inhibitors, against Leishmania amazonensis: antiproliferative, biochemical, and ultrastructural effects*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(11): p. 4098-114.
647. Yamamoto, E.S., et al., *Tolnaftate inhibits ergosterol production and impacts cell viability of Leishmania sp.* Bioorg Chem, 2020. **102**: p. 104056.
648. Meslin, B., et al., *Are protozoan metacaspases potential parasite killers?* Parasit Vectors, 2011. **4**: p. 26.
649. Gonzalez, I.J., et al., *Leishmania major metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity*. Int J Parasitol, 2007. **37**(2): p. 161-72.
650. Booth, R.G., et al., *Quantitative structure-activity relationship of triazine-antifolate inhibition of Leishmania dihydrofolate reductase and cell growth*. J Med Chem, 1987. **30**(7): p. 1218-24.
651. Wang, J., et al., *Pterin and folate reduction by the Leishmania tarentolae H locus short-chain dehydrogenase/reductase PTR1*. Arch Biochem Biophys, 1997. **342**(2): p. 197-202.
652. Cunningham, M.L. and S.M. Beverley, *Pteridine salvage throughout the Leishmania infectious cycle: implications for antifolate chemotherapy*. Mol Biochem Parasitol, 2001. **113**(2): p. 199-213.
653. Sezavar, M., et al., *The potential therapeutic role of PTR1 gene in non-healing anthroponotic cutaneous leishmaniasis due to Leishmania tropica*. J Clin Lab Anal, 2021. **35**(3): p. e23670.
654. Varma, M.V., et al., *P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement*. Pharmacol Res, 2003. **48**(4): p. 347-59.
655. Krishna, R. and L.D. Mayer, *Modulation of P-glycoprotein (PGP) mediated multidrug resistance (MDR) using chemosensitizers: recent advances in the design of selective MDR modulators*. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2001. **1**(2): p. 163-74.
656. McKeegan, K.S., M.I. Borges-Walmsley, and A.R. Walmsley, *Structural understanding of efflux-mediated drug resistance: potential routes to efflux inhibition*. Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(5): p. 479-86.
657. Werle, M., *Natural and synthetic polymers as inhibitors of drug efflux pumps*. Pharm Res, 2008. **25**(3): p. 500-11.
658. Dumas, C., et al., *Disruption of the trypanothione reductase gene of Leishmania decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages*. EMBO J, 1997. **16**(10): p. 2590-8.

## Références bibliographiques

659. Kumar, S., M.R. Ali, and S. Bawa, *Mini review on tricyclic compounds as an inhibitor of trypanothione reductase*. J Pharm Bioallied Sci, 2014. **6**(4): p. 222-8.
660. Wang, J.C., *Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(6): p. 430-40.
661. Das, A., et al., *Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets*. Trends Parasitol, 2004. **20**(8): p. 381-7.
662. Alves, F., et al., *Recent Development of Visceral Leishmaniasis Treatments: Successes, Pitfalls, and Perspectives*. Clin Microbiol Rev, 2018. **31**(4).
663. Amlabu, W.E., et al., *Elucidating the possible mechanism of action of some pathogen box compounds against Leishmania donovani*. PLoS Negl Trop Dis, 2020. **14**(4): p. e0008188.
664. Tadele, M., et al., *Leishmania donovani Growth Inhibitors from Pathogen Box Compounds of Medicine for Malaria Venture*. Drug Des Devel Ther, 2020. **14**: p. 1307-1317.
665. Lopez-Arencibia, A., et al., *Discovery of New Chemical Tools against Leishmania amazonensis via the MMV Pathogen Box*. Pharmaceuticals (Basel), 2021. **14**(12).
666. Ullah, I., et al., *An Antiparasitic Compound from the Medicines for Malaria Venture Pathogen Box Promotes Leishmania Tubulin Polymerization*. ACS Infect Dis, 2020. **6**(8): p. 2057-2072.
667. Garcia-Salcedo, J.A., et al., *New Approaches to Overcome Transport Related Drug Resistance in Trypanosomatid Parasites*. Front Pharmacol, 2016. **7**: p. 351.
668. Perez-Victoria, J.M., et al., *Sitamaquine overcomes ABC-mediated resistance to miltefosine and antimony in Leishmania*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(8): p. 3838-44.
669. Kumar, G.A., et al., *Statin-induced chronic cholesterol depletion inhibits Leishmania donovani infection: Relevance of optimum host membrane cholesterol*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1858**(9): p. 2088-2096.
670. Wong, I.L., et al., *Flavonoid dimers as bivalent modulators for pentamidine and sodium stibogluconate resistance in leishmania*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(3): p. 930-40.
671. Khalil, N.M., et al., *Nanotechnological strategies for the treatment of neglected diseases*. Curr Pharm Des, 2013. **19**(41): p. 7316-29.
672. Pham, T.T., P.M. Loiseau, and G. Barratt, *Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments*. Int J Pharm, 2013. **454**(1): p. 539-52.
673. Singodia, D., et al., *Development and performance evaluation of amphotericin B transfersomes against resistant and sensitive clinical isolates of visceral leishmaniasis*. J Biomed Nanotechnol, 2010. **6**(3): p. 293-302.
674. Bhattacharya, P., et al., *In Vitro susceptibilities of wild and drug resistant Leishmania donovani amastigotes to piperolactam A loaded hydroxypropyl-beta-cyclodextrin nanoparticles*. Acta Trop, 2016. **158**: p. 97-106.
675. Mondal, S., et al., *In vitro susceptibilities of wild and drug resistant leishmania donovani amastigote stages to andrographolide nanoparticle: role of vitamin E derivative TPGS for nanoparticle efficacy*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e81492.
676. Jaspreet K. Vasir, M.K.R.a.V.D.L., *Nanosystems in Drug Targeting: Opportunities and Challenges*. Current Nanoscience, 2005. **Volume 1**( Issue 1): p. [47 - 64].
677. Croft, S.L. and G.H. Coombs, *Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs*. Trends Parasitol, 2003. **19**(11): p. 502-8.

## Références bibliographiques

678. Mundargi, R.C., et al., *Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives*. J Control Release, 2008. **125**(3): p. 193-209.
679. Calixto, J.B., *The role of natural products in modern drug discovery*. An Acad Bras Cienc, 2019. **91 Suppl 3**: p. e20190105.
680. Ekor, M., *The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety*. Front Pharmacol, 2014. **4**: p. 177.
681. Tariq, A., et al., *Ethnomedicines and anti-parasitic activities of Pakistani medicinal plants against Plasmodia and Leishmania parasites*. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2016. **15**(1): p. 52.
682. Kashif Hussain, R.Z.A., Asghar Abbas, Muhammad Asif Raza, Muhammad Shahid Mahmood, Muhammad Imran, Muhammad Kasib Khan & Muhammad Rafay, *Therapeutic potential of medicinal plants against Leishmaniasis: a public health concern. [Potencial terapéutico de plantas medicinales contra la Leishmaniasis: Un problema de salud pública]*. blacpma.ms-editions, 2021.
683. Cheuka, P.M., et al., *The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases*. Molecules, 2016. **22**(1).
684. Ndjonka, D., et al., *Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(2): p. 3395-439.
685. Oryan, A., *Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis*. Iran J Vet Res, 2015. **16**(1): p. 1-19.
686. Moraes Neto, R.N., et al., *Asteraceae Plants as Sources of Compounds Against Leishmaniasis and Chagas Disease*. Front Pharmacol, 2019. **10**: p. 477.
687. Karampetsou, K., et al., *Total Phenolic Fraction (TPF) from Extra Virgin Olive Oil: Induction of apoptotic-like cell death in Leishmania spp. promastigotes and in vivo potential of therapeutic immunomodulation*. PLoS Negl Trop Dis, 2021. **15**(1): p. e0008968.
688. Harborne, J.B., *Nature, distribution and function of plant flavonoids*. Prog Clin Biol Res, 1986. **213**: p. 15-24.
689. Chan, K.F., et al., *Amine linked flavonoid dimers as modulators for P-glycoprotein-based multidrug resistance: structure-activity relationship and mechanism of modulation*. J Med Chem, 2012. **55**(5): p. 1999-2014.
690. Carter, N.S., et al., *Natural Products That Target the Arginase in Leishmania Parasites Hold Therapeutic Promise*. Microorganisms, 2021. **9**(2).
691. Khademvatan, S., et al., *In silico and in vitro comparative activity of green tea components against Leishmania infantum*. J Glob Antimicrob Resist, 2019. **18**: p. 187-194.
692. Mercado-Camargo, J., et al., *Homology Modeling of Leishmanolysin (gp63) from Leishmania panamensis and Molecular Docking of Flavonoids*. ACS Omega, 2020. **5**(24): p. 14741-14749.
693. Sasidharan, S. and P. Saudagar, *Flavones reversibly inhibit Leishmania donovani tyrosine aminotransferase by binding to the catalytic pocket: An integrated in silico-in vitro approach*. Int J Biol Macromol, 2020. **164**: p. 2987-3004.
694. Pretzel, J., et al., *Antiparasitic peptides*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2013. **135**: p. 157-92.

## Références bibliographiques

695. Mehta, D., et al., *ParaPep: a web resource for experimentally validated antiparasitic peptide sequences and their structures*. Database (Oxford), 2014. **2014**.
696. Vlieghe, P., et al., *Synthetic therapeutic peptides: science and market*. Drug Discov Today, 2010. **15**(1-2): p. 40-56.
697. Almeida, J.R., et al., *A novel synthetic peptide inspired on Lys49 phospholipase A2 from *Crotalus oreganus abyssus* snake venom active against multidrug-resistant clinical isolates*. Eur J Med Chem, 2018. **149**: p. 248-256.
698. Costa, F., et al., *Clinical Application of AMPs*. Adv Exp Med Biol, 2019. **1117**: p. 281-298.
699. Robles-Loaiza, A.A., et al., *Peptides to Tackle Leishmaniasis: Current Status and Future Directions*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(9).
700. Zhao, Y. and Y.H. Lin, *Whole-cell protein identification using the concept of unique peptides*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2010. **8**(1): p. 33-41.
701. Berrocal-Lobo, M., et al., *Leishmania donovani: thionins, plant antimicrobial peptides with leishmanicidal activity*. Exp Parasitol, 2009. **122**(3): p. 247-9.
702. Hernandez, C., et al., *Functional and structural damage in *Leishmania mexicana* exposed to the cationic peptide dermaseptin*. Eur J Cell Biol, 1992. **59**(2): p. 414-24.
703. Maroti, G., et al., *Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals*. Res Microbiol, 2011. **162**(4): p. 363-74.
704. Azmi, F., M. Skwarczynski, and I. Toth, *Towards the Development of Synthetic Antibiotics: Designs Inspired by Natural Antimicrobial Peptides*. Curr Med Chem, 2016. **23**(41): p. 4610-4624.
705. Liu, S., et al., *Computational resources and tools for antimicrobial peptides*. J Pept Sci, 2017. **23**(1): p. 4-12.
706. Deslouches, B., et al., *Comparative functional properties of engineered cationic antimicrobial peptides consisting exclusively of tryptophan and either lysine or arginine*. J Med Microbiol, 2016. **65**(6): p. 554-565.
707. Ojeda, P.G., et al., *Lysine to arginine mutagenesis of chlorotoxin enhances its cellular uptake*. Biopolymers, 2017. **108**(5).
708. Chen, Y., et al., *Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(4): p. 1398-406.
709. Luque-Ortega, J.R., et al., *Defeating *Leishmania* resistance to miltefosine (hexadecylphosphocholine) by peptide-mediated drug smuggling: a proof of mechanism for trypanosomatid chemotherapy*. J Control Release, 2012. **161**(3): p. 835-42.
710. Defaus, S., et al., *A Synthetic Strategy for Conjugation of Paromomycin to Cell-Penetrating Tat(48-60) for Delivery and Visualization into *Leishmania* Parasites*. Int J Pept, 2017. **2017**: p. 4213037.
711. Koczan, G., et al., *Methotrexate conjugate with branched polypeptide influences *Leishmania donovani* infection in vitro and in experimental animals*. Bioconjug Chem, 2002. **13**(3): p. 518-24.
712. Sundar, S., et al., *New treatment approach in Indian visceral leishmaniasis: single-dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine*. Clin Infect Dis, 2008. **47**(8): p. 1000-6.
713. Bryceson, A., *A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance*. Trop Med Int Health, 2001. **6**(11): p. 928-34.

## Références bibliographiques

714. Uliana, S.R.B., C.T. Trinconi, and A.C. Coelho, *Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges*. *Parasitology*, 2018. **145**(4): p. 464-480.
715. van Griensven, J., et al., *Combination therapy for visceral leishmaniasis*. *Lancet Infect Dis*, 2010. **10**(3): p. 184-94.
716. Organization, W.H., *Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the World Health Organization Expert Committee on the Control of Leishmaniases*. . 2010. p. 1–186.
717. Carregal, V.M., et al., *Combination oral therapy against Leishmania amazonensis infection in BALB/c mice using nanoassemblies made from amphiphilic antimony(V) complex incorporating miltefosine*. *Parasitol Res*, 2019. **118**(10): p. 3077-3084.
718. Goncalves-Oliveira, L.F., et al., *The combination therapy of meglumine antimoniate and oxiranes (epoxy-alpha-lapachone and epoxymethyl-lawsonone) enhance the leishmanicidal effect in mice infected by Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 2019. **10**: p. 101-108.
719. Bahrami, S., A. Oryan, and E. Bemani, *Efficacy of amiodarone and voriconazole combination therapy in cutaneous leishmaniasis in the mice experimentally infected with Leishmania major*. *J Infect Chemother*, 2021. **27**(7): p. 984-990.
720. Bemani, E., A. Oryan, and S. Bahrami, *Effectiveness of amiodarone in treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania major*. *Exp Parasitol*, 2019. **205**: p. 107747.
721. Pinto, E.G. and A.G. Tempone, *Activity of the antiarrhythmic drug amiodarone against Leishmania (L.) infantum: an in vitro and in vivo approach*. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 2018. **24**: p. 29.
722. Ahmad Oryan, S.B., Effat Bemani, *Efficacy of voriconazole on leishmaniasis by Leishmania major: An in vitro and in vivo study*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2018.
723. Valdivieso, E., et al., *Potentiation of the leishmanicidal activity of nelfinavir in combination with miltefosine or amphotericin B*. *Int J Antimicrob Agents*, 2018. **52**(5): p. 682-687.
724. Rebello, K.M., et al., *Miltefosine-Lopinavir Combination Therapy Against Leishmania infantum Infection: In vitro and in vivo Approaches*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019. **9**: p. 229.
725. Nosengo, N., *Can you teach old drugs new tricks?* *Nature*, 2016. **534**(7607): p. 314-6.
726. Kaiser, M., et al., *Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning*. *PLoS One*, 2015. **10**(8): p. e0135556.
727. Andrade-Neto, V.V., et al., *Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2018. **23**: p. 967-996.
728. Charlton, R.L., et al., *Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art*. *Parasitology*, 2018. **145**(2): p. 219-236.
729. Balana-Fouce, R., et al., *Indotecan (LMP400) and AM13-55: two novel indenoisoquinolines show potential for treating visceral leishmaniasis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012. **56**(10): p. 5264-70.
730. Prada, C.F., et al., *Gimatecan and other camptothecin derivatives poison Leishmania DNA-topoisomerase IB leading to a strong leishmanicidal effect*. *Biochem Pharmacol*, 2013. **85**(10): p. 1433-40.
731. Sharlow, E.R., et al., *Auranofin is an apoptosis-simulating agent with in vitro and in vivo anti-leishmanial activity*. *ACS Chem Biol*, 2014. **9**(3): p. 663-72.

## Références bibliographiques

732. Shoop, W.L., et al., *Discovery and mode of action of afoxolaner, a new isoxazoline parasiticide for dogs*. Vet Parasitol, 2014. **201**(3-4): p. 179-89.
733. Gassel, M., et al., *The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: selective inhibition of arthropod gamma-aminobutyric acid- and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity*. Insect Biochem Mol Biol, 2014. **45**: p. 111-24.
734. Miglianico, M., et al., *Repurposing isoxazoline veterinary drugs for control of vector-borne human diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(29): p. E6920-E6926.
735. Boireau, W. and C. Elie-Caille, *[Extracellular vesicles: Definition, isolation and characterization]*. Med Sci (Paris), 2021. **37**(12): p. 1092-1100.
736. Thery, C., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines*. J Extracell Vesicles, 2018. **7**(1): p. 1535750.
737. Chargaff, E. and R. West, *The biological significance of the thromboplastic protein of blood*. J Biol Chem, 1946. **166**(1): p. 189-97.
738. Wolf, P., *The nature and significance of platelet products in human plasma*. Br J Haematol, 1967. **13**(3): p. 269-88.
739. Hargett, L.A. and N.N. Bauer, *On the origin of microparticles: From "platelet dust" to mediators of intercellular communication*. Pulm Circ, 2013. **3**(2): p. 329-40.
740. Crawford, N., *The presence of contractile proteins in platelet microparticles isolated from human and animal platelet-free plasma*. Br J Haematol, 1971. **21**(1): p. 53-69.
741. Couch, Y., et al., *A brief history of nearly EV-erything - The rise and rise of extracellular vesicles*. J Extracell Vesicles, 2021. **10**(14): p. e12144.
742. Harding, C., J. Heuser, and P. Stahl, *Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes*. J Cell Biol, 1983. **97**(2): p. 329-39.
743. Pan, B.T. and R.M. Johnstone, *Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor*. Cell, 1983. **33**(3): p. 967-78.
744. Johnstone, R.M., et al., *Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins*. J Cell Physiol, 1991. **147**(1): p. 27-36.
745. Smalley, J.W. and A.J. Birss, *Trypsin-like enzyme activity of the extracellular membrane vesicles of Bacteroides gingivalis W50*. J Gen Microbiol, 1987. **133**(10): p. 2883-94.
746. Smalley, J.W., A.J. Birss, and C.A. Shuttleworth, *The degradation of type I collagen and human plasma fibronectin by the trypsin-like enzyme and extracellular membrane vesicles of Bacteroides gingivalis W50*. Arch Oral Biol, 1988. **33**(5): p. 323-9.
747. Kay, H.M., A.J. Birss, and J.W. Smalley, *Interaction of extracellular vesicles of Bacteroides gingivalis W50 with human polymorphonuclear leucocytes*. FEMS Microbiol Lett, 1990. **60**(1-2): p. 69-73.
748. Lee, Y.J., et al., *Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias*. Thromb Res, 1993. **72**(4): p. 295-304.
749. Singh, N., et al., *Elevated platelet-derived microparticle levels during unstable angina*. Can J Cardiol, 1995. **11**(11): p. 1015-21.
750. Iida, K., M.B. Whitlow, and V. Nussenzweig, *Membrane vesiculation protects erythrocytes from destruction by complement*. J Immunol, 1991. **147**(8): p. 2638-42.

## Références bibliographiques

751. Johnstone, R.M., A. Bianchini, and K. Teng, *Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions*. Blood, 1989. **74**(5): p. 1844-51.
752. Roy, S., F.H. Hochberg, and P.S. Jones, *Extracellular vesicles: the growth as diagnostics and therapeutics; a survey*. J Extracell Vesicles, 2018. **7**(1): p. 1438720.
753. Bazzan, E., et al., *Critical Review of the Evolution of Extracellular Vesicles' Knowledge: From 1946 to Today*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(12).
754. Denzer, K., et al., *Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 19**: p. 3365-74.
755. Scharzt, N.E., et al., *From the antigen-presenting cell to the antigen-presenting vesicle: the exosomes*. Curr Opin Mol Ther, 2002. **4**(4): p. 372-81.
756. They, C., et al., *Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7309-18.
757. Hartjes, T.A., et al., *Extracellular Vesicle Quantification and Characterization: Common Methods and Emerging Approaches*. Bioengineering (Basel), 2019. **6**(1).
758. Usman, W.M., et al., *Efficient RNA drug delivery using red blood cell extracellular vesicles*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2359.
759. Crivelli, B., et al., *Mesenchymal stem/stromal cell extracellular vesicles: From active principle to next generation drug delivery system*. J Control Release, 2017. **262**: p. 104-117.
760. Lotvall, J., et al., *Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**: p. 26913.
761. Witwer, K.W., et al., *Updating MISEV: Evolving the minimal requirements for studies of extracellular vesicles*. J Extracell Vesicles, 2021. **10**(14): p. e12182.
762. Silverman, J.M. and N.E. Reiner, *Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes*. Cell Microbiol, 2011. **13**(1): p. 1-9.
763. E, S., *Fadenförmige Anhängsel bei den Trypanosomen*. Zentralbl Bakteriol, 1912. **vol. 65**: p. p. 79-83.
764. Sanwlani, R. and L. Gangoda, *Role of Extracellular Vesicles in Cell Death and Inflammation*. Cells, 2021. **10**(10).
765. Yanez-Mo, M., et al., *Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions*. J Extracell Vesicles, 2015. **4**: p. 27066.
766. Raposo, G. and W. Stoorvogel, *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. J Cell Biol, 2013. **200**(4): p. 373-83.
767. Di Daniele, A., Y. Antonucci, and S. Campello, *Migrasomes, new vesicles as Hansel and Gretel white pebbles?* Biol Direct, 2022. **17**(1): p. 8.
768. van Niel, G., G. D'Angelo, and G. Raposo, *Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(4): p. 213-228.
769. Andreu, Z. and M. Yanez-Mo, *Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 442.
770. de Gassart, A., et al., *Lipid raft-associated protein sorting in exosomes*. Blood, 2003. **102**(13): p. 4336-44.

## Références bibliographiques

771. Ghossoub, R., et al., [*Tetraspanins and syndecans: Partners in crime for 'dealing' exosomes?*]. *Med Sci (Paris)*, 2021. **37**(12): p. 1101-1107.
772. Mobius, W., et al., *Immunolectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O*. *J Histochem Cytochem*, 2002. **50**(1): p. 43-55.
773. Subra, C., et al., *Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins*. *J Lipid Res*, 2010. **51**(8): p. 2105-20.
774. Trajkovic, K., et al., *Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes*. *Science*, 2008. **319**(5867): p. 1244-7.
775. Goni, F.M. and A. Alonso, *Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1788**(1): p. 169-77.
776. Choi, J.U., et al., *The Biological Function and Therapeutic Potential of Exosomes in Cancer: Exosomes as Efficient Nanocommunicators for Cancer Therapy*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(19).
777. Ferreira, B., A. Lourenco, and M.D.C. Sousa, *Protozoa-Derived Extracellular Vesicles on Intercellular Communication with Special Emphasis on Giardia lamblia*. *Microorganisms*, 2022. **10**(12).
778. Moyano, S., et al., *Exosome Biogenesis in the Protozoa Parasite Giardia lamblia: A Model of Reduced Interorganellar Crosstalk*. *Cells*, 2019. **8**(12).
779. Konrad, C., C. Spycher, and A.B. Hehl, *Selective condensation drives partitioning and sequential secretion of cyst wall proteins in differentiating Giardia lamblia*. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(4): p. e1000835.
780. Wampfler, P.B., et al., *Proteomics of secretory and endocytic organelles in Giardia lamblia*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e94089.
781. Nemeth, A., et al., *Antibiotic-induced release of small extracellular vesicles (exosomes) with surface-associated DNA*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 8202.
782. Revenfeld, A.L., et al., *Diagnostic and prognostic potential of extracellular vesicles in peripheral blood*. *Clin Ther*, 2014. **36**(6): p. 830-46.
783. Borges, F.T., L.A. Reis, and N. Schor, *Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases*. *Braz J Med Biol Res*, 2013. **46**(10): p. 824-30.
784. Minciacchi, V.R., M.R. Freeman, and D. Di Vizio, *Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes*. *Semin Cell Dev Biol*, 2015. **40**: p. 41-51.
785. Piccin, A., W.G. Murphy, and O.P. Smith, *Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications*. *Blood Rev*, 2007. **21**(3): p. 157-71.
786. Pap, E., et al., *Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer*. *Inflamm Res*, 2009. **58**(1): p. 1-8.
787. Tricarico, C., J. Clancy, and C. D'Souza-Schorey, *Biology and biogenesis of shed microvesicles*. *Small GTPases*, 2017. **8**(4): p. 220-232.
788. Lima, L.G., et al., *Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner*. *Cancer Lett*, 2009. **283**(2): p. 168-75.
789. Al-Nedawi, K., B. Meehan, and J. Rak, *Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(13): p. 2014-8.

## Références bibliographiques

790. Li, B., et al., *RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells*. *Oncogene*, 2012. **31**(45): p. 4740-9.
791. Crespin, M., et al., *Activation of PAK1/2 during the shedding of platelet microvesicles*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2009. **20**(1): p. 63-70.
792. Surman, M., et al., *Deciphering the role of ectosomes in cancer development and progression: focus on the proteome*. *Clin Exp Metastasis*, 2017. **34**(3-4): p. 273-289.
793. Nabhan, J.F., et al., *Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(11): p. 4146-51.
794. Stachowiak, J.C., et al., *Membrane bending by protein-protein crowding*. *Nat Cell Biol*, 2012. **14**(9): p. 944-9.
795. They, C., M. Ostrowski, and E. Segura, *Membrane vesicles as conveyors of immune responses*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(8): p. 581-93.
796. Caruso, S. and I.K.H. Poon, *Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles: More Than Just Debris*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1486.
797. Takizawa, F., S. Tsuji, and S. Nagasawa, *Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells*. *FEBS Lett*, 1996. **397**(2-3): p. 269-72.
798. Vandivier, R.W., et al., *Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex*. *J Immunol*, 2002. **169**(7): p. 3978-86.
799. Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin, *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(3): p. 231-41.
800. Erwig, L.P. and P.M. Henson, *Clearance of apoptotic cells by phagocytes*. *Cell Death Differ*, 2008. **15**(2): p. 243-50.
801. Kakarla, R., et al., *Apoptotic cell-derived exosomes: messages from dying cells*. *Exp Mol Med*, 2020. **52**(1): p. 1-6.
802. Mathieu, M., et al., *Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication*. *Nat Cell Biol*, 2019. **21**(1): p. 9-17.
803. Zhang, H., et al., *Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation*. *Nat Cell Biol*, 2018. **20**(3): p. 332-343.
804. Zhang, Y., et al., *Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential*. *Cell Biosci*, 2019. **9**: p. 19.
805. Hoshino, A., et al., *Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers*. *Cell*, 2020. **182**(4): p. 1044-1061 e18.
806. Anand, S., M. Samuel, and S. Mathivanan, *Exomeres: A New Member of Extracellular Vesicles Family*. *Subcell Biochem*, 2021. **97**: p. 89-97.
807. Clancy, J.W., A.C. Boomgarden, and C. D'Souza-Schorey, *Profiling and promise of supermeres*. *Nat Cell Biol*, 2021. **23**(12): p. 1217-1219.
808. Ma, L., et al., *Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration*. *Cell Res*, 2015. **25**(1): p. 24-38.
809. Taylor, A.C. and E. Robbins, *Observations on microextensions from the surface of isolated vertebrate cells*. *Dev Biol*, 1963. **6**: p. 660-73.
810. Huang, Y., et al., *Migrasome formation is mediated by assembly of micron-scale tetraspanin macrodomains*. *Nat Cell Biol*, 2019. **21**(8): p. 991-1002.

## Références bibliographiques

811. Di Vizio, D., et al., *Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease*. Am J Pathol, 2012. **181**(5): p. 1573-84.
812. Junquera, C., et al., *Biogenesis of a new type of extracellular vesicles in gastrointestinal stromal tumors: ultrastructural profiles of spherosomes*. Histochem Cell Biol, 2016. **146**(5): p. 557-567.
813. Wu, K., et al., *Extracellular vesicles as emerging targets in cancer: Recent development from bench to bedside*. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2017. **1868**(2): p. 538-563.
814. Zhang, Q., et al., *Supermeres are functional extracellular nanoparticles replete with disease biomarkers and therapeutic targets*. Nat Cell Biol, 2021. **23**(12): p. 1240-1254.
815. Greening, D.W. and R.J. Simpson, *Understanding extracellular vesicle diversity - current status*. Expert Rev Proteomics, 2018. **15**(11): p. 887-910.
816. Phillips, W., E. Willms, and A.F. Hill, *Understanding extracellular vesicle and nanoparticle heterogeneity: Novel methods and considerations*. Proteomics, 2021. **21**(13-14): p. e2000118.
817. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 654-9.
818. Kalluri, R. and V.S. LeBleu, *The biology, function, and biomedical applications of exosomes*. Science, 2020. **367**(6478).
819. Suire, C.N. and M.D. Hade, *Extracellular Vesicles in Type 1 Diabetes: A Versatile Tool*. Bioengineering (Basel), 2022. **9**(3).
820. Witwer, K.W., et al., *Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research*. J Extracell Vesicles, 2013. **2**.
821. They, C., et al., *Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73*. J Cell Biol, 1999. **147**(3): p. 599-610.
822. Wubbolts, R., et al., *Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation*. J Biol Chem, 2003. **278**(13): p. 10963-72.
823. Crescitelli, R., et al., *Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes*. J Extracell Vesicles, 2013. **2**.
824. Kim, D.K., et al., *EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles*. J Extracell Vesicles, 2013. **2**.
825. Twu, O., et al., *Trichomonas vaginalis exosomes deliver cargo to host cells and mediate hostratioparasite interactions*. PLoS Pathog, 2013. **9**(7): p. e1003482.
826. Sharma, M., et al., *Characterization of Extracellular Vesicles from Entamoeba histolytica Identifies Roles in Intercellular Communication That Regulates Parasite Growth and Development*. Infect Immun, 2020. **88**(10).
827. Liang, Y., et al., *Complex N-linked glycans serve as a determinant for exosome/microvesicle cargo recruitment*. J Biol Chem, 2014. **289**(47): p. 32526-37.
828. Menck, K., et al., *Tumor-derived microvesicles mediate human breast cancer invasion through differentially glycosylated EMMPRIN*. J Mol Cell Biol, 2015. **7**(2): p. 143-53.
829. Zhao, Z., et al., *Isolation and analysis methods of extracellular vesicles (EVs)*. Extracell Vesicles Circ Nucl Acids, 2021. **2**: p. 80-103.
830. Looze, C., et al., *Proteomic profiling of human plasma exosomes identifies PPARgamma as an exosome-associated protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **378**(3): p. 433-8.

## Références bibliographiques

831. Heijnen, H.F., et al., *Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules*. *Blood*, 1999. **94**(11): p. 3791-9.
832. Palmisano, G., et al., *Characterization of membrane-shed microvesicles from cytokine-stimulated beta-cells using proteomics strategies*. *Mol Cell Proteomics*, 2012. **11**(8): p. 230-43.
833. Kowal, J., et al., *Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(8): p. E968-77.
834. van Niel, G., et al., *Exosomes: a common pathway for a specialized function*. *J Biochem*, 2006. **140**(1): p. 13-21.
835. Shurtleff, M.J., et al., *Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction*. *Elife*, 2016. **5**.
836. Arroyo, J.D., et al., *Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(12): p. 5003-8.
837. Villarroya-Beltri, C., et al., *Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs*. *Nat Commun*, 2013. **4**: p. 2980.
838. Jeppesen, D.K., et al., *Reassessment of Exosome Composition*. *Cell*, 2019. **177**(2): p. 428-445 e18.
839. Bellingham, S.A., B.M. Coleman, and A.F. Hill, *Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(21): p. 10937-49.
840. Nolte-'t Hoen, E.N., et al., *Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(18): p. 9272-85.
841. Hunter, M.P., et al., *Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles*. *PLoS One*, 2008. **3**(11): p. e3694.
842. Michael, A., et al., *Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers*. *Oral Dis*, 2010. **16**(1): p. 34-8.
843. Mittelbrunn, M., et al., *Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells*. *Nat Commun*, 2011. **2**: p. 282.
844. Montecalvo, A., et al., *Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes*. *Blood*, 2012. **119**(3): p. 756-66.
845. Ratajczak, J., et al., *Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication*. *Leukemia*, 2006. **20**(9): p. 1487-95.
846. Skog, J., et al., *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(12): p. 1470-6.
847. Guduric-Fuchs, J., et al., *Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types*. *BMC Genomics*, 2012. **13**: p. 357.
848. Melo, S.A., et al., *Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis*. *Cancer Cell*, 2014. **26**(5): p. 707-21.
849. Ravasi, T., et al., *Experimental validation of the regulated expression of large numbers of non-coding RNAs from the mouse genome*. *Genome Res*, 2006. **16**(1): p. 11-9.

## Références bibliographiques

850. Batagov, A.O. and I.V. Kurochkin, *Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions*. Biol Direct, 2013. **8**: p. 12.
851. Frith, M.C., et al., *The abundance of short proteins in the mammalian proteome*. PLoS Genet, 2006. **2**(4): p. e52.
852. Huntzinger, E. and E. Izaurralde, *Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(2): p. 99-110.
853. Martellucci, S., et al., *Extracellular Vesicles: New Endogenous Shuttles for miRNAs in Cancer Diagnosis and Therapy?* Int J Mol Sci, 2020. **21**(18).
854. Holmgren, L., et al., *Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies*. Blood, 1999. **93**(11): p. 3956-63.
855. Kustanovich, A., et al., *Life and death of circulating cell-free DNA*. Cancer Biol Ther, 2019. **20**(8): p. 1057-1067.
856. Stewart, C.M., et al., *The value of cell-free DNA for molecular pathology*. J Pathol, 2018. **244**(5): p. 616-627.
857. Fernando, M.R., et al., *New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes*. PLoS One, 2017. **12**(8): p. e0183915.
858. Ganesh V Shelke, S.C.J., Yanan Yin, Cecilia Lässer, Jan Lötvall, *Human mast cells release extracellular vesicle-associated DNA*. Matters, 2016.
859. Balaj, L., et al., *Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 180.
860. Kahlert, C., et al., *Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer*. J Biol Chem, 2014. **289**(7): p. 3869-75.
861. Thakur, B.K., et al., *Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection*. Cell Res, 2014. **24**(6): p. 766-9.
862. Guescini, M., et al., *Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA*. J Neural Transm (Vienna), 2010. **117**(1): p. 1-4.
863. Lazaro-Ibanez, E., et al., *Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes*. Prostate, 2014. **74**(14): p. 1379-90.
864. Vagner, T., et al., *Large extracellular vesicles carry most of the tumour DNA circulating in prostate cancer patient plasma*. J Extracell Vesicles, 2018. **7**(1): p. 1505403.
865. Lee, T.H., et al., *Barriers to horizontal cell transformation by extracellular vesicles containing oncogenic H-ras*. Oncotarget, 2016. **7**(32): p. 51991-52002.
866. Miranda, K.C., et al., *Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease*. Kidney Int, 2010. **78**(2): p. 191-9.
867. Reich, C.F., 3rd and D.S. Pisetsky, *The content of DNA and RNA in microparticles released by Jurkat and HL-60 cells undergoing in vitro apoptosis*. Exp Cell Res, 2009. **315**(5): p. 760-8.
868. Cai, J., et al., *Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells*. J Mol Cell Biol, 2013. **5**(4): p. 227-38.

## Références bibliographiques

869. Fischer, S., et al., *Indication of Horizontal DNA Gene Transfer by Extracellular Vesicles*. PLoS One, 2016. **11**(9): p. e0163665.
870. Sisirak, V., et al., *Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity*. Cell, 2016. **166**(1): p. 88-101.
871. Arienti, G., et al., *Fatty acid pattern of human prostasome lipid*. Arch Biochem Biophys, 1998. **358**(2): p. 391-5.
872. Arvidson, G., et al., *Human prostasome membranes exhibit very high cholesterol/phospholipid ratios yielding high molecular ordering*. Biochim Biophys Acta, 1989. **984**(2): p. 167-73.
873. Llorente, A., et al., *Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(7): p. 1302-9.
874. Laulagnier, K., et al., *Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization*. Biochem J, 2004. **380**(Pt 1): p. 161-71.
875. Matsuo, H., et al., *Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization*. Science, 2004. **303**(5657): p. 531-4.
876. Colombo, M., G. Raposo, and C. Thery, *Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014. **30**: p. 255-89.
877. Del Conde, I., et al., *Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1604-11.
878. Mathivanan, S., et al., *ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D1241-4.
879. Kalra, H., et al., *Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation*. PLoS Biol, 2012. **10**(12): p. e1001450.
880. Pathan, M., et al., *Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(D1): p. D516-D519.
881. Wang, X., et al., *ExoBCD: a comprehensive database for exosomal biomarker discovery in breast cancer*. Brief Bioinform, 2021. **22**(3).
882. Consortium, E.-T., et al., *EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research*. Nat Methods, 2017. **14**(3): p. 228-232.
883. Roux, Q., et al., *The EV-TRACK summary add-on: integration of experimental information in databases to ensure comprehensive interpretation of biological knowledge on extracellular vesicles*. J Extracell Vesicles, 2020. **9**(1): p. 1699367.
884. Russo, F., et al., *miRandola: extracellular circulating microRNAs database*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47786.
885. Tsering, T., et al., *EV-ADD, a database for EV-associated DNA in human liquid biopsy samples*. J Extracell Vesicles, 2022. **11**(10): p. e12270.
886. Colombo, M., et al., *Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 24): p. 5553-65.
887. Grant, B.D. and J.G. Donaldson, *Pathways and mechanisms of endocytic recycling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(9): p. 597-608.
888. Ghossoub, R., et al., *Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3477.

## Références bibliographiques

889. Baietti, M.F., et al., *Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(7): p. 677-85.
890. Perez-Hernandez, D., et al., *The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes*. J Biol Chem, 2013. **288**(17): p. 11649-61.
891. Mazurov, D., L. Barbashova, and A. Filatov, *Tetraspanin protein CD9 interacts with metalloprotease CD10 and enhances its release via exosomes*. FEBS J, 2013. **280**(5): p. 1200-13.
892. Kosaka, N., et al., *Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(23): p. 17442-52.
893. Geminard, C., et al., *Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes*. Traffic, 2004. **5**(3): p. 181-93.
894. Buschow, S.I., et al., *Exosomes contain ubiquitinated proteins*. Blood Cells Mol Dis, 2005. **35**(3): p. 398-403.
895. Luhtala, N., et al., *Secreted Glioblastoma Nanovesicles Contain Intracellular Signaling Proteins and Active Ras Incorporated in a Farnesylation-dependent Manner*. J Biol Chem, 2017. **292**(2): p. 611-628.
896. Kisurina-Evgenieva, O.P., O.I. Sutiagina, and G.E. Onishchenko, *Biogenesis of Micronuclei*. Biochemistry (Mosc), 2016. **81**(5): p. 453-64.
897. Elzanowska, J., C. Semira, and B. Costa-Silva, *DNA in extracellular vesicles: biological and clinical aspects*. Mol Oncol, 2021. **15**(6): p. 1701-1714.
898. Irion, U. and D. St Johnston, *bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex*. Nature, 2007. **445**(7127): p. 554-8.
899. Gibbings, D.J., et al., *Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(9): p. 1143-9.
900. McKenzie, A.J., et al., *KRAS-MEK Signaling Controls Ago2 Sorting into Exosomes*. Cell Rep, 2016. **15**(5): p. 978-987.
901. Teng, Y., et al., *MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14448.
902. Mateescu, B., et al., *Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper*. J Extracell Vesicles, 2017. **6**(1): p. 1286095.
903. Carayon, K., et al., *Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation*. J Biol Chem, 2011. **286**(39): p. 34426-39.
904. Segura, E., S. Amigorena, and C. Thery, *Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses*. Blood Cells Mol Dis, 2005. **35**(2): p. 89-93.
905. Muralidharan-Chari, V., et al., *ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles*. Curr Biol, 2009. **19**(22): p. 1875-85.
906. Indira Chandran, V., et al., *Ultrasensitive Immunoprofiling of Plasma Extracellular Vesicles Identifies Syndecan-1 as a Potential Tool for Minimally Invasive Diagnosis of Glioma*. Clin Cancer Res, 2019. **25**(10): p. 3115-3127.
907. Zimmermann, P., et al., *Syndecan recycling [corrected] is controlled by syntenin-PIP2 interaction and Arf6*. Dev Cell, 2005. **9**(3): p. 377-88.

## Références bibliographiques

908. Clancy, J.W., M. Schmidtman, and C. D'Souza-Schorey, *The ins and outs of microvesicles*. FASEB Bioadv, 2021. **3**(6): p. 399-406.
909. Metcalf, D. and A.M. Isaacs, *The role of ESCRT proteins in fusion events involving lysosomes, endosomes and autophagosomes*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(6): p. 1469-73.
910. Fyfe, I., et al., *Association of the endosomal sorting complex ESCRT-II with the Vps20 subunit of ESCRT-III generates a curvature-sensitive complex capable of nucleating ESCRT-III filaments*. J Biol Chem, 2011. **286**(39): p. 34262-70.
911. Wollert, T., et al., *Membrane scission by the ESCRT-III complex*. Nature, 2009. **458**(7235): p. 172-7.
912. Hanson, P.I., S. Shim, and S.A. Merrill, *Cell biology of the ESCRT machinery*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(4): p. 568-74.
913. Capraro, B.R., et al., *Curvature sensing by the epsin N-terminal homology domain measured on cylindrical lipid membrane tethers*. J Am Chem Soc, 2010. **132**(4): p. 1200-1.
914. Hsieh, W.T., et al., *Curvature sorting of peripheral proteins on solid-supported wavy membranes*. Langmuir, 2012. **28**(35): p. 12838-43.
915. Sorre, B., et al., *Curvature-driven lipid sorting needs proximity to a demixing point and is aided by proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(14): p. 5622-6.
916. van Meer, G. and W.L. Vaz, *Membrane curvature sorts lipids. Stabilized lipid rafts in membrane transport*. EMBO Rep, 2005. **6**(5): p. 418-9.
917. Clancy, J.W., et al., *An ARF6-Exportin-5 axis delivers pre-miRNA cargo to tumour microvesicles*. Nat Cell Biol, 2019. **21**(7): p. 856-866.
918. Lee, H., et al., *Caveolin-1 selectively regulates microRNA sorting into microvesicles after noxious stimuli*. J Exp Med, 2019. **216**(9): p. 2202-2220.
919. Bolukbasi, M.F., et al., *miR-1289 and "Zipcode"-like Sequence Enrich mRNAs in Microvesicles*. Mol Ther Nucleic Acids, 2012. **1**: p. e10.
920. Reis-Sobreiro, M., et al., *Emerin Deregulation Links Nuclear Shape Instability to Metastatic Potential*. Cancer Res, 2018. **78**(21): p. 6086-6097.
921. Kooijmans, S.A.A., O.G. de Jong, and R.M. Schiffelers, *Exploring interactions between extracellular vesicles and cells for innovative drug delivery system design*. Adv Drug Deliv Rev, 2021. **173**: p. 252-278.
922. Mulcahy, L.A., R.C. Pink, and D.R. Carter, *Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**.
923. Denzer, K., et al., *Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface*. J Immunol, 2000. **165**(3): p. 1259-65.
924. Mallegol, J., et al., *T84-intestinal epithelial exosomes bear MHC class II/peptide complexes potentiating antigen presentation by dendritic cells*. Gastroenterology, 2007. **132**(5): p. 1866-76.
925. Rai, A.K. and P.J. Johnson, *Trichomonas vaginalis extracellular vesicles are internalized by host cells using proteoglycans and caveolin-dependent endocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(43): p. 21354-21360.
926. Tian, T., et al., *Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery*. J Biol Chem, 2014. **289**(32): p. 22258-67.
927. Verweij, F.J., et al., *Live Tracking of Inter-organ Communication by Endogenous Exosomes In Vivo*. Dev Cell, 2019. **48**(4): p. 573-589 e4.

## Références bibliographiques

928. Harding, C. and P. Stahl, *Transferrin recycling in reticulocytes: pH and iron are important determinants of ligand binding and processing*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983. **113**(2): p. 650-8.
929. Ridder, K., et al., *Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation*. *PLoS Biol*, 2014. **12**(6): p. e1001874.
930. Raposo, G., et al., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. *J Exp Med*, 1996. **183**(3): p. 1161-72.
931. Bobrie, A. and C. Thery, *Exosomes and communication between tumours and the immune system: are all exosomes equal?* *Biochem Soc Trans*, 2013. **41**(1): p. 263-7.
932. Bakhti, M., C. Winter, and M. Simons, *Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(1): p. 787-96.
933. Wang, S., et al., *Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes*. *J Neurosci*, 2011. **31**(20): p. 7275-90.
934. Al-Nedawi, K., et al., *Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells*. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(5): p. 619-24.
935. Karasu, E., et al., *Extracellular Vesicles: Packages Sent With Complement*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 721.
936. Wu, Z., et al., *Extracellular Vesicle-Mediated Communication Within Host-Parasite Interactions*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 3066.
937. Buck, A.H., et al., *Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 5488.
938. Garcia-Silva, M.R., et al., *Extracellular vesicles shed by Trypanosoma cruzi are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells*. *Parasitol Res*, 2014. **113**(1): p. 285-304.
939. Bayer-Santos, E., et al., *Characterization of the small RNA content of Trypanosoma cruzi extracellular vesicles*. *Mol Biochem Parasitol*, 2014. **193**(2): p. 71-4.
940. Fromm, B., et al., *On the presence and immunoregulatory functions of extracellular microRNAs in the trematode Fasciola hepatica*. *Parasite Immunol*, 2017. **39**(2).
941. Sansone, P., et al., *Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. **114**(43): p. E9066-E9075.
942. Ifergan, I., G.L. Scheffer, and Y.G. Assaraf, *Novel extracellular vesicles mediate an ABCG2-dependent anticancer drug sequestration and resistance*. *Cancer Res*, 2005. **65**(23): p. 10952-8.
943. Safaei, R., et al., *Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells*. *Mol Cancer Ther*, 2005. **4**(10): p. 1595-604.
944. Corcoran, C., et al., *Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e50999.
945. Qin, Y., et al., *Widespread of Potential Pathogen-Derived Extracellular Vesicles Carrying Antibiotic Resistance Genes in Indoor Dust*. *Environ Sci Technol*, 2022. **56**(9): p. 5653-5663.

## Références bibliographiques

946. Regev-Rudzki, N., et al., *Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles*. Cell, 2013. **153**(5): p. 1120-33.
947. Trocoli Torrecilhas, A.C., et al., *Trypanosoma cruzi: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response*. Microbes Infect, 2009. **11**(1): p. 29-39.
948. Govender, Y., et al., *The Role of Small Extracellular Vesicles in Viral-Protozoan Symbiosis: Lessons From Trichomonasvirus in an Isogenic Host Parasite Model*. Front Cell Infect Microbiol, 2020. **10**: p. 591172.
949. Rada, P., et al., *Double-Stranded RNA Viruses Are Released From Trichomonas vaginalis Inside Small Extracellular Vesicles and Modulate the Exosomal Cargo*. Front Microbiol, 2022. **13**: p. 893692.
950. Atayde, V.D., et al., *Publisher Correction: Exploitation of the Leishmania exosomal pathway by Leishmania RNA virus 1*. Nat Microbiol, 2019. **4**(4): p. 724.
951. Rana, S., et al., *Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(9): p. 1574-84.
952. Bobrie, A., et al., *Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses*. Traffic, 2011. **12**(12): p. 1659-68.
953. Chaput, N. and C. Thery, *Exosomes: immune properties and potential clinical implementations*. Semin Immunopathol, 2011. **33**(5): p. 419-40.
954. Stuedl, A., et al., *Induction of alpha-synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies*. Brain, 2016. **139**(Pt 2): p. 481-94.
955. Costa-Silva, B., et al., *Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver*. Nat Cell Biol, 2015. **17**(6): p. 816-26.
956. Tian, J., et al., *Potential roles of extracellular vesicles in the pathophysiology, diagnosis, and treatment of autoimmune diseases*. Int J Biol Sci, 2020. **16**(4): p. 620-632.
957. Jiang, W.Y. and Y.H. Xun, *[Value of detection of extracellular vesicles in the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease]*. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2020. **28**(1): p. 92-96.
958. Shaimardanova, A.A., et al., *Extracellular vesicles in the diagnosis and treatment of central nervous system diseases*. Neural Regen Res, 2020. **15**(4): p. 586-596.
959. Robbins, P.D. and A.E. Morelli, *Regulation of immune responses by extracellular vesicles*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 195-208.
960. Duijvesz, D., et al., *Exosomes as biomarker treasure chests for prostate cancer*. Eur Urol, 2011. **59**(5): p. 823-31.
961. Yang, J., et al., *Detection of tumor cell-specific mRNA and protein in exosome-like microvesicles from blood and saliva*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e110641.
962. Bazzan, E., et al., *Microvesicles in bronchoalveolar lavage as a potential biomarker of COPD*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2021. **320**(2): p. L241-L245.
963. McKiernan, J., et al., *A Prospective Adaptive Utility Trial to Validate Performance of a Novel Urine Exosome Gene Expression Assay to Predict High-grade Prostate Cancer in Patients with Prostate-specific Antigen 2-10ng/ml at Initial Biopsy*. Eur Urol, 2018. **74**(6): p. 731-738.
964. Couch, Y., et al., *Inflammatory Stroke Extracellular Vesicles Induce Macrophage Activation*. Stroke, 2017. **48**(8): p. 2292-2296.

## Références bibliographiques

965. Kawikova, I. and P.W. Askenase, *Diagnostic and therapeutic potentials of exosomes in CNS diseases*. Brain Res, 2015. **1617**: p. 63-71.
966. Levanen, B., et al., *Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(3): p. 894-903.
967. Masyuk, A.I., T.V. Masyuk, and N.F. Larusso, *Exosomes in the pathogenesis, diagnostics and therapeutics of liver diseases*. J Hepatol, 2013. **59**(3): p. 621-5.
968. Spanu, S., et al., *Urinary exosomes: a novel means to non-invasively assess changes in renal gene and protein expression*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e109631.
969. Hoefer, I.E., et al., *Novel methodologies for biomarker discovery in atherosclerosis*. Eur Heart J, 2015. **36**(39): p. 2635-42.
970. Madeira, R.P., et al., *Isolation and molecular characterization of circulating extracellular vesicles from blood of chronic Chagas disease patients*. Cell Biol Int, 2022. **46**(6): p. 883-894.
971. Turpin, D., et al., *Role of extracellular vesicles in autoimmune diseases*. Autoimmun Rev, 2016. **15**(2): p. 174-83.
972. Zhang, S., et al., *Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration*. Osteoarthritis Cartilage, 2016. **24**(12): p. 2135-2140.
973. Lai, R.C., et al., *Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury*. Stem Cell Res, 2010. **4**(3): p. 214-22.
974. Gatti, S., et al., *Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury*. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(5): p. 1474-83.
975. Tan, C.Y., et al., *Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models*. Stem Cell Res Ther, 2014. **5**(3): p. 76.
976. Chamberlain, C.S., et al., *Extracellular Vesicle-Educated Macrophages Promote Early Achilles Tendon Healing*. Stem Cells, 2019. **37**(5): p. 652-662.
977. Li, X., et al., *Tolerance induction by exosomes from immature dendritic cells and rapamycin in a mouse cardiac allograft model*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e44045.
978. Fuster-Matanzo, A., et al., *Acellular approaches for regenerative medicine: on the verge of clinical trials with extracellular membrane vesicles?* Stem Cell Res Ther, 2015. **6**: p. 227.
979. Lv, L.L., et al., *Therapeutic application of extracellular vesicles in kidney disease: promises and challenges*. J Cell Mol Med, 2018. **22**(2): p. 728-737.
980. Lee, C., et al., *Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension*. Circulation, 2012. **126**(22): p. 2601-11.
981. Doepfner, T.R., et al., *Extracellular Vesicles Improve Post-Stroke Neuroregeneration and Prevent Postischemic Immunosuppression*. Stem Cells Transl Med, 2015. **4**(10): p. 1131-43.
982. Zhang, Y., et al., *Effect of exosomes derived from multipotent mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury*. J Neurosurg, 2015. **122**(4): p. 856-67.
983. Bruno, S., et al., *Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(5): p. 1053-67.

## Références bibliographiques

984. Li, T., et al., *Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis*. Stem Cells Dev, 2013. **22**(6): p. 845-54.
985. Murphy, D.E., et al., *Extracellular vesicle-based therapeutics: natural versus engineered targeting and trafficking*. Exp Mol Med, 2019. **51**(3): p. 1-12.
986. Melling, G.E., et al., *The Challenges and Possibilities of Extracellular Vesicles as Therapeutic Vehicles*. Eur J Pharm Biopharm, 2019. **144**: p. 50-56.
987. Becker, A., et al., *Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis*. Cancer Cell, 2016. **30**(6): p. 836-848.
988. Al-Nedawi, K., et al., *Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(10): p. 3794-9.
989. Feng, Q., et al., *A class of extracellular vesicles from breast cancer cells activates VEGF receptors and tumour angiogenesis*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14450.
990. Webber, J.P., et al., *Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes*. Oncogene, 2015. **34**(3): p. 290-302.
991. Peinado, H., et al., *Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET*. Nat Med, 2012. **18**(6): p. 883-91.
992. Hoshino, A., et al., *Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis*. Nature, 2015. **527**(7578): p. 329-35.
993. Samuel, P., et al., *Cisplatin induces the release of extracellular vesicles from ovarian cancer cells that can induce invasiveness and drug resistance in bystander cells*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2018. **373**(1737).
994. Bewicke-Copley, F., et al., *Extracellular vesicles released following heat stress induce bystander effect in unstressed populations*. J Extracell Vesicles, 2017. **6**(1): p. 1340746.
995. Bobrie, A., et al., *Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression*. Cancer Res, 2012. **72**(19): p. 4920-30.
996. Szempruch, A.J., et al., *Extracellular Vesicles from Trypanosoma brucei Mediate Virulence Factor Transfer and Cause Host Anemia*. Cell, 2016. **164**(1-2): p. 246-257.
997. Tandoh, K.Z., et al., *Transcriptome-module phenotype association study implicates extracellular vesicles biogenesis in Plasmodium falciparum artemisinin resistance*. Front Cell Infect Microbiol, 2022. **12**: p. 886728.
998. Grajeda, B.I., et al., *Giardial lipid rafts share virulence factors with secreted vesicles and participate in parasitic infection in mice*. Front Cell Infect Microbiol, 2022. **12**: p. 974200.
999. Abels, E.R. and X.O. Breakefield, *Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake*. Cell Mol Neurobiol, 2016. **36**(3): p. 301-12.
1000. Mishra, D., J.R. Hubenak, and A.B. Mathur, *Nanoparticle systems as tools to improve drug delivery and therapeutic efficacy*. J Biomed Mater Res A, 2013. **101**(12): p. 3646-60.
1001. Zhang, J.S., F. Liu, and L. Huang, *Implications of pharmacokinetic behavior of lipoplex for its inflammatory toxicity*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(5): p. 689-98.
1002. Immordino, M.L., F. Dosio, and L. Cattel, *Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential*. Int J Nanomedicine, 2006. **1**(3): p. 297-315.

## Références bibliographiques

1003. van den Boorn, J.G., et al., *SiRNA delivery with exosome nanoparticles*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(4): p. 325-6.
1004. Clemmens, H. and D.W. Lambert, *Extracellular vesicles: translational challenges and opportunities*. Biochem Soc Trans, 2018. **46**(5): p. 1073-1082.
1005. Wiklander, O.P.B., et al., *Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles*. Sci Transl Med, 2019. **11**(492).
1006. Gyorgy, B., et al., *Therapeutic applications of extracellular vesicles: clinical promise and open questions*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2015. **55**: p. 439-464.
1007. Mizrak, A., et al., *Genetically engineered microvesicles carrying suicide mRNA/protein inhibit schwannoma tumor growth*. Mol Ther, 2013. **21**(1): p. 101-8.
1008. Olson, S.D., et al., *Examination of mesenchymal stem cell-mediated RNAi transfer to Huntington's disease affected neuronal cells for reduction of huntingtin*. Mol Cell Neurosci, 2012. **49**(3): p. 271-81.
1009. Pan, Q., et al., *Hepatic cell-to-cell transmission of small silencing RNA can extend the therapeutic reach of RNA interference (RNAi)*. Gut, 2012. **61**(9): p. 1330-9.
1010. Hung, M.E. and J.N. Leonard, *A platform for actively loading cargo RNA to elucidate limiting steps in EV-mediated delivery*. J Extracell Vesicles, 2016. **5**: p. 31027.
1011. Maguire, C.A., et al., *Microvesicle-associated AAV vector as a novel gene delivery system*. Mol Ther, 2012. **20**(5): p. 960-71.
1012. Fang, Y., et al., *Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes*. PLoS Biol, 2007. **5**(6): p. e158.
1013. Barile, L. and G. Vassalli, *Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases*. Pharmacol Ther, 2017. **174**: p. 63-78.
1014. Wahlgren, J., et al., *Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(17): p. e130.
1015. Alvarez-Erviti, L., et al., *Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(4): p. 341-5.
1016. Lamichhane, T.N., R.S. Raiker, and S.M. Jay, *Exogenous DNA Loading into Extracellular Vesicles via Electroporation is Size-Dependent and Enables Limited Gene Delivery*. Mol Pharm, 2015. **12**(10): p. 3650-7.
1017. Tian, Y., et al., *A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy*. Biomaterials, 2014. **35**(7): p. 2383-90.
1018. Sun, D., et al., *A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes*. Mol Ther, 2010. **18**(9): p. 1606-14.
1019. Jamur, M.C. and C. Oliver, *Permeabilization of cell membranes*. Methods Mol Biol, 2010. **588**: p. 63-6.
1020. Jacob, M.C., M. Favre, and J.C. Bensa, *Membrane cell permeabilization with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry*. Cytometry, 1991. **12**(6): p. 550-8.
1021. Haney, M.J., et al., *Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy*. J Control Release, 2015. **207**: p. 18-30.
1022. Fuhrmann, G., et al., *Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins*. J Control Release, 2015. **205**: p. 35-44.

## Références bibliographiques

1023. Tan, S., et al., *Cell or cell membrane-based drug delivery systems*. *Theranostics*, 2015. **5**(8): p. 863-81.
1024. Didiot, M.C., et al., *Exosome-mediated Delivery of Hydrophobically Modified siRNA for Huntingtin mRNA Silencing*. *Mol Ther*, 2016. **24**(10): p. 1836-1847.
1025. Stremersch, S., et al., *Comparing exosome-like vesicles with liposomes for the functional cellular delivery of small RNAs*. *J Control Release*, 2016. **232**: p. 51-61.
1026. Nikfarjam, S., et al., *Dexosomes as a cell-free vaccine for cancer immunotherapy*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020. **39**(1): p. 258.
1027. Viaud, S., et al., *Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next?* *Cancer Res*, 2010. **70**(4): p. 1281-5.
1028. Colino, J. and C.M. Snapper, *Exosomes from bone marrow dendritic cells pulsed with diphtheria toxoid preferentially induce type 1 antigen-specific IgG responses in naive recipients in the absence of free antigen*. *J Immunol*, 2006. **177**(6): p. 3757-62.
1029. Cheng, Y. and J.S. Schorey, *Exosomes carrying mycobacterial antigens can protect mice against Mycobacterium tuberculosis infection*. *Eur J Immunol*, 2013. **43**(12): p. 3279-90.
1030. Beauvillain, C., et al., *Exosomes are an effective vaccine against congenital toxoplasmosis in mice*. *Vaccine*, 2009. **27**(11): p. 1750-7.
1031. Escudier, B., et al., *Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial*. *J Transl Med*, 2005. **3**(1): p. 10.
1032. Morse, M.A., et al., *A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer*. *J Transl Med*, 2005. **3**(1): p. 9.
1033. Dai, S., et al., *Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer*. *Mol Ther*, 2008. **16**(4): p. 782-90.
1034. Sandbu, S., et al., *Immunogenicity and safety of a combination of two serogroup B meningococcal outer membrane vesicle vaccines*. *Clin Vaccine Immunol*, 2007. **14**(9): p. 1062-9.
1035. Besse, B., et al., *Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(4): p. e1071008.
1036. Pitt, J.M., et al., *Dendritic cell-derived exosomes for cancer therapy*. *J Clin Invest*, 2016. **126**(4): p. 1224-32.
1037. Nassar, W., et al., *Umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles can safely ameliorate the progression of chronic kidney diseases*. *Biomater Res*, 2016. **20**: p. 21.
1038. Yuanwang Jia, L.Y., Tieliang Ma, Wenrong Xu, Hui Qian, Yaoxiang Sun, Hui Shi, *Small extracellular vesicles isolation and separation: Current techniques, pending questions and clinical applications*. *Theranostics*. **Volume 12 (15)**.
1039. Takov, K., D.M. Yellon, and S.M. Davidson, *Comparison of small extracellular vesicles isolated from plasma by ultracentrifugation or size-exclusion chromatography: yield, purity and functional potential*. *J Extracell Vesicles*, 2019. **8**(1): p. 1560809.
1040. Yakimchuk, K., *Exosomes: Isolation and Characterization Methods and Specific Markers*. 2015, Karolinska Institut.
1041. Li, X., et al., *Challenges and opportunities in exosome research-Perspectives from biology, engineering, and cancer therapy*. *APL Bioeng*, 2019. **3**(1): p. 011503.

## Références bibliographiques

1042. They, C., et al., *Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids*. Curr Protoc Cell Biol, 2006. **Chapter 3**: p. Unit 3 22.
1043. Sunkara, V., H.K. Woo, and Y.K. Cho, *Emerging techniques in the isolation and characterization of extracellular vesicles and their roles in cancer diagnostics and prognostics*. Analyst, 2016. **141**(2): p. 371-81.
1044. Yoo, Y.K., et al., *Toward Exosome-Based Neuronal Diagnostic Devices*. Micromachines (Basel), 2018. **9**(12).
1045. Gardiner, C., et al., *Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey*. J Extracell Vesicles, 2016. **5**: p. 32945.
1046. Zaborowski, M.P., et al., *Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study*. Bioscience, 2015. **65**(8): p. 783-797.
1047. Livshits, M.A., et al., *Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 17319.
1048. Szatanek, R., et al., *Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (Review)*. Int J Mol Med, 2015. **36**(1): p. 11-7.
1049. Brasaemle, D.L. and N.E. Wolins, *Isolation of Lipid Droplets from Cells by Density Gradient Centrifugation*. Curr Protoc Cell Biol, 2016. **72**: p. 3 15 1-3 15 13.
1050. Iwai, K., et al., *Isolation of human salivary extracellular vesicles by iodixanol density gradient ultracentrifugation and their characterizations*. J Extracell Vesicles, 2016. **5**: p. 30829.
1051. Konoshenko, M.Y., et al., *Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends*. Biomed Res Int, 2018. **2018**: p. 8545347.
1052. Weng, Y., et al., *Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling*. Analyst, 2016. **141**(15): p. 4640-6.
1053. Rekker, K., et al., *Comparison of serum exosome isolation methods for microRNA profiling*. Clin Biochem, 2014. **47**(1-2): p. 135-8.
1054. Silva, M.C., et al., *Prolonged tau clearance and stress vulnerability rescue by pharmacological activation of autophagy in tauopathy neurons*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 3258.
1055. Harischandra, D.S., et al., *Manganese promotes the aggregation and prion-like cell-to-cell exosomal transmission of alpha-synuclein*. Sci Signal, 2019. **12**(572).
1056. Stam, J., et al., *Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2021. **1169**: p. 122604.
1057. Boing, A.N., et al., *Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**.
1058. Heinemann, M.L., et al., *Benchtop isolation and characterization of functional exosomes by sequential filtration*. J Chromatogr A, 2014. **1371**: p. 125-35.
1059. Musante, L., et al., *A simplified method to recover urinary vesicles for clinical applications, and sample banking*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 7532.
1060. Shtam, T.A., et al., *[Isolation of extracellular micro-vesicles from cell culture medium: comparative evaluation of methods]*. Biomed Khim, 2018. **64**(1): p. 23-30.
1061. Cai, S., et al., *Immuno-modified superparamagnetic nanoparticles via host-guest interactions for high-purity capture and mild release of exosomes*. Nanoscale, 2018. **10**(29): p. 14280-14289.

## Références bibliographiques

1062. Whiteside, T.L., *Extracellular vesicles isolation and their biomarker potential: are we ready for testing?* Ann Transl Med, 2017. **5**(3): p. 54.
1063. Zhu, J., et al., *Column-based Technology for CD9-HPLC Immunoaffinity Isolation of Serum Extracellular Vesicles.* J Proteome Res, 2021. **20**(10): p. 4901-4911.
1064. Hung, M.E., et al., *Enrichment of Extracellular Vesicle Subpopulations Via Affinity Chromatography.* Methods Mol Biol, 2018. **1740**: p. 109-124.
1065. Heath, N., et al., *Rapid isolation and enrichment of extracellular vesicle preparations using anion exchange chromatography.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 5730.
1066. Bruce, T.F., et al., *Exosome isolation and purification via hydrophobic interaction chromatography using a polyester, capillary-channeled polymer fiber phase.* Electrophoresis, 2019. **40**(4): p. 571-581.
1067. Tengattini, S., *Chromatographic Approaches for Purification and Analytical Characterization of Extracellular Vesicles: Recent Advancements.* 2018.
1068. Zarovni, N., et al., *Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches.* Methods, 2015. **87**: p. 46-58.
1069. Chen, J., et al., *Review on Strategies and Technologies for Exosome Isolation and Purification.* Front Bioeng Biotechnol, 2021. **9**: p. 811971.
1070. Ku, A., et al., *Correction: A urinary extracellular vesicle microRNA biomarker discovery pipeline; from automated extracellular vesicle enrichment by acoustic trapping to microRNA sequencing.* PLoS One, 2019. **14**(10): p. e0224604.
1071. Ku, A., et al., *Acoustic Enrichment of Extracellular Vesicles from Biological Fluids.* Anal Chem, 2018. **90**(13): p. 8011-8019.
1072. Guo, S.C., S.C. Tao, and H. Dawn, *Microfluidics-based on-a-chip systems for isolating and analysing extracellular vesicles.* J Extracell Vesicles, 2018. **7**(1): p. 1508271.
1073. Talebjedi, B., et al., *Exploiting Microfluidics for Extracellular Vesicle Isolation and Characterization: Potential Use for Standardized Embryo Quality Assessment.* Front Vet Sci, 2020. **7**: p. 620809.
1074. Aras, O., et al., *Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia.* Blood, 2004. **103**(12): p. 4545-53.
1075. Wang, J., et al., *Tracking extracellular vesicle phenotypic changes enables treatment monitoring in melanoma.* Sci Adv, 2020. **6**(9): p. eaax3223.
1076. Sharma, S., et al., *Quantitative nanostructural and single-molecule force spectroscopy biomolecular analysis of human-saliva-derived exosomes.* Langmuir, 2011. **27**(23): p. 14394-400.
1077. Petersen, K.E., et al., *A review of exosome separation techniques and characterization of B16-F10 mouse melanoma exosomes with AF4-UV-MALS-DLS-TEM.* Anal Bioanal Chem, 2014. **406**(30): p. 7855-66.
1078. Mondal, A., et al., *Effective Visualization and Easy Tracking of Extracellular Vesicles in Glioma Cells.* Biol Proced Online, 2019. **21**: p. 4.
1079. Roberts-Dalton, H.D., et al., *Fluorescence labelling of extracellular vesicles using a novel thiol-based strategy for quantitative analysis of cellular delivery and intracellular traffic.* Nanoscale, 2017. **9**(36): p. 13693-13706.

## Références bibliographiques

1080. Maas, S.L., et al., *Possibilities and limitations of current technologies for quantification of biological extracellular vesicles and synthetic mimics*. J Control Release, 2015. **200**: p. 87-96.
1081. Gardiner, C., et al., *Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis*. J Extracell Vesicles, 2013. **2**.
1082. Akers, J.C., et al., *Comparative Analysis of Technologies for Quantifying Extracellular Vesicles (EVs) in Clinical Cerebrospinal Fluids (CSF)*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0149866.
1083. Dragovic, R.A., et al., *Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis*. Nanomedicine, 2011. **7**(6): p. 780-8.
1084. Vogel, R., et al., *Quantitative sizing of nano/microparticles with a tunable elastomeric pore sensor*. Anal Chem, 2011. **83**(9): p. 3499-506.
1085. Vogel, R., et al., *A standardized method to determine the concentration of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing*. J Extracell Vesicles, 2016. **5**: p. 31242.
1086. Stoner, S.A., et al., *High sensitivity flow cytometry of membrane vesicles*. Cytometry A, 2016. **89**(2): p. 196-206.
1087. Shao, H., et al., *New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles*. Chem Rev, 2018. **118**(4): p. 1917-1950.
1088. Orozco, A.F. and D.E. Lewis, *Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma*. Cytometry A, 2010. **77**(6): p. 502-14.
1089. Chen, J., et al., *Rapid and efficient isolation and detection of extracellular vesicles from plasma for lung cancer diagnosis*. Lab Chip, 2019. **19**(3): p. 432-443.
1090. Koliha, N., et al., *A novel multiplex bead-based platform highlights the diversity of extracellular vesicles*. J Extracell Vesicles, 2016. **5**: p. 29975.
1091. Qiu, H., et al., *Proteomic Profiling Exosomes from Vascular Smooth Muscle Cell*. Proteomics Clin Appl, 2018. **12**(5): p. e1700097.
1092. Rainville, P.D., et al., *Ion mobility spectrometry combined with ultra performance liquid chromatography/mass spectrometry for metabolic phenotyping of urine: Effects of column length, gradient duration and ion mobility spectrometry on metabolite detection*. Anal Chim Acta, 2017. **982**: p. 1-8.
1093. Baker, E.S., et al., *An LC-IMS-MS platform providing increased dynamic range for high-throughput proteomic studies*. J Proteome Res, 2010. **9**(2): p. 997-1006.
1094. He, M., et al., *Integrated immunoisolation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology*. Lab Chip, 2014. **14**(19): p. 3773-80.
1095. Lim, J.H., et al., *Comparative analysis of microRNA and mRNA expression profiles in cells and exosomes under toluene exposure*. Toxicol In Vitro, 2017. **41**: p. 92-101.
1096. Zhang, G., et al., *Comparative Analysis of microRNA Expression Profiles of Exosomes Derived from Normal and Hypoxic Preconditioning Human Neural Stem Cells by Next Generation Sequencing*. J Biomed Nanotechnol, 2018. **14**(6): p. 1075-1089.
1097. Coumans, F.A.W., et al., *Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles*. Circ Res, 2017. **120**(10): p. 1632-1648.
1098. Welsh, J.A., et al., *Towards defining reference materials for measuring extracellular vesicle refractive index, epitope abundance, size and concentration*. J Extracell Vesicles, 2020. **9**(1): p. 1816641.

## Références bibliographiques

1099. Margolis, L. and Y. Sadovsky, *The biology of extracellular vesicles: The known unknowns*. PLoS Biol, 2019. **17**(7): p. e3000363.
1100. Sundar, S., et al., *Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic*. Clin Infect Dis, 2000. **31**(4): p. 1104-7.
1101. Hendrickx, S., G. Caljon, and L. Maes, *Need for sustainable approaches in antileishmanial drug discovery*. Parasitol Res, 2019. **118**(10): p. 2743-2752.
1102. Gomez, M.A. and M. Olivier, *Proteases and phosphatases during Leishmania-macrophage interaction: paving the road for pathogenesis*. Virulence, 2010. **1**(4): p. 314-8.
1103. Gomez, M.A., et al., *Leishmania GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases*. Sci Signal, 2009. **2**(90): p. ra58.
1104. Silverman, J.M., et al., *An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from Leishmania and communication with macrophages*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 6): p. 842-52.
1105. Gabriel, A.M., et al., *Leishmania 360 degrees : Guidelines for Exosomal Research*. Microorganisms, 2021. **9**(10).
1106. Silverman, J.M., et al., *Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells*. J Immunol, 2010. **185**(9): p. 5011-22.
1107. Hassani, K., et al., *Temperature-induced protein secretion by Leishmania mexicana modulates macrophage signalling and function*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e18724.
1108. Hassani, K., et al., *Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of Leishmania exosomes*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e95007.
1109. Cronemberger-Andrade, A., et al., *Extracellular vesicles from Leishmania-infected macrophages confer an anti-infection cytokine-production profile to naive macrophages*. PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(9): p. e3161.
1110. Atayde, V.D., et al., *Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan Leishmania within the Sand Fly Midgut*. Cell Rep, 2015. **13**(5): p. 957-67.
1111. Dupin, T.V., et al., *Long-Term In Vitro Passaging Had a Negligible Effect on Extracellular Vesicles Released by Leishmania amazonensis and Induced Protective Immune Response in BALB/c Mice*. J Immunol Res, 2021. **2021**: p. 7809637.
1112. Fernández-Prada C, V.I., Gazanion É, Monte-Neto RL., *Omics and Their Impact on the Development of Chemotherapy Against Leishmania.*, in *Drug Discovery for Leishmaniasis: The Royal Society of Chemistry*. 2018. p. p. 101–129.
1113. Sundar, S. and B. Singh, *Understanding Leishmania parasites through proteomics and implications for the clinic*. Expert Rev Proteomics, 2018. **15**(5): p. 371-390.
1114. Skotland, T., et al., *Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology*. J Lipid Res, 2019. **60**(1): p. 9-18.
1115. Santarem, N., et al., *Exoproteome dynamics in Leishmania infantum*. J Proteomics, 2013. **84**: p. 106-18.
1116. Dong, G., A.L. Filho, and M. Olivier, *Modulation of Host-Pathogen Communication by Extracellular Vesicles (EVs) of the Protozoan Parasite Leishmania*. Front Cell Infect Microbiol, 2019. **9**: p. 100.

## Références bibliographiques

1117. Kumar, D., et al., *Biomarkers of antimony resistance: need for expression analysis of multiple genes to distinguish resistance phenotype in clinical isolates of Leishmania donovani*. Parasitol Res, 2012. **111**(1): p. 223-30.
1118. Biyani, N., et al., *Differential expression of proteins in antimony-susceptible and -resistant isolates of Leishmania donovani*. Mol Biochem Parasitol, 2011. **179**(2): p. 91-9.
1119. Maity, S.N., *NF-Y (CBF) regulation in specific cell types and mouse models*. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2017. **1860**(5): p. 598-603.
1120. Akopyants, N.S., et al., *Demonstration of genetic exchange during cyclical development of Leishmania in the sand fly vector*. Science, 2009. **324**(5924): p. 265-8.
1121. Stoten, C.L. and J.G. Carlton, *ESCRT-dependent control of membrane remodelling during cell division*. Semin Cell Dev Biol, 2018. **74**: p. 50-65.
1122. Pereira, L.O.R., et al., *Insights from Leishmania (Viannia) guyanensis in vitro behavior and intercellular communication*. Parasit Vectors, 2021. **14**(1): p. 556.
1123. Louradour, I., et al., *Stress conditions promote Leishmania hybridization in vitro marked by expression of the ancestral gamete fusogen HAP2 as revealed by single-cell RNA-seq*. Elife, 2022. **11**.
1124. Van Bockstal, L., et al., *Sand Fly Studies Predict Transmission Potential of Drug-resistant Leishmania*. Trends Parasitol, 2020. **36**(9): p. 785-795.
1125. Monte-Neto, R.L., C. Fernandez-Prada, and N.S. Moretti, *Sex under pressure: stress facilitates Leishmania in vitro hybridization*. Trends Parasitol, 2022. **38**(4): p. 274-276.
1126. Natanael Endrew Souto Maior Torres Bonfim, A.L.B.S.a.L.d.A.C., *Leishmaniasis: Molecular Aspects of Parasite Dimorphic Forms Life Cycle*, in *Leishmaniasis - General Aspects of a Stigmatized Disease*. 2022. p. 256.
1127. Cotrim, A.C.C.a.P.C., *The Role of ABC Transporters in Drug-Resistant Leishmania*, in *Drug Resistance in Leishmania Parasites. Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments*, V. Springer, Editor. 2012. p. 237-258.
1128. Katsila, T., et al., *Computational approaches in target identification and drug discovery*. Comput Struct Biotechnol J, 2016. **14**: p. 177-84.
1129. Yang, Y., S.J. Adelstein, and A.I. Kassis, *Target discovery from data mining approaches*. Drug Discov Today, 2012. **17 Suppl**: p. S16-23.
1130. Lee, M. and D. Kim, *Large-scale reverse docking profiles and their applications*. BMC Bioinformatics, 2012. **13 Suppl 17**: p. S6.
1131. Kharkar, P.S., S. Warriar, and R.S. Gaud, *Reverse docking: a powerful tool for drug repositioning and drug rescue*. Future Med Chem, 2014. **6**(3): p. 333-42.
1132. Lavecchia, A., *Machine-learning approaches in drug discovery: methods and applications*. Drug Discov Today, 2015. **20**(3): p. 318-31.
1133. Fliri, A.F., et al., *Biospectra analysis: model proteome characterizations for linking molecular structure and biological response*. J Med Chem, 2005. **48**(22): p. 6918-25.
1134. Jeremy L.Jenkins, A., John W.Davies, *In silico target fishing: Predicting biological targets from chemical structure*. Science Direct: Drug Discovery Today: Technologies, 2006. **3**(4): p. 413-421.
1135. Byrne, R. and G. Schneider, *In Silico Target Prediction for Small Molecules*. Methods Mol Biol, 2019. **1888**: p. 273-309.

## Références bibliographiques

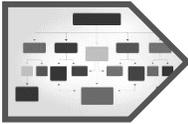
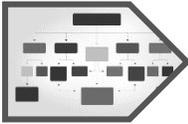
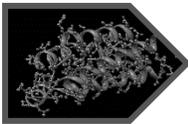
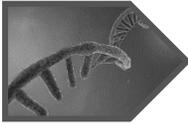
1136. Agamah, F.E., et al., *Computational/in silico methods in drug target and lead prediction*. Brief Bioinform, 2020. **21**(5): p. 1663-1675.
1137. Abadio, A.K., et al., *Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens*. BMC Genomics, 2011. **12**: p. 75.
1138. Zhang, Z. and Q. Ren, *Why are essential genes essential? - The essentiality of Saccharomyces genes*. Microb Cell, 2015. **2**(8): p. 280-287.
1139. Zhang, X., et al., *In silico Methods for Identification of Potential Therapeutic Targets*. Interdiscip Sci, 2022. **14**(2): p. 285-310.
1140. Thakur, C.P., et al., *Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) with aminosidine (= paromomycin)-antimonial combinations, a pilot study in Bihar, India*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1992. **86**(6): p. 615-6.
1141. Sundar, S., et al., *Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial*. Lancet, 2011. **377**(9764): p. 477-86.
1142. Atia, A.M., et al., *Sodium stibogluconate and paromomycin for treating visceral leishmaniasis under routine conditions in eastern Sudan*. Trop Med Int Health, 2015. **20**(12): p. 1674-84.
1143. Sadeghian, G. and M.A. Nilforoushzadeh, *Effect of combination therapy with systemic glucantime and pentoxifylline in the treatment of cutaneous leishmaniasis*. Int J Dermatol, 2006. **45**(7): p. 819-21.
1144. Lessa, H.A., et al., *Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony*. Am J Trop Med Hyg, 2001. **65**(2): p. 87-9.
1145. Machado, P.R., et al., *Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis*. Clin Infect Dis, 2007. **44**(6): p. 788-93.
1146. Hergenreider, E., et al., *Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(3): p. 249-56.
1147. Ohno, S., et al., *Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells*. Mol Ther, 2013. **21**(1): p. 185-91.
1148. Rechavi, O., et al., *Cell contact-dependent acquisition of cellular and viral nonautonomously encoded small RNAs*. Genes Dev, 2009. **23**(16): p. 1971-9.
1149. Kosaka, N., et al., *Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs*. J Biol Chem, 2012. **287**(2): p. 1397-405.
1150. Akao, Y., et al., *Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using monocytes/macrophages*. Mol Ther, 2011. **19**(2): p. 395-9.
1151. Khan, M.A., et al., *Gene delivery using calcium phosphate nanoparticles: Optimization of the transfection process and the effects of citrate and poly(l-lysine) as additives*. J Colloid Interface Sci, 2016. **471**: p. 48-58.
1152. Vanegas Saenz, J.R., et al., *Amiloride-enhanced gene transfection of octa-arginine functionalized calcium phosphate nanoparticles*. PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0188347.
1153. Zhong, Z., et al., *Extracellular Vesicles Derived From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Protect Against DOX-Induced Heart Failure Through the miR-100-5p/NOX4 Pathway*. Front Bioeng Biotechnol, 2021. **9**: p. 703241.
1154. Kleefeldt, J.M., et al., *Commercially available transfection reagents and negative control siRNA are not inert*. Anal Biochem, 2020. **606**: p. 113828.

## Références bibliographiques

1155. Shimbo, K., et al., *Exosome-formed synthetic microRNA-143 is transferred to osteosarcoma cells and inhibits their migration*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **445**(2): p. 381-7.
1156. Bryniarski, K., et al., *Antigen-specific, antibody-coated, exosome-like nanovesicles deliver suppressor T-cell microRNA-150 to effector T cells to inhibit contact sensitivity*. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. **132**(1): p. 170-81.
1157. Akao, Y., et al., *Role of anti-oncomirs miR-143 and -145 in human colorectal tumors*. *Cancer Gene Ther*, 2010. **17**(6): p. 398-408.
1158. Feng, Z., et al., *A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes*. *Nature*, 2013. **496**(7445): p. 367-71.
1159. Hudry, E., et al., *Exosome-associated AAV vector as a robust and convenient neuroscience tool*. *Gene Ther*, 2016. **23**(11): p. 819.
1160. Vader, P., et al., *New considerations in the preparation of nucleic acid-loaded extracellular vesicles*. *Ther Deliv*, 2014. **5**(2): p. 105-7.
1161. Turchinovich, A., et al., *Characterization of extracellular circulating microRNA*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(16): p. 7223-33.
1162. Pascucci, L., et al., *Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery*. *J Control Release*, 2014. **192**: p. 262-70.
1163. Weaver, J.C., *Electroporation: a general phenomenon for manipulating cells and tissues*. *J Cell Biochem*, 1993. **51**(4): p. 426-35.
1164. Ambani, L.M., M.H. Van Woert, and S. Murphy, *Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease*. *Arch Neurol*, 1975. **32**(2): p. 114-8.
1165. Abraham, S., et al., *Erythrocyte antioxidant enzymes in Parkinson's disease*. *Indian J Med Res*, 2005. **121**(2): p. 111-5.
1166. Byrne, M., et al., *Novel hydrophobically modified asymmetric RNAi compounds (sd-rxRNA) demonstrate robust efficacy in the eye*. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2013. **29**(10): p. 855-64.
1167. Geary, R.S., et al., *Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015. **87**: p. 46-51.
1168. Alterman, J.F., et al., *Hydrophobically Modified siRNAs Silence Huntingtin mRNA in Primary Neurons and Mouse Brain*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2015. **4**: p. e266.
1169. Sutaria, D.S., et al., *Achieving the Promise of Therapeutic Extracellular Vesicles: The Devil is in Details of Therapeutic Loading*. *Pharm Res*, 2017. **34**(5): p. 1053-1066.
1170. Hood, J.L., M.J. Scott, and S.A. Wickline, *Maximizing exosome colloidal stability following electroporation*. *Anal Biochem*, 2014. **448**: p. 41-9.
1171. Johnsen, K.B., et al., *Evaluation of electroporation-induced adverse effects on adipose-derived stem cell exosomes*. *Cytotechnology*, 2016. **68**(5): p. 2125-38.
1172. Kooijmans, S.A.A., et al., *Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles*. *J Control Release*, 2013. **172**(1): p. 229-238.



## Annexes

- 1  [Annexe 1. Aperçu historique de la découverte de \*Leishmania\*](#)
- 2  [Annexe 2. Classification des phlébotomes](#)
- 3  [Annexe 3. Histoire de la taxonomie des phlébotomes](#)
- 4  [Annexe 4. Classification des espèces de \*Leishmania\*](#)
- 5  [Annexe 5. Espèces de \*Leishmania\* les plus étudiées](#)
- 6  [Annexe 6. Protéines ABC impliquées dans la résistance de \*Leishmania\*](#)
- 7  [Annexe 7. Méthodes \*in silico\* pour la découverte de nouveaux médicaments](#)
- 8  [Annexe 8. Exemples de traitements combinés contre la leishmaniose](#)
- 9  [Annexe 9. Chargement « endogène » des vésicules extracellulaires](#)
- 10  [Annexe 10. Chargement « exogène » des vésicules extracellulaires](#)

## Annexe 1. Aperçu historique de la découverte de *Leishmania*

En lien avec le [chapitre 1, section 1.1.](#) | Source : [1]

### ▪ Avant JC.

(2 500 à 1 500 av.): Première description de lésions visibles similaires à la LC actuelle. (2000 av.): Infection de *L. donovani* chez d'anciennes momies égyptiennes. (1 500 av.): Identification de l'ADN de *Leishmania* dans le nord du Soudan. (800 av.): Infection de *Leishmania* chez une fillette de 6 ans au Pérou. (700 av.): Des descriptions similaires de LC découvertes sur des tablettes du roi Ashurbanipal. (650 B.C.): Enregistrements de ce qui semble être la LC dans le bassin Tigre - Euphrates.

### ▪ Après JC.

(Premier siècle après J.-C.): Preuves de la LC en Équateur, au Pérou, et en Amérique du Sud. **Avicenne (10e siècle après JC):** Description des lésions cutanées appelées douleurs Balakhes et probabilité d'intervention de moustiques. (XVe et XVIe siècles après JC: période inca): Notification de la *maladie de la vallée*, de la *maladie des Andes* ou de la *lèpre blanche*, qui sont susceptibles d'être des LC sud-américaine.

### ▪ XVIIIe siècle

**Russell (1756):** Première description clinique détaillée de la maladie. **Médecins indiens (1756):** Description des symptômes cliniques du kala azar (kālā āzār: kālā signifiant noir et āzār signifiant fièvre ou maladie). **Cosme Bueno (1764):** Premiers soupçons sur le rôle des phlébotomes dans la transmission de la maladie (Nouveau Monde).

### ▪ 19e siècle

**Villar (1859):** Description clinique de la maladie. **Borovsky (1898):** Première description de l'agent causal de la plaie orientale, référence aux protozoaires.

### ▪ Première moitié du XXe siècle

**Leishman (1901):** Identification des organismes, comme « trypanosomes », dans les frottis de la rate d'un patient indien décédé de « fièvre dum-dum ». **Donovan (1901):** Confirme la présence de ce qui est connu sous le nom de corps Leishman-Donovan dans les frottis des patients indiens. Première description du lien entre les corps Leishman-Donovan et le kala azar. **Ross (1903):** Propose le nom de *Leishmania donovani* pour les corps Leishman-Donovan. **Wright (1903):** Description de *L. tropica*. **Leishman et Rogers (1904):** Les amastigotes intracellulaires peuvent se différencier en promastigotes flagellés. **Rogers (1904):** Première culture *in vitro* réussie des formes flagellées. **Laveran et Chatoin (1904):** Premier cas du kala azar dans la région méditerranéenne. **Sergent et collègues (1905):** Premier rapport de LC transmis par des phlébotomes du genre *Phlebotomus*. **Patton (1907):** Preuve de la présence de corps Leishman-Donovan dans les lymphocytes du sang périphérique et ses formes flagellées dans l'intestin du phlébotome. **Nicolle (1908):** Isolement de *Leishmania* chez un nourrisson, d'où le nom de *L. infantum*. Différenciation entre la LV méditerranéenne causée par *L. infantum* et le kala azar indien dû à *L. donovani*. **Nicolle et Comple (1908):** Isolement de *Leishmania* chez des chiens infectés. **Lindenberg, Carini et Paranhos (1909):** Confirmation de la présence d'une LC autochtone, "Baurú ulcer", dans les Amériques. **Wenyon (1911):** Incrimination des phlébotomes comme vecteurs probables de maladies causées par *Leishmania* dans l'Ancien Monde. **Splendore (1911):** *Leishmania* comme agent causal des lésions muco-cutanées

"Espundia". **Vianna (1911):** Description de *L. brésiliensis*. **Migone (1913):** Premier rapport sur la LV dans les Amériques. **Yakimoff et Schokhor (1914):** Proposition des noms *L. tropica minor* et *L. tropica major* pour séparer les parasites provoquant une LC "urbaine sèche" et "rurale humide". **Casteliani et Chalmers (1919):** *L. donovani archibaldi* comme agent éthologique d'une forme mortelle de LV. **Aragão (1922):** Observations chez un chien des signes cliniques de leishmaniose après injection des phlébotomes infectés écrasés. **Monténégo (1923):** Inoculation expérimentale de *L. brésiliensis*, introduction du test intradermique (Test cutané du Monténégo), toujours utilisé pour le diagnostic de la leishmaniose. **Penna (1934):** Premier enregistrement de la LV amazonienne. **Chagas (1936):** Description de la LV au Brésil. **Cunha et Chagas (1937):** Isolement de *L. chagasi* du la LV du Brésil. **Swaminath et collègues (1942):** Démontrent le processus de la transmission de *Leishmania* aux humains par des phlébotomes à l'aide d'un groupe de volontaires. **Hoare (1948):** Démontre le développement de *Leishmania* dans les phlébotomes (les parasites sont libérés et se multiplient dans l'intestin des phlébotomes) ; Référence à *T. cruzi*). **Kirk (1949):** Classification de *Leishmania* selon leur morphologie, leurs caractéristiques culturelles, les aspects cliniques et épidémiologiques des infections chez l'homme et d'autres hôtes naturels, l'immunité croisée, les tests sérologiques et la xénodifférenciation. Nomenclature complète du genre *Leishmania*.

### ▪ Seconde moitié du XXe siècle

**Biagi (1953):** Description de diverses espèces de *Leishmania*. **Pessôa (1961):** Présente la première liste des espèces de *Leishmania* connues dans les Amériques. Utilisation du système trinomial pour *Leishmania*. **Adler (1962):** Signale des infections cryptiques transitoires chez la souris par *L. adleri*, qui infecte généralement les lézards, qui conduisent à la proposition de l'évolution des espèces de *Leishmania* infectant maintenant les mammifères. **Adler (1963 et 1964):** Différenciation entre *L. tropica*, *L. mexicana*, et *L. brésiliensis* avec des techniques sérologiques. Proposition de taxonomie pour *Leishmania* infectant les humains et les lézards. **Shaw (1964):** Démontre la transmission d'*Endotrypanum schaudinni* par les espèces de phlébotomes du genre *Phlebotomus*. **Hoare et Wallace (1966):** Introduit de nouveaux termes pour la description des stades de développement de *Leishmania*. **Lainson et Shaw (1970):** Subdivisent les espèces de *Leishmania* en deux groupes: « croissance rapide » (*L. mexicana*) et « croissance lente » (*L. brésiliensis*). **Lainson et Shaw (1972):** Première proposition de complexes d'espèces de *Leishmania* Neotropical provoquant la LC : le complexe *mexicana* et le complexe *brésiliensis*. **Schnur et ses collègues (1972):** sérotype *Leishmania* avec des promastigotes excrétés. **Ranquinine (1973):** Première proposition d'un genre distinct pour *Sauroleishmania*. **Bray (1973):** Utilise le concept systématique pour la description des espèces de *Leishmania*. **Vickerman (1976):** Propose qu'un *Leishmania* qui n'infecte pas les mammifères (isolé des reptiles) n'est pas à « strictement » parlé une espèce de *Leishmania*, et lui donne le statut "*Incertae sedis*". **Jardinier (1977):** Propose une taxonomie du genre *Leishmania* qui comprend la nomenclature, la classification des principales espèces et une liste des espèces qui n'infectent pas normalement les humains. **Hommel (1978), Wilson et Southgate (1979):** Considèrent l'identification et la nomenclature sous deux titres de critères taxonomiques « traditionnels » et « modernes ».

## Annexes

Considèrent les parasites qui n'infectent pas les mammifères comme " n'étant pas strictement " des espèces de *Leishmania*. **Lainson et Shaw (1979)**: Proposition de classification révisée pour les espèces de *Leishmania* d'Amérique, en fonction de leurs schémas de développement dans le phlébotome *Lutzomyia longipalpis*. Subdivision en trois groupes: (i) Hypopylaria (*L. agamae* et *L. céraamodactyli*), (ii) Periphyllaria (complexe *L. braziliensis*), (iii) Suprapylaria (complexe *L. donovani*, *L. mexicana*, *L. hertigi*, et *L. tropica*). **Tait (1980)**: Suggère la recombinaison sexuelle chez les trypanosomatides. **Saf'janova (1982)**: Crée un sous-genre de *Leishmania* et propose le terme de *Sauroleishmania* Ranque, 1973 pour les parasites infectant les lézards. **Le Blancq et Peters (1986)**: Considèrent l'analyse des isoenzymes par électrophorèse comme un système discriminatoire pour l'identification de *Leishmania*. **Lainson et Shaw (1987)**: Division du genre *Leishmania* en deux sous-genres, basé sur le modèle de développement de *Leishmania* dans l'intestin de la mouche du sable: *Leishmania* (Suprapylorien) et *Viannia* (Peripylorien). **Rioux et collègues (1990)**: Nouvelle classification du genre *Leishmania* basé sur l'utilisation de caractères intrinsèques et extrinsèques avec des méthodes linnéennes et adansonniennes. **OMS (1990)**: Catégorisation des espèces de *Leishmania* en 3 sous-genres: *Leishmania*, *Sauroleishmania*, et *Viannia*. **Momen (1993)**: Propose le synonyme de *L. chagasi* (responsable de LV dans le Nouveau Monde) et *L. infantum*. **Shaw (1994)**: Propose que le genre *Leishmania* englobent 30 espèces infectant les mammifères et 21 espèces

infectant l'homme. **Cupolillo et ses collègues (1994)**: Décrivent la monophylie du sous-genre *Viannia*. **Dedet et ses collègues (1999)**: Catégorisent l'histoire de la classification de *Leishmania* en quatre périodes de classifications linnéennes, classifications adansonniennes, classifications phénétiques et classifications phylogénétiques.

#### ▪ An 2000 jusqu'à maintenant

**Cupolillo et ses collègues (2000), Schoenian et ses collègues (2010)**: Le genre *Leishmania* est composé de deux groupes: (i) *Euleishmania* (sous-genres *Leishmania* et *Viannia*) et (ii) *Paraleishmania* (les espèces *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. colombiensis*, *L. équatorensis*, *L. herreri*, et *Endotrypanum*). **Moreira et ses collègues (2004)**: Présentent une classification mise à jour des protistes kinetoplastides. **Fraga et ses collègues (2010)**: De nouveaux concepts, basés sur des données moléculaires, concernant la réduction du nombre, la suppression et la dégradation de certaines espèces et ou sous-espèces. **Kuhls et collègues (2011), Leblais et collègues (2011)**: Importation de *L. infantum* (il y a environ 500 ans) de l'Ancien Monde (Portugal) au Nouveau Monde, en raison de la recherche d'un vecteur approprié. **Lukeš et ses collègues (2014)**: La famille des Trypanosomatidae comprend 13 genres: *Trypanosoma*, *Phytomonas*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Sergeia*, *Wallacemonas*, *Blechomonas*, *Angomonas*, *Strigomonas*, et *Kentomonas*.



## Annexes

## Annexe 2. Classification des phlébotomes

En lien avec le [chapitre 1, section 1.2.2.1.](#)

Source : [1]

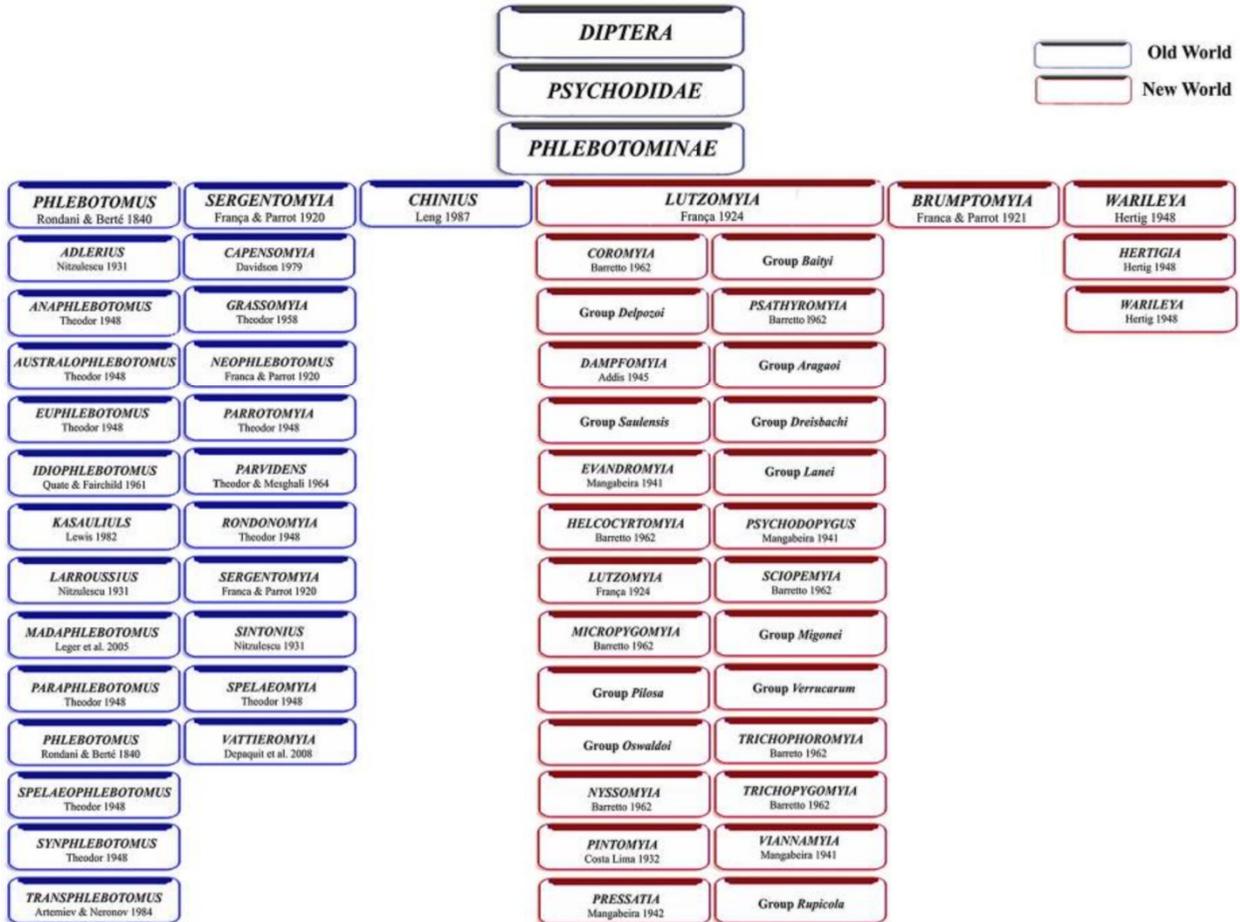


Figure 22. (Annexe 2) Classification des phlébotomes.

## Annexe 3. Histoire de la taxonomie des phlébotomes

En lien avec le [chapitre 1, section 1.2.2.1.](#)

Source : [1]

### ▪ 17ème siècle

**Bonanni (1691)** : Première description reconnaissable d'un insecte phlébotome en tant qu'espèce de *Culex* ou moustique.

### ▪ 18ème siècle

**Linné (1735)** : Description des Angioptères dans l'ordre des insectes qui comprend les mouches tipulaires. **Scopoli (1786)** : Description de *Phlebotomus papatasi* (*Bibio papataci*) comme première espèce de "Psychodidae" décrite, sans mention d'un niveau de classification particulier. **Latreille (1796)** : Description du genre "*Psychoda*" qui diverge de *Bibio* et *Tipula*.

### ▪ Première moitié du XIXe siècle

**Meigen (1818)** : Description de la famille Muchen (*Tipularia*) qui englobe : *Eulermuchen*, *Gallmucken* (*Gallicolae*). **Latreille (1825)** : Transformation des *Tipulariae* en *Nemocera* (*Nematocera*) famille qui comprenait la tribu des *Tipulariae* et le groupe des *Gallicolae* (*Psychode*). **Newman (1834)** : genre *Psychoda* rassemblé dans l'ordre des Psychodite (actuellement connu sous le nom de *Psychodidae*). **Rondani (1840)** : A nommé les phlébotomes "Flebotomus" et les a mis dans la tribu des *Flebotomidae*, famille des *Flebotominae*. Rebaptisé plus tard "Phlebotomus" par Lewis (1845). **Rondani (1843)** : Comprend les phlébotomes de la tribu des *Tipulidae*, famille des *Hebotomina*. **Loew (1844)** : Description d'*Haemasson minutus* (*Sergentomyia minuta*) de la famille des "*Tipularia gallicola*", *Psychodina*. **Walker (1848)** : Rassemble *Psychoda* et *Sycorax* dans la famille de *Tipularia*, *Noctuaeforme*. **Zetterstedt (1850)** : inclut le genre *Psychoda* dans la famille des *Psychodidae*.

### ▪ Seconde moitié du 19ème siècle

**Walker (1851)** : considère les *Phlebotomidae* comme une famille appartenant aux Diptères. **Bigot (1854)**, **Rondani (1864)**, **Schiner (1864)** : ont réuni *Phlebotomus*, *Psychoda* et quelques autres genres de la famille des *Psychodidae*. **Rondani (1856)** : Séparation des *Phlebotomidae* en *Phlebotomina* et *Psychodina*. **Walker (1856)** : A rassemblé *Sycorax* et *Psychoda* et quelques autres genres de la famille des *Phlebotomidae*. **Loew (1862)** : Subdivise la famille des *Psychodidae* en *Psychodina* et *Phlebotomina*. **Philippi (1865)** : Inclusion du genre *Psychoda* dans la "*Tipularia gallicola*" famille. **Hennig (1872)** : Propose d'utiliser le nom "Psychodites" comme nom générique des phlébotomes fossiles. **Rondani (1873)** : Classification des phlébotomes dans la tribu des *Tipulidae*, famille des *Hebotomina* (probablement une erreur de syntaxe). **Eaton (1895)**, **Kertész (1902)** : subdivisent les *Psychodidae* en sous-familles *Psychodinae* et *Phlebotominae*.

### ▪ Première moitié du 20e siècle

**Kertész (1903)** : Inclut *Phlebotomus* et *Sycorax* dans la sous-famille des *Phlebotominae*. **Newstead (1911)** : Première étude systématique du genre *Phlebotomus*. Subdivision des phlébotomes basée sur les poils dorsaux de l'abdomen : dressés ou couchés. **Franca (1919, 1920)** : espèces de phlébotomes subdivisées en sous-genres *Phlebotomus* et *Prophlebotomus*. Formation du 1er sous-genre du Nouveau Monde « *Lutzia* », englobant *Phlebotomus longipalpis* *Lutz* et *Neiva*, 1912. **Franca et Parrot (1921)** : Utilisent la phlébotométrie

pour subdiviser *Phlebotomus* en 5 sous-genres : *Phlebotomus*, *Prophlebotomus*, *Brumptomyia*, *Lutzia* (*Lutzomyia*) et *Sergentomyia*. **Franca (1921)** : propose 3 sous-genres : *Phlebotomus*, *Sergentomyia* et *Lutzia*. **Tonnoir (1922)** : A séparé *Trichomyia* et *Sycorax* des *Phlebotominae* et les a inclus dans la sous-famille des *Trichomyiinae*. **Franca (1924)** : Substitue le nom *Lutzia* à *Lutzomyia*. **Adler et Théodore (1926)** : Mise en évidence de la valeur taxonomique des armatures pharyngiennes et de la morphologie des spermathèques. **Sinton (1928)** : A noté une corrélation entre les espèces définies par Newstead sur la base des poils dressés ou couchés et la morphologie des spermathèques femelles. Les phlébotomes ont été divisés en trois groupes : les espèces à poil dressé, à poil couché et intermédiaires. **Dyar (1929)** : Mise à jour des connaissances des *flebotominae* américains, proposant *Brumptomyia* (espèce type : *P. brumpti*), *Lutzomyia*, *Neophlebotomus* (espèce type : *P. malabaricus*) et *Shannonomyia* (espèce type : *P. panamensis*) sous-genres. **Adler et Theodor (1929)** : ont défini les phlébotomes comme un membre formel de la famille des *Phlebotomidae*. **Nitzulescu (1931)** : Description des sous-genres *Larrousius* et *Adlerius*, basée sur l'armature pharyngée et la structure des spermathèques. Cinq sous-genres proposés : *Phlebotomus* s. str., *Larrousius* (espèce type : *P. major*), *Adlerius* (espèce type : *P. chinensis*), *Sintonius* (espèce type : *P. hospittii*) et *Brumptius* (espèce type : *P. \_ minute*). **Sinton (1931)** : premières clés d'identification illustrées des phlébotomes du sous-continent indien. **Theodor (1932)** : sous-famille des *Phlebotominae* composée de trois tribus, subdivisées en genres et sous-genres. **Parrot (1934)** : genre *Phlebotomus* avec deux sous-genres : *Phlebotomus* et *Prophlebotomus*. **Raynal (1935)** : Tentative de classification basée sur la structure des spermathèques, les organes génitaux masculins et la morphologie du pharynx. **Mangabeira (1942)** : Création de cinq sous-genres pour les espèces de phlébotomes américains : *Evandromyia*, *Psychodopigus*, *Viannomyia*, *Pressatia* et *Castromyia*. **Dampf (1944)** : A mis *Prophlebotomus* et *Brumptius* en synonymie avec *Sergentomyia*, en accord avec les sous-genres *Brumptomyia*, *Shannonomyia*, *Castromyia* et *Pintomyia*. **Addis (1945)** : Création de *Dampfomyia* en tant que nouveau sous-genre néotropical. **Kirk et Lewis (1946)** : modification de la classification de Parrot (1934) et proposition de trois sous-genres : *Phlebotomus*, *Sintonius* et *Prophlebotomus*. **Théodore (1948)** : A noté que deux périodes distinctes caractérisent les progrès de la taxonomie des phlébotomes : la première qui utilise des caractères morphologiques externes (phlébotométrie) et la seconde qui utilise des caractères internes. 4 genres : *Phlebotomus* et *Sergentomyia* (Ancien Monde), *Lutzomyia* et *Brumptomyia* (Nouveau Monde). Description de 6 sous-genres (*Paraphlebotomus*, *Synphlebotomus*, *Euphlebotomus*, *Anaphlebotomus*, *Australophlebotomus* et *Spelaeophlebotomus*) qui, avec trois déjà décrits (*Phlebotomus*, *Larrousius*, et *Adlerius*) a fait 9 sous-genres au total. Subdivise le genre *Sergentomyia* en 3 sous-genres (*Sergentomyia*, *Sintonius* et *Spelaeomyia*). **Hertig (1948)**, **Fairchild (1949)** : Description des genres *Warleya* (espèce type : *W. phlebotomanica*) et *Hertigia* (espèce type : *H. hertigi*).

### ▪ deuxième moitié du 20e siècle

**Jung (1954)** : Définit la sous-famille des *Sycoracinae*. **Barretto (1955)** : Contesté la classification de Theodor, propose les genres

## Annexes

*Brumptomyia* et *Warileya* comme étant constitutifs des espèces du Nouveau Monde (166 espèces pour l'Ancien Monde et 199 du Nouveau Monde). **Fairchild (1955)** : Subdivise Psychodidae en Phlebotominae (*Nemopalpus* et *Bruchomyia*), Trichomyiinae (*Horaiella* et *Sycorax* et autres), et Psychodina. **Theodor (1958)** : *Parrotomyia*, *Rondanomyia* et *Grassomyia* comme nouveaux sous-genres du genre *Sergentomyia*. **Quate et Fairchild (1961)** : Ajout d'*Idiophlebotomus* comme nouveau sous-genre du genre *Phlebotomus*. **Barretto (1961)** : A déclaré que les phlébotomes du Nouveau et de l'Ancien Monde doivent être phylogénétiquement distincts. Création du sous-genre *Trichopygomyia* dans le genre *Lutzomyia*. **Barretto (1962)** : Confirmation des genres *Warileya*, *Brumptomyia* et *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde et subdivision de *Lutzomyia* en quinze sous-genres : *Lutzomyia* s.str., *Pintomyia*, *Evandromyia*, *Psychodopygus*, *Viannamyia*, *Pressatia*, *Dampfomyia*, *Micropygomyia*, *Sciopomyia*, *Helcocyrtomyia*, *Trichophoromyia*, *Coromyia*, *Trichopygomyia*, *Nyssomyia* et *Psathyromyia*. **Theodor et Mesghali (1964)** : *Parvidens* comme nouveau sous-genre de *Sergentomyia*. **Rohdendorf (1964)** : Inclut les phlébotomes dans la famille des Phlebotomidae. Sépare les phlébotomes des autres Psychodidae en raison de leur habitude de se nourrir de sang. **Théodore (1965)** : *Hertigia*, *Warileya*, *Brumptomyia* et *Lutzomyia* pour le Nouveau Monde. Subdivision de *Lutzomyia* en huit sous-genres et 16 groupes d'espèces. **Perfil'ev (1966)** : A proposé une taxonomie basée sur des caractères externes (phlébotométrie) et des structures internes (par exemple, cibarium, pharynx ou spermathèque). **Lewis (1971)** : D'accord avec Perfil'ev (1966), a divisé les Phlebotomidae en six genres (deux dans l'Ancien Monde et quatre dans le Nouveau Monde). Subdivise le genre *Phlebotomus* en 11 sous-genres et *Sergentomyia* en six. **Forattini (1971)** : Sept genres proposés pour les phlébotomes du Nouveau Monde : *Brumptomyia*, *Lutzomyia*, *Pintomyia*, *Psychodopygus*, *Viannamyia*, *Pressatia* et *Warileya*. Divise le genre *Lutzomyia* en six sous-genres : *Lutzomyia*, *Dampfomyia*, *Micropygomyia*, *Coromyia*, *Trichopygomyia* et *Barretto*. **Hennig (1972)** : Considérait les Phlebotominae comme un groupe monophylétique composé de trois genres monophylétiques : *Phlebotomus*, *Sergentomyia* (sans *Parvidens*), et un genre rassemblant des espèces des *Brumptomyia* et les genres *Lutzomyia*. A reconnu les sous-familles Bruchomyiinae, Phlebotominae, Trichomyiinae et Psychodinae au sein de la famille des Psychodidae. La famille Trichomyiinae comprend trois genres éteints (*Eophlebotomus*, *Eatonisca*, *Pasthon*) et trois genres existants (*Horaiella*, *Sycorax*, *Trichomyia*). **Abonnenc (1972)** : accord avec la classification de Fairchild (1955), ne reconnaît que trois genres : *Phlebotomus*, *Warileya* et *Hertigia*. Rassemblé *Spelaophlebotomus* et *Idiophlebotomus* dans le genre *Phlebotomus*. A élevé les sous-genres *Phlebotomus*, *Sergentomyia* et *Lutzomyia* au rang de générique. **Hennig (1973)** : Considérait la superfamille des Psychodoidea comme un infra-ordre monophylétique de Psychodomorpha. **Duckhouse (1973)** : Six sous-familles pour la famille des Psychodidae : Phlebotominae, Bruchomyiinae, Sycoracinae, Trichomyiinae, Horaellinae et Psychodinae. **Forattini (1973)** : Considéré *Phlebotomus*, *Sergentomyia* et *Lutzomyia* comme des genres. A rassemblé le genre *Hertigia* au sein de la sous-famille des Bruchomyiinae. Dix genres proposés pour la sous-famille des Phlebotominae. **Lewis (1973)** : inclus *Hertigia* (actuellement connu sous le nom de *Warileya*) dans la sous-famille des Phlebotominae. **Young et Fairchild (1974)** : ont proposé une classification similaire à Theodor (1965), avec quelques modifications. **Lewis (1974)** : Six

genres pour la sous-famille des Phlebotomidae (deux pour les espèces de l'Ancien Monde et quatre pour celles du Nouveau Monde). **Lewis (1975)** : 11 sous-genres pour *Phlebotomus* et six pour *Sergentomyia*. **Abonnenc et Leger (1976)** : La famille des Phlebotomidae avec trois sous-familles : Euphlebotominae (uniquement Ancien Monde), Neophlebotominae (uniquement Nouveau Monde), et Disphlebotominae (Ancien et Nouveau Monde). **Lewis et ses collègues (1977)**, **Lewis (1978)** : Première classification stable des Phlebotominae avec cinq genres : *Warileya* (deux sous-genres), *Phlebotomus* (dix sous-genres), *Sergentomyia* (sept sous-genres avec 54 espèces non placées), *Brumptomyia* et *Lutzomyia* (26 sous-genres et 19 espèces non placées). **Ready et ses collègues (1980)** : ont proposé une classification "flexible" avec des caractères "exclusifs" soutenant les genres proposés de *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Brumptomyia*, *Warileya* et *Psychodopygus*, sans tenir compte de *Lutzomyia*. **Lewis (1982)** : Décrit et ajouté un nouveau sous-genre, *Kasaulius*. Publication d'une carte de répartition des phlébotomes de l'Ancien Monde. **Artemiev et Neronov (1984)** : 14 genres pour Phlebotominae : *Australophlebotomus*, *Brumptomyia*, *Demeillonius*, *Grassomyia*, *Hertigia*, *Idiophlebotomus*, *Lutzomyia*, *Parvidens*, *Phlebotomus*, *Psychodopygus*, *Sergentomyia*, *Spelaomyia*, *Spelaophlebotomus* et *Warileya*. Description du sous-genre *Transphlebotomus*. **Leng (1987)** : Description du nouveau genre de *Chinius*. **Artemiev (1991)** : Deux tribus, sept sous-tribus, 24 genres, 40 sous-genres et 70 espèces constituent la sous-famille des Phlebotominae. Divisé les phlébotomes de l'Ancien Monde en *Phlebotomus*, *Australophlebotomus*, *Idiophlebotomus*, *Spelaophlebotomus*, *Sergentomyia*, *Spelaomyia*, *Chinius* et *Parvidens*. Lane (1993) : Genre *Phlebotomus* composé de 12 sous-genres. Ajout du genre *Chinius* dans la sous-famille des Phlebotominae. **Jeune et Duncan (1994)** : phlébotomes néotropicaux composés de *Lutzomyia*, *Brumptomyia* et *Warileya*. **Galati (1995)** : Création d'une nouvelle sous-tribu (*Sergentomyiina*) regroupant des espèces du genre *Sergentomyia* et quelques espèces piqueuses de reptiles du genre *Lutzomyia*. Division des Phlebotominae en tribus Hertigiini (*Hertigiina*, *Idiophlebotomina*) et Phlebotomini (*Phlebotomina*, *Australophlebotomina*, *Brumptomyiina*, *Sergentomyiina*, *Lutzomyiina* et *Psychodopygina*). **Rispail et Léger (1998)** : Sept genres proposés pour les phlébotomes Phlebotominae : *Phlebotomus*, *Australophlebotomus*, *Idiophlebotomus*, *Spelaophlebotomus*, *Sergentomyia*, *Spelaomyia* et *Chinius*. Le genre *Phlebotomus* comprend neuf sous-genres : *Adlerius*, *Anaphlebotomus*, *Euphlebotomus*, *Kasaulius*, *Larrousius*, *Paraphlebotomus*, *Phlebotomus*, *Synphlebotomus* et *Transphlebotomus*. Le genre *Sergentomyia* comprend six sous-genres : *Demeillonius*, *Grassomyia*, *Neophlebotomus*, *Parrotomyia*, *Sergentomyia* et *Sintonius*.

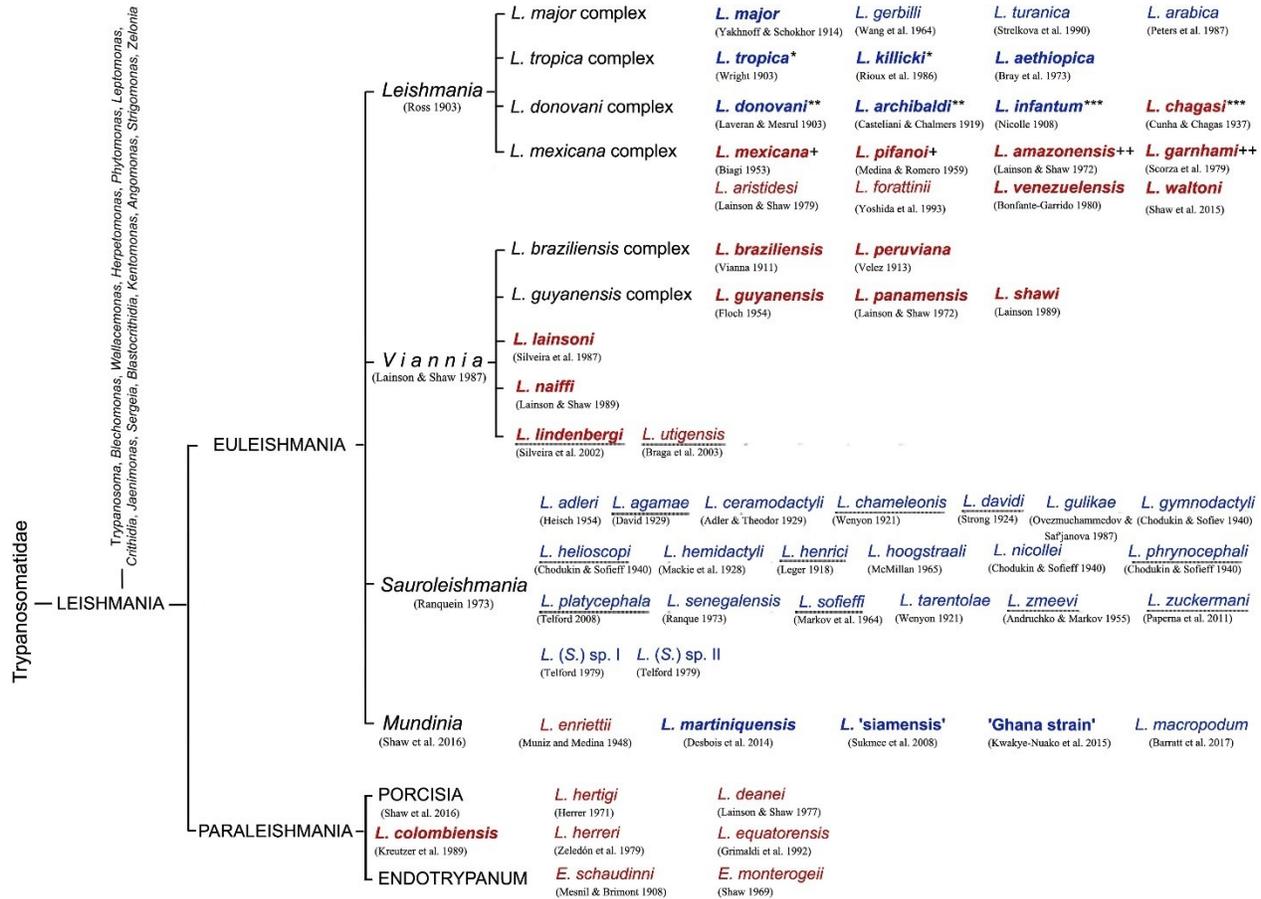
#### ■ 2000 jusqu'à maintenant

**Galati (2003)** : Propose de subdiviser la famille Phlebotominae en deux tribus : Hertigiini (sous-tribus de Hertigiina et Idiophlebotomina) et Phlebotomini (sous-tribus de Phlebotomina, Australophlebotomina, Brumptomyiina, Sergentomyiina, Lutzomyiina et Psychodopygina). **Galati (2009)** : mis à niveau de nombreux sous-genres *Lutzomyia*, cités dans Young et Duncan, 1994, vers un statut générique. **Galati (2014)** : révision de la classification proposée par Galati, 2003, conduisant à une augmentation du nombre de genres.

## Annexes

Annexe 4. Classification des espèces de *Leishmania*En lien avec le [chapitre 2, section 2.1.2.](#)

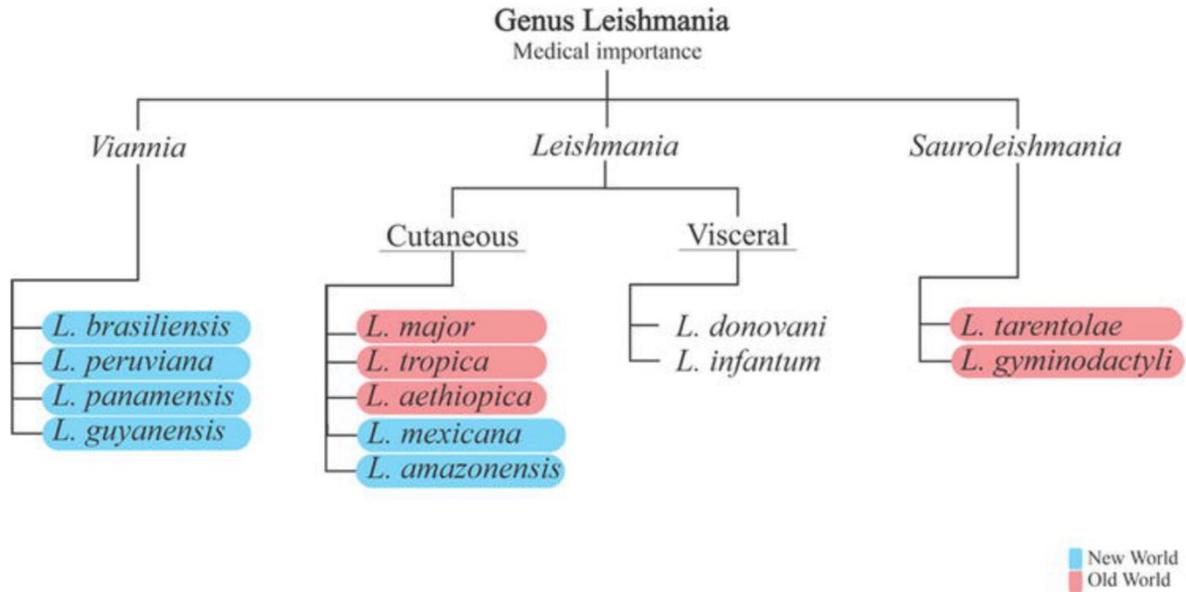
Source : [58]

Figure 23. (Annexe 4) Classification des espèces de *Leishmania*.

## Annexe 5. Espèces de *Leishmania* les plus étudiées

En lien avec le [chapitre 2, section 2.1.2.](#)

Source : [1126]



**Figure 24.** (Annexe 5) Classification des espèces de *Leishmania* les plus étudiées.

## Annexes

Annexe 6. Protéines ABC impliquées dans la résistance de *Leishmania*En lien avec le [chapitre 4, section 4.3.1.3.](#)

Source : [1127]

Protéine ABC	<i>Leishmania</i> spp.	Médicament(s)	Localisation cellulaire
ABCB4 (MDR1)	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. enrietti</i> , <i>L. donovani</i> , <i>L. tropica</i>	Puromycin Miltefosine	Appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, tubule multivésiculaire-lysosome et mitochondries
ABCC3 (PGPA/MRPA)	<i>L. major</i> , <i>L. tarentolae</i> , <i>L. infantum</i>	Antimoine (Sb <sup>III</sup> et Sb <sup>V</sup> )	Vésicules entre le noyau et la poche flagellaire
ABCC4	<i>L. infantum</i>	Antimoine (Sb <sup>III</sup> )	Compartiment tubulaire orienté selon l'axe longitudinal du parasite
ABCC5	<i>L. infantum</i>	Antimoine (Sb <sup>III</sup> )	Compartiment tubulaire orienté selon l'axe longitudinal du parasite
ABCC7 (PRP1)	<i>L. major</i>	Pentamidine Antimoine (Sb <sup>III</sup> )	Vésicules intracellulaires
ABCG4	<i>L. infantum</i>	Miltefosine	Membrane plasmique et poche flagellaire
ABCG6	<i>L. donovani</i> , <i>L. infantum</i>	Miltefosine	Membrane plasmique et poche flagellaire

Tableau 3. (Annexe 6) Exemples de protéines ABC impliquées dans la résistance de *Leishmania*.

## Annexe 7. Méthodes *in silico* pour la découverte de nouveaux médicaments

En lien avec le [chapitre 5, section 5.1.1.](#)

Sources : [1128-1139]

Méthodes	Descriptions
Analyses de réseaux	Cette approche repose sur la génération d'un réseau spécifique complexe issus de données génomiques, pharmacogénomiques, métabolomiques et protéomiques. Le réseau spécifique à la maladie étudiée permet ensuite d'élucider les nœuds essentiels qui pourraient être utilisés comme cibles thérapeutiques (en raison de leur influence au sein du réseau) [1128].
Exploration de données et apprentissage automatique	Il s'agit de la prédiction de cibles médicamenteuses grâce à l'exploration et à l'analyse de données protéomiques, chimiogénomiques et de micro-réseaux [1129]. Dans cette méthode, l'apprentissage automatique correspond au processus par lequel l'ordinateur développe la reconnaissance de schémas biologiques précis, lui permettant par la suite d'effectuer des prévisions à partir des données analysées.
Amarrage moléculaire (criblage virtuel)	Cette méthode permet d'identifier des protéines de liaison putatives sur de petites molécules dotées d'une activité biologique connue [1130]. Le principe repose sur l'ancrage d'un médicament/ligand aux molécules vues comme des cibles moléculaires potentielles [1131], et sur l'obtention des conformations de liaison 3D les plus favorables du ligand à la cible [1132].
Analyse des spectres d'activité biologique (Biospectra)	Il s'agit d'une technique qui permet d'étudier les activités fonctionnelles des molécules sur des cibles médicamenteuses potentielles [1133, 1134], et d'obtenir la corrélation entre les structures moléculaires et les effets biologiques et potentiellement thérapeutiques de ces molécules. De plus, grâce au concept de similarité de structure chimique, cette méthode permet de prédire les cibles médicamenteuses des composés orphelins [1134].
Approche basée sur les ligands	Elle permet la découverte de médicaments à base de ligands. Elle repose essentiellement sur le concept de similarité de structure chimique selon lequel des ligands ou des composés similaires peuvent se lier aux mêmes cibles et exprimer des réponses biologiques identiques [1135].
Approche basée sur la cible	Cette méthode utilise les structures 3D de cibles protéiques pour étudier les interactions et les conformations complexes protéines-ligands. Elle permet ainsi d'identifier les ligands potentiels des cibles protéiques étudiées et d'éventuels composés médicamenteux (revu par [1136]).
Analyse génomique	Cette approche repose sur l'analyse des associations entre des données génétiques et des phénotypes spécifiques (revu par [1136]). Elle permet d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles telles que des gènes conservés [1137] et des gènes essentiels putatifs [1138] qui affectent la viabilité cellulaire des agents pathogènes. Toutefois, pour être efficace contre le pathogène et non délétère envers l'hôte, la cible ne doit pas avoir d'homologue conservé chez l'hôte (revu par [1139]) ; une difficulté supplémentaire à prendre en compte dans les analyses.

**Tableau 4.** (Annexe 7) Principales méthodes *in silico* pour la recherche de nouveaux traitements.

## Annexes

## Annexe 8. Exemples de traitements combinés contre la leishmaniose

En lien avec le [chapitre 5, section 5.6.](#)

Sources : [716, 1140-1145]

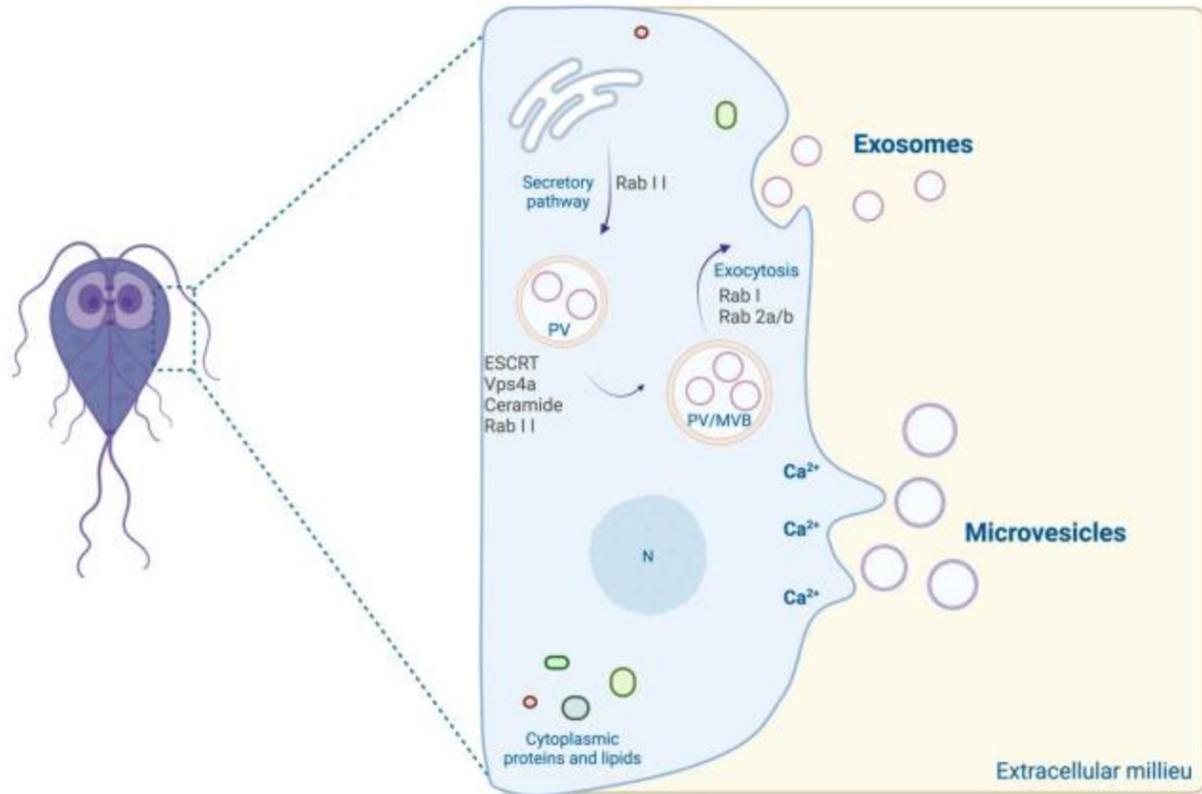
Combinaisons	Remarques
Amphotéricine B + Miltefosine	Des essais ont été réalisés très tôt au Bihar (Inde). La combinaison consiste en l'administration d'une dose unique d'amphotéricine B liposomale suivie de plusieurs administrations de miltefosine (pendant 7 à 14 jours) [1140]. D'autres essais réalisés en 2008 ont montré un taux de guérison de plus de 97% [1141].
Stibogluconate de sodium + Paromomycine	C'est le traitement de première intention en Afrique de l'Est et au Yémen (OMS, 2010) [716]. Un taux de guérison de 86% a été constaté [1142].
Amphotéricine B + Paromomycine	La combinaison consiste en l'administration d'une dose unique d'amphotéricine B liposomale suivie d'une cure de 10 jours de paromomycine intramusculaire [1141]. Un taux de guérison de 97% a été observé [1141].
Miltefosine + Paromomycine	La combinaison consiste en l'administration de miltefosine et de paromomycine pendant 10 jours [1141]. Un taux de guérison de 98% a été observé [1141].
Antimoine pentavalent + Pentoxifylline*	Des essais ont été réalisés et ils se sont avérés efficaces contre la leishmaniose cutanée [1143] et muco-cutanée [1144, 1145].

**Tableau 5.** (Annexe 8) Exemples de traitements combinés contre la leishmaniose  
(\*inhibiteur du facteur de nécrose tumorale alpha).

## Annexe 9. Proposition de biogénèse des exosomes de *Giardia*

En lien avec le [chapitre 6, section 6.2.1.1.](#)

Sources : [777]



**Figure 25.** (Annexe 9) Proposition de biogénèse des exosomes de *Giardia*

(PV : vacuoles périphériques ; ESCRT : complexes de tri endosomaux nécessaires au transport ; MVB : corps multivésiculaires ; N : noyau)

## Annexe 10. Chargement « endogène » des vésicules extracellulaires

En lien avec le [chapitre 7, section 7.2.3.](#)

Sources : incluses dans le texte (ci-dessous)

Le chargement endogène consiste à utiliser des systèmes sur les cellules productrices d'EVs, afin de moduler le contenu intracellulaire qui formera la cargaison des EVs (revu par [1006]). L'une des stratégies les plus utilisées pour ce type de chargement (en particulier pour incorporer des acides nucléiques thérapeutiques) est la **transfection cellulaire** [892, 1007-1009]. Bien que moins répandues, d'autres méthodes ont également été proposées, telles qu'une **approche ciblée et modulaire** du chargement des EVs [1010] et revu par [1006], l'utilisation de **mécanismes d'encapsulation virale** [1011], ou encore l'utilisation d'**ancres membranaires** [1012].

### 1. Transfection cellulaire

Le chargement endogène des EVs a largement été utilisé pour incorporer des ARNm [1007, 1146], des miARNs (naturels [1147-1149] ou modifiés chimiquement [1150]) et des petits ARNs [1148]. La stratégie la plus fréquemment utilisée consiste à transfecter des oligonucléotides synthétiques ou exprimées à partir d'un squelette plasmidique, directement dans les cellules productrices d'EVs [1007]. Ces transfections peuvent être réalisées en utilisant la méthode au phosphate de calcium [1151, 1152] ou à l'aide de réactifs lipidiques disponibles dans le commerce (tels que la Lipofectamine, l'HiPerFect ou l'Exofec [1153, 1154]). A titre d'exemples, des travaux ont favorisé le chargement d'ARNm thérapeutiques en transfectant des cellules productrices d'EVs avec des ARNs interférents (ARNi) fonctionnels [1008, 1009]. D'autres études ont démontré que les miARNs thérapeutiques peuvent être chargés efficacement dans les EVs grâce à des transfections de squelettes d'expression de miARNs ou des transfections directes de précurseurs ou d'oligonucléotides mimic/antimiR [1147, 1150, 1155, 1156]. Finalement, la transfection d'un microARN chimiquement modifié (le miR-143 modifié) a aussi permis son chargement dans les EVs produits, soulignant l'efficacité de la méthode, autant pour les miARNs naturels que pour les miARNs modifiés [1157]. De façon générale, les effets résultants de ces transfections ont constitué des stratégies thérapeutiques prometteuses dans le traitement de diverses pathologies.

### 2. Approche ciblée et modulaire du chargement des EVs

Une autre stratégie utilisée pour le chargement endogène des EVs est l'affichage de protéines et de peptides cargo à la surface des EVs (revu par [1006]). Dans ce contexte, des travaux ont développé une approche « *ciblée et modulaire du chargement des EVs* » (aussi appelée approche « TAMEL » pour « *Targeted And Modular EVs Loading* »), qui consiste en la fusion génétique d'une protéine (naturellement présente dans les EVs) avec un ARN cargo [1010] et revu par [1006]. Bien que cette méthode ait permise une incorporation efficace d'ARNs thérapeutiques dans les EVs, des limites ont été observées. Néanmoins, l'approche TAMEL propose un moyen unique de charger des molécules d'ARNs dans les EVs et pourra servir de support pour d'autres études.

### 3. Particules hybrides virus-EVs

Une autre approche étudiée pour favoriser le chargement en acides nucléiques, consiste en l'utilisation de mécanismes d'encapsulation virale. Divers virus sont capables de détourner les membranes

cellulaires afin d'améliorer l'efficacité de leur propagation, c'est pourquoi la création de particules hybrides virus-EVs (aussi appelées « *vexosomes* ») constituent actuellement un nouveau système de transports potentiels pour la thérapie génique [1011]. De plus, ces particules hybrides combinent les avantages respectifs des EVs (faible immunogénicité, ciblage) et des virus (expression génique stable). Ainsi, des virus non enveloppés, tels que le virus de l'hépatite A [1158] et le virus adéno-associé (ou « AAV », pour « *Adeno Associated Virus* ») [1011], ont par exemple été utilisés dans cette approche [1011]. Une étude a également précisé que l'injection systémique de vexosomes chez la souris permettait un passage facile des particules hybrides à travers la barrière hémato-encéphalique, et donc une meilleure livraison aux cellules du système nerveux central (SNC) [1159]. Ces résultats ont ainsi souligné le potentiel thérapeutique des vexosomes pour la délivrance de gènes (en particulier aux cellules du SNC, souvent difficiles à atteindre).

### 4. Ancres membranaires

Finalement, des travaux s'intéressant aux voies de tri des protéines exosomales ont montré que l'utilisation d'ancres membranaires permettait le ciblage et l'incorporation spécifique de protéines dans des cellules productrices d'EVs [1012]. Cette approche permettrait de générer une cargaison exosomale synthétique et adaptée à des fins thérapeutiques.

### 5. Principales limites

Malgré les résultats prometteurs obtenus dans les différentes approches proposées pour le chargement endogène des EVs, ce type de chargement présente généralement une acceptabilité pharmaceutique restreinte, notamment en raison du manque de contrôle des cargaisons. En effet, quelle que soit la méthode utilisée, des molécules non-désirées peuvent être incorporées dans les EVs et empêcher et/ou modifier les effets thérapeutiques souhaités (revu par [1006]). D'autre part, même si les résultats obtenus pour les différentes approches ont validé l'efficacité du chargement des ARNs (revu par [1160]), il est important de considérer que les petits ARNs, (notamment les miARNs) peuvent être libérés des cellules *via* de multiples voies, et que la majorité d'entre eux ne sont d'ailleurs pas forcément associés aux EVs, mais plutôt à des complexes protéiques protecteurs (tels que les complexes Argonaute-2) [1161]. Par conséquent, la transfection de cellules exprimant des siARNs ne permet pas, à elle seule, la discrimination entre les petits ARNs associés aux EVs et ceux associés aux protéines (revu par [1160]) ; ce qui peut donc limiter les stratégies thérapeutiques visées. Par ailleurs, d'autres limites ont été rapportées, en particulier la difficulté à distinguer les effets causés par un ARNm d'intérêt incorporé dans des EVs, de ceux causés par la protéine codée par cet ARNm [1007], ou encore les effets indésirables survenus lors de tests *in vivo*. Néanmoins, les avantages du chargement endogène (tels qu'un système cellulaire complet et évolutif, une cargaison thérapeutique qui est directement chargée dans les EVs, ou encore des approches à faibles coûts), motivent l'optimisation des techniques utilisées pour parvenir à exploiter au mieux le potentiel thérapeutique des EVs.

## Annexe 11. Chargement « exogène » des vésicules extracellulaires

En lien avec le [chapitre 7, section 7.2.3.](#)

Sources : incluses dans le texte (ci-dessous)

Cette approche fait référence au chargement spécifique d'EVs isolés et purifiés, à l'aide de procédures contrôlables et donc plus « acceptables » sur le plan pharmaceutique (revu par [979, 1013]). Dans cette approche, les méthodes proposées sont les suivantes : la perméabilisation membranaire par électroporation ([1014-1018], à l'aide de saponine [1019-1022], par dialyse hypotonique [1022, 1023]), et la conjugaison du cholestérol à des siARNs [1024, 1025].

### 1. L'électroporation

L'électroporation est une méthode qui permet l'induction de pores transitoires dans la membrane des EVs, et facilite le chargement de la cargaison. Plusieurs études ont utilisé cette stratégie pour charger des siARNs [1014, 1015], de l'ADNdb [1016], des médicaments [1017], et des drogues synthétiques [1018]. Par exemple, chez la souris, l'injection intrapéritonéale d'EXOs chargés de curcumine a entraîné une protection contre le choc septique induit par les lipopolysaccharides [1018], des EVs de CSMs chargées en paclitaxel ont été capables d'inhiber la croissance tumorale *in vitro* [1162], et des EXOs chargés en doxorubicine ont entraîné une inhibition de la croissance tumorale sans toxicité manifeste [1017]. De même, des EXOs chargés de doxorubicine ont entraîné une inhibition remarquable de la croissance tumorale par rapport aux EXOs vierges et à la doxorubicine libre. De plus, la chaleur générée lors de l'électroporation n'endommage pas la membrane des EVs, ce qui en fait un avantage clé et renforce le potentiel thérapeutique de la méthode (revu par [1163]).

### 2. Perméabilisation membranaire à l'aide de saponine

Une autre approche utilisée et basée sur la perméabilisation membranaire, est l'utilisation de saponine. Cette molécule, semblable à un détergent, interagit avec la membrane et y forme des pores (sans la détruire), en éliminant le cholestérol [1019, 1020]. Cette technique a par exemple été utilisée pour le traitement de la maladie de Parkinson [1021]. Plus précisément, les auteurs ont utilisé la saponine pour charger de la catalase dans des EXOs dérivés de macrophages. La catalase est une enzyme antioxydante connue pour protéger le tissu neuronal du stress oxydatif et de la dégradation neuronale [1164, 1165]. Les résultats obtenus dans les travaux de Haney et al., ont ainsi montré des effets neuroprotecteurs significatifs, dans des modèles *in vitro* et *in vivo* [1021]. Une autre étude a utilisé la saponine pour incorporer des porphyrines (utilisées comme médicaments modèles) dans des EVs, et a aussi obtenu des résultats prometteurs [1022]. Toutefois, même si la perméabilisation membranaire par l'action de la saponine est une méthode qui permet le chargement facile et fonctionnel des EVs avec des protéines thérapeutiques, peu d'études ont actuellement recouru à cette stratégie.

### 3. Dialyse hypotonique

De même que les approches précédentes, la dialyse hypotonique consiste en la formation de pores dans la membrane des EVs, afin d'y permettre l'entrée d'agents thérapeutiques. Dans cette méthode, deux étapes successives sont nécessaires : (1) la dispersion des EVs dans une solution hypotonique, afin de permettre le gonflement de la membrane et sa perméabilité aux agents thérapeutiques solubles ; (2) la dispersion des EVs dans une solution isotonique, afin de restaurer l'intégrité de leur membrane et de permettre l'encapsulation des agents thérapeutiques

(revu par [1023]). Fuhrmann et al., [1022] ont également utilisé cette méthode pour incorporer les porphyrines et les résultats obtenus étaient tout autant prometteurs.

### 4. Conjugaison du cholestérol

Certaines modifications chimiques de siARNs permettent d'améliorer la stabilité et de favoriser l'internalisation cellulaire [1166]. D'autre part, la conjugaison du cholestérol à ces oligonucléotides modifiés permet une association membranaire rapide et efficace (revu par [1167]). Dans leurs travaux, Didiot et al., [1168] ont ainsi démontré que les siARNs modifiés et conjugués au cholestérol se lient efficacement aux membranes cellulaires, pénètrent dans les cellules et induisent un puissant silencing génique. Après l'obtention de ces résultats prometteurs, les auteurs ont utilisé l'approche de la conjugaison du cholestérol avec des siARNs modifiés, afin d'incorporer efficacement ces oligonucléotides dans des EXOs purifiés [1024]. Les vésicules chargées ont ensuite été utilisées à des fins thérapeutiques et les résultats obtenus se sont avérés prometteurs pour le traitement des troubles neurodégénératifs. Dans leur étude, Stremersch et al., [1025] ont utilisé la même approche, mais bien que les oligonucléotides thérapeutiques aient été chargés efficacement dans les EVs, ils n'ont pas été délivrés de manière fonctionnelle aux cellules receveuses. L'incohérence d'efficacité entre les travaux de Didiot et al., [1024] et ceux de Stremersch et al., [1025] reste floue et proviendrait probablement des différentes vésicules et cellules utilisées (revu par [1169]). Néanmoins, la conjugaison du cholestérol apparaît comme une méthode plutôt simple et efficace pour charger des oligonucléotides thérapeutiques dans les EVs.

### 5. Principales limites

De même que pour le chargement endogène des EVs, bien que des résultats prometteurs aient été obtenus dans les approches proposées pour le chargement exogènes des vésicules, plusieurs limites ont été observées. Il a par exemple été démontré que l'électroporation pouvait déclencher des agrégations d'EVs et modifier leur caractéristiques morphologiques [1170, 1171], et favoriser l'agrégation des molécules thérapeutiques incorporées (telles que les siARNs) [1172]. De plus, dans leur travaux, Kooijmans et al., ont précisé que l'électroporation des siARNs, sans EVs, pouvait également entraîner la formation d'agrégats de ces oligonucléotides, ce qui remis en doute l'efficacité de chargement de cette approche [1172]. Par ailleurs, l'agrégation des EVs avait déjà été observé dans le cas des liposomes, ce qui souligne la nécessité de poursuivre les recherches. D'autre part, concernant l'utilisation de la saponine pour la perméabilisation membranaire des EVs, plusieurs questions ont été soulevées, notamment sur la susceptibilité du détergent à perturber l'intégrité des vésicules, et par conséquent leur immunogénicité (revu par [1169]). D'autres travaux ont constaté que la dialyse hypotonique avait modifié de la taille des EVs chargées, et une altération de population de ces vésicules [1022]. Finalement, comme brièvement décrit précédemment, bien que la conjugaison du cholestérol avec des siARNs modifiés apparaît comme une approche efficace pour l'incorporation des oligonucléotides dans des EXOs purifiés, les vésicules et les cellules utilisées semblent toutefois constituer une variable clé qui influence la réussite de la délivrance fonctionnelle de la cargaison.