



HAL
open science

Place de l'Interleukine-33 dans la réponse immune du foie au cours de la leishmaniose viscérale

Octavie Rostan

► **To cite this version:**

Octavie Rostan. Place de l'Interleukine-33 dans la réponse immune du foie au cours de la leishmaniose viscérale. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2013. Français. NNT : 2013REN1B002 . tel-01126847

HAL Id: tel-01126847

<https://theses.hal.science/tel-01126847>

Submitted on 6 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et sciences de la santé

Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

Octavie Rostan

Préparée à l'unité de recherche INSERM U1085 IRSET
Institut de Recherche en Santé Environnement Travail
Faculté de médecine et Pharmacie

**Place de
l'interleukine-33
dans la réponse
immune du foie
au cours de la
leishmaniose
viscérale**

**Thèse soutenue à Rennes
le 6 Juin 2013**

devant le jury composé de :

Agnès COSTE

MCU - Université de Toulouse 3 / *Rapporteur*

Thierry LANG

CR IP - Institut Pasteur de Paris / *Rapporteur*

Pierre MARTY

PU-PH - Université de Nice Sophia-Antipolis et CHU
de Nice / *Examineur*

Laurent VERNHET

PU - Université de Rennes 1 / *Examineur*

Jean-Pierre GANGNEUX

PU/PH - Université de Rennes 1 et CHU de Rennes
/ *Directeur de thèse*

Florence ROBERT-GANGNEUX

MCU/PH - Université de Rennes 1 et CHU de
Rennes / *Co-directeur de thèse*

À mes chers Julien et Alexis Danet,
Mes deux amours, mon havre de douceur.

À Jean-Pierre Gangneux,
Mon mentor et gardien de ma boussole scientifique.

À Florence Robert-Gangneux,
La principale complice et le pilier de mes faits scientifiques.

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu le Professeur Jean-Pierre Gangneux. Merci pour m'avoir donné l'occasion de découvrir le laboratoire en licence et en master, ce qui a grandement conforté mon intérêt pour la parasitologie. Merci pour m'avoir donné l'opportunité de m'approprier ce sujet de thèse, et merci pour votre encadrement continuellement enthousiaste et optimiste en dépit des aléas expérimentaux. Merci enfin pour votre soutien réconfortant et votre bienveillance intangible.

Je tiens à remercier également sincèrement le Docteur Florence Robert-Gangneux. Merci pour tes conseils et ton soutien constant tout au long de ma thèse, notamment pendant nos longues journées expérimentales se terminant dans la pénombre du bâtiment 8... Merci aussi pour ton agréable compagnie et tes mots réconfortants ; je garde un très bon souvenir des moments passés ensemble pendant les pauses-café et quelques déjeuners, mais aussi en déplacement à Toulouse et Angers.

Je remercie le Docteur Michel Samson, pour m'avoir accueillie dans son équipe en master et pour m'avoir soutenue pendant la préparation du concours de l'école doctorale. Merci pour sa contribution à mon travail de thèse notamment en me permettant de disposer des souris transgéniques, mais aussi par ses suggestions et relectures. Je remercie le Docteur Dominique Lagadic-Gossmann pour m'avoir accueillie au sein de l'ex-EA SeRAIC appartenant aujourd'hui à l'IRSET, ainsi que le Docteur Bernard Jégou pour sa bonne humeur et son accueil toujours cordial au sein de l'ex-GERHM lors de deux sages de licence, puis désormais à l'IRSET. Je remercie enfin le Professeur Claude Guiguen pour son accueil bienveillant au laboratoire de parasitologie et mycologie ; merci également pour l'organisation du congrès annuel de la Société Française de Parasitologie à Rennes en 2012, qui fut l'occasion d'une sortie magnifique au Mont-Saint-Michel.

Je remercie les techniciens, ingénieurs et chercheurs avec lesquels j'ai eu l'occasion de travailler au sein de l'équipe et du laboratoire de parasitologie : Merci à Christelle Manuel, pour son assistance les jours de grosses manœuvres expérimentales, pour les PCR qu'elle a réalisées en fin de thèse lorsque la rédaction a eu raison de la paillasse, mais aussi pour nos discussions moins formelles. Merci à Claire Piquet-Pellorce pour la qualité de ses enseignements en master, puis pour son investissement dans l'entretien des souris et le développement de jolis marquages de cytométrie en flux, ainsi que pour les longues sessions expérimentales auxquelles elle a participé. Merci à Anne-Sophie Drogoul qui a réalisé son master 2 en même temps que moi et m'a laissée contribuer à son projet ayant depuis abouti à une jolie publication. Merci à Ludovic Donaghy et à Florian Cabillic de l'ex-U522, avec lesquels j'ai eu plaisir à travailler et qui m'ont beaucoup appris en licence puis en début de thèse, lorsque j'ai modestement participé à leur projet de recherche sur les cellules dendritiques. Merci enfin à Muhammad Imran Arshad, Muhammad Suleman, Sorya Belaz et Gaëlle Bourgine, pour avoir prêté leurs petites mains pendant les grosses journées et pour nos

amicales conversations. Merci enfin à Florence Pohon pour avoir pris soin de mes souris à l'animalerie ; je pense qu'aucune souris de labo n'a été plus heureuse que celles-ci ! Un grand merci à tous les collègues de l'IRSET qui, par leurs questions, leurs idées et leurs conseils ont contribué à l'avancée de mes travaux.

Je remercie les techniciens, ingénieurs et chercheurs des autres unités et des plateformes qui ont contribué au bon déroulement de mes travaux, par leur expertise technique ou leur regard critique : Merci à Gersende Lacombe pour avoir passé un temps considérable aux réglages du cytomètre afin d'obtenir de belles compensations pour mes marquages à 8 voire 9 couleurs, mais aussi pour ses suggestions scientifiques et pour nos longues discussions. Les heures de cytométrie ne sauraient être désagréables en si bonne compagnie ! Merci à Pascale Bellaud et Roselyne Viel pour le temps qu'elles ont consacré l'une comme l'autre à mes expériences d'histologie sur les foies et rates de mes souris tout au long de ma thèse sur la plateforme d'histopathologie, pour leur disponibilité et leur réactivité, ainsi que pour leur bonne humeur et leur gentillesse. Merci à Marine Lambert pour son assistance technique précieuse en microscopie confocale et pour sa sympathie. Merci à Andrew McKenzie de l'université de Cambridge, pour m'avoir permis de disposer de souris déficientes en ST2 dans le cadre d'une collaboration. Merci enfin à Bernard Pipy et Agnès Coste pour m'avoir accueillie durant une semaine dans leur laboratoire toulousain, et pour m'avoir donné l'occasion de me former à l'étude des macrophages péritonéaux de souris en compagnie de Lise Lefèvre. Plus généralement, je remercie tous les membres des plateformes de microscopie, de cytométrie en flux et d'histopathologie, ainsi que les membres du laboratoire de cytogénétique et de la nouvelle U991.

Je remercie les membres de mon comité de thèse, Catherine André, Ahmad Faili et Patrice Lepape pour avoir accepté d'évaluer l'évolution de mon travail de thèse et pour leurs intéressantes propositions. Je remercie les docteurs Agnès Coste et Thierry Lang pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse et d'en être rapporteurs, ainsi que les professeurs Pierre Marty et Laurent Vernhet pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie les bons amis doctorants et docteurs qui ont contribué au bon déroulement de ma thèse par quelques idées scientifiques, par leur soutien, mais aussi par les moments de détente qui ont ponctué ma thèse en leur compagnie. Merci à Julie pour son soutien sans faille, sa douceur et sa gentillesse. Merci à Sandrine pour nos longues discussions dans nos bureaux ou entre deux portes, et pour nos centres d'intérêt communs. Merci à Adéodat pour avoir apporté une touche d'exotisme à mon quotidien, pour sa bonne humeur et pour être toujours disposée à partager un bon goûter. Merci à Ismaïl, avec lequel j'ai eu de nombreuses discussions étonnamment décalées, mais systématiquement ponctuées de rires. Merci à Delphine avec qui j'ai partagé bien plus qu'un directeur de thèse ; merci pour nos échanges et pour les contacts amicaux que l'on garde aujourd'hui encore, des mois après sa soutenance. Merci à Gwendoline qui a réalisé son stage de master 2 dans mon équipe et avec laquelle j'ai partagé de nombreux déjeuners les quatre dernières années. Merci à Siham et Julie que j'ai eu plaisir à rencontrer régulièrement tout au long de ma thèse entre deux bâtiments, entre deux portes ou plus confortablement autour d'un goûter chocolaté.

Je remercie également tous les autres collègues de l'unité et du laboratoire de parasitologie pour nos échanges cordiaux à la paillasse, dans les couloirs ou les escaliers du campus, et pour la gaité qu'ils ont apportée à mon quotidien au laboratoire. Merci en particulier à Claudie Morzadec, Eric Le Ferrec, Normand Podechard et Jacques Le Seyec pour m'avoir souvent accueillie à leur table le midi, pour m'avoir soutenue et conseillée dans leur U du bâtiment 5 et à la cafétéria, ainsi que pour nos discussions improbables. Merci à Maud Trotard pour ses conseils pertinents et pour son humour divertissant en toutes circonstances. Merci à Brigitte, Chantal, Sylviane, Monsieur Beaucournu, Gérard, Marie-Thérèse et Mickaël pour leur compagnie durant les pauses café en parasitologie et pour les chouquettes et gâteaux. Merci à Melinda et Marie pour nos discussions reposantes dans leur U. Merci aux inséparables Fidaa et Dame Aurore, en particulier pour les petits dessins qui ont régulièrement fleuri sur ma paillasse. Merci à tous les collègues doctorants, post-doctorants, stagiaires, chercheurs, maîtres de conférences, techniciens (et autres) qui ont accompagné mes pauses café au bâtiment 5 ou au bâtiment 8. Merci aux membres du Club Doc et Post-Doc avec lesquels j'ai eu plaisir à développer d'intéressants projets. A tous les membres de l'IRSET, merci pour vos bons mots et vos sourires quotidiens ! Merci aussi à Cindy Nikolic pour son aide à l'obtention des figures de haute résolution demandées par les journaux que j'ai ciblés, et pour son amitié précieuse. Merci enfin à Donovan, Edmond et Ernest, les trois compères poissons qui vivent dans mon bureau depuis plusieurs années, pour leur simple présence relaxante.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont nourri mon intérêt pour les sciences de la vie tout au long de mes études. Merci à Valérie Carrilho-Rito qui enseignait la biologie dans mon lycée et qui a largement contribué à mon orientation à la fac. Merci aux enseignants qui ont marqué mes années étudiantes, en particulier Hubert Lerivray et Gilles Salbert dont les conseils et enseignements m'ont été très précieux. Merci à Anne-Marie Cortesero et Denis Poinot qui m'ont accueillie en stage dans le laboratoire d'éco-biologie des insectes parasitoïdes dès ma première année de licence. Merci également à Virginie Vallet et Florence Aubry pour m'avoir accueillie en stage au GERMH à plusieurs reprises en licence et pour être devenues l'une comme l'autre de bonnes amies par la suite. Merci enfin à Serge Bonnefoy pour m'avoir accueillie en stage de master 1 à l'Institut Pasteur de Paris où j'ai pu me familiariser avec l'étude de Plasmodium et consolider ainsi mon intérêt pour la parasitologie.

Je remercie enfin Julien et Alexis Danet, ma famille. Merci à tous les deux pour les beaux moments passés ensemble et pour nos sorties dominicales me permettant de renouveler l'énergie nécessaire à un travail de thèse efficace. Merci Julien, pour ton grand soutien, pour avoir quotidiennement écouté mes anecdotes de laboratoire, pour avoir souvent accepté de porter la casquette du gentil chauffeur à toute heure du jour ou de la nuit, ou encore pour le café que tu ne t'es jamais lassé de m'apporter chaque jour. Merci d'être là, tout simplement. Et un immense merci à Alexis, mon bébé devenu un adorable petit garçon, toujours câlin et souriant. Merci d'accepter dans la bonne humeur mes horaires parfois irréguliers et merci pour ta compréhension face à mon manque de disponibilité pour toi ces dernières semaines. Merci enfin pour tes progrès notamment linguistiques et musicaux, qui sont pour moi une source continue de bonheurs et de surprises, qui donnent à la vie un tout autre sens...

Liste des abréviations	5
Liste des figures et tableaux	7
I. Liste des figures	7
II. Liste des tableaux	8
Introduction	9
Contexte général	11
Partie 1 : Leishmanioses	13
I. Historique des découvertes	13
II. Cycle des leishmanioses.....	15
1. Généralités.....	15
2. Parasite	17
3. Vecteur.....	20
4. Hôtes et réservoirs.....	23
III. Variabilité des présentations cliniques chez l'Homme	24
1. Leishmanioses tégumentaires.....	25
2. Leishmaniose viscérale	26
3. Portage asymptomatique, persistance parasitaire et risques de réactivation.....	30
Partie 2 : Physiopathologie et immunologie de la leishmaniose viscérale	33
I. Réponse cutanée initiale et dissémination viscérale	33
II. Réponse immune au cours de la leishmaniose viscérale.....	36
1. Immunité innée.....	36
2. Rôle des lymphocytes B et réponse humorale	39
3. Rôle des lymphocytes T et balance Th1/Th2	40
4. Fonctions cytokiniques au cours de la leishmaniose viscérale	42
5. Activation macrophagique et leishmanicidie	45
III. Physiopathologie organe-dépendante et spécificités du foie.....	46
1. Immunité tissulaire différentielle au cours de la leishmaniose viscérale.....	46
2. Acteurs cellulaires de la réponse granulomateuse hépatique	48
3. Fonctions cytokiniques au cours de la réponse granulomateuse hépatique	49
4. Cinétique d'assemblage des granulomes au cours de la leishmaniose expérimentale ...	50
5. Fibrose hépatique	52
IV. Mécanismes d'échappement des défenses de l'hôte et persistance parasitaire.....	54
1. Échappement au complément	54
2. Résistance à la lyse intracellulaire	55
3. Répression de la présentation antigénique	55
4. Régulation de l'infiltrat cellulaire.....	56
5. Modulation de la réponse cytokinique	56
6. Cellules sanctuaires	58
Partie 3 : L'interleukine-33 et son récepteur ST2	59
I. Historique des découvertes	59

II.	IL-33 : Structure, sources, fonctions nucléaires, sécrétion	60
1.	Structure	60
2.	Sources cellulaires.....	61
3.	Fonctions nucléaires.....	65
4.	Processus de sécrétion.....	66
III.	ST2 : Structure, sources, signalisation, régulation	67
1.	Structure	67
2.	Sources cellulaires.....	68
3.	Signalisation de l'IL-33 via ST2	71
4.	Modulation de la signalisation	72
IV.	IL-33 et maladies infectieuses.....	74
1.	Virus	74
2.	Bactéries.....	77
3.	Champignons.....	80
4.	Helminthes	82
5.	Protozoaires.....	85
Objectifs		87
Résultats		91
Partie I : Étude de l'expression hépatique et de la sécrétion systémique d'IL-33 au cours de la leishmaniose viscérale humaine		93
I.	Contexte	93
II.	Matériel et méthodes	93
1.	Sérums.....	93
2.	Biopsie.....	93
III.	Résultats	94
IV.	Discussion	94
Partie II : Etude de l'expression d'IL-33 dans les cellules étoilées hépatiques infectées par Leishmania donovani		96
I.	Contexte	96
II.	Matériel et méthodes	96
III.	Résultats	97
1.	Les cellules étoilées du foie sont permissives à L. donovani.....	97
2.	Les parasites intracellulaires n'affectent pas les propriétés fonctionnelles des cellules étoilées du foie	98
3.	Les cellules étoilées du foie n'affectent pas la survie et la capacité d'infection de L. donovani.....	100
IV.	Discussion	100
Partie III : Étude de l'expression d'IL-33 au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale chez la souris C57BL/6		102
I.	Contexte	102
II.	Matériel et méthodes	102
III.	Résultats	103
1.	L'infection des souris C57BL/6 par L. donovani induit des niveaux accrus d'IL-33 sérique et l'expression d'IL-33 et de son récepteur ST2 dans le foie	103
2.	L'expression hépatique d'IL-33 corrèle avec l'expression de cytokines associées à la réponse granulomateuse.....	107
IV.	Discussion	107

Partie IV : Etude du rôle de l'axe IL-33/ST2 au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale chez la souris BALB/c	109
I. Contexte	109
II. Matériel et méthodes	109
III. Résultats	111
1. L'infection des souris BALB/c par <i>L. donovani</i> induit des niveaux accrus d'IL-33 sérique, l'expression d'IL-33 et le recrutement de cellules exprimant ST2 dans le foie	111
2. La déficience en ST2 est associée à un meilleur contrôle de la charge parasitaire.....	113
3. L'IL-33 réprime l'expression de cytokines Th1 sans modifier l'expression de cytokines Th2.....	113
4. L'IL-33 réprime le recrutement des polynucléaires neutrophiles et des monocytes dans le foie des souris BALB/c infectées par <i>L. donovani</i>	115
5. L'IL-33 réprime l'expression de NF- κ B	118
IV. Discussion	118
Principales publications	121
Article 1	123
Article 2	125
Discussion générale	127
Contribution à d'autres projets de l'équipe	141
Partie I : Etude du rôle des lymphocytes NKT invariants au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale chez la souris C57BL/6	143
I. Contexte	143
II. Matériel et méthodes	143
III. Résultats	143
IV. Conclusion.....	144
Article 3	145
Partie II : Etude des propriétés immunostimulatrices des cellules dendritiques humaines infectées par <i>Leishmania donovani</i> dans un modèle de micro-environnement hépatique in vitro	147
I. Contexte	147
II. Matériel et méthodes	147
III. Résultats	147
IV. Conclusion.....	148
Article 4	149
Bibliographie	151
Annexes	183
Liste des communications	185
I. Communications orales.....	185
II. Communications affichées	185

Liste des abréviations

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ATP : Adénosine tri-phosphate
- BCR** : B cell receptor
- CCL** : Chemokine (C-C motif) ligand
CCR : Chemokine (C-C motif) receptor
CXCL : Chemokine (C-X-C motif) ligand
CXCR : Chemokine (C-X-C motif) receptor
CD : Cluster of differentiation
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CR : Complement receptor
- DC-SIGN** : Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
DMEM : Dulbecco's *modified eagle medium*
- ELISA** : Enzyme-linked immuno sorbent assay
EGF : Epidermal Growth factor
ERK : Extracellular signal-regulated kinase
- GM-CSF** : Granulocyte macrophage – Colony stimulatory factor
- HMGB1** : High-mobility group protein 1
- ICAM** : Intracellular adhesion molecule
IDO : Indoléamine 2,3-dioxygénase
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
IL-1RAcP : Il-1 receptor accessory protein
IL-33r : IL-33 recombinante
iNOS : Inducible NO synthase
IRAK : IL-1 receptor-associated kinase
- LACK** : Leishmania homolog of receptors for activated C-kinase
LANA : Latency-associated nuclear antigen
LCF : Leishmania chemotactic factor
LDU : Leishman Donovan Unit
LPG : Lipophosphoglycane
LPS : Lipopolysaccharide
- MAP** : Mitogen-activated protein
MGG : May-Grünwald Giemsa
MPO : myéloperoxydase
- NAD(P)H** : Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
NF-κB : Nuclear factor-kappa B

NF-HEV : Nuclear factor of high endothelial venule

NK : Natural Killer

NNN : Novy-Nicolle-McNeal

NO : Oxyde nitrique

NT : Non traité

PAMP : Pathogen-associated molecular pattern

PBS : Phosphate buffered saline

PCR : Polymerase chain reaction

PK : Protéine kinase

PKDL : Post kala-azar dermal leishmaniasis

PMN : Polymorphonuclear neutrophil

OMS : Organisation mondiale de la santé

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

SIGIRR : Single immunoglobulin IL-1R-related molecule

SOD : Superoxyde dismutase

SVF : Sérum de veau fœtal

TCR : T cell receptor

TGF : Transforming Growth Factor

Th : T helper

TIR : Toll/IL-1 receptor

TNF : Tumor necrosis factor

TLR : Toll like receptor

TRAF : TNF receptor associated factor

VCAM : Vascular cell adhesion molecule

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

WT : Wild-Type

Liste des figures et tableaux

I. Liste des figures

Figure 1 : Les leishmanioses, des maladies tropicales négligées	12
Figure 2 : Cycle biologique des parasites du genre <i>Leishmania</i>	16
Figure 3 : Formes promastigote et amastigote des protozoaires du genre <i>Leishmania</i>	19
Figure 4 : Phlébotomes.....	21
Figure 5 : Séquence de développement des cinq formes promastigotes majeures.....	23
Figure 6 : Distribution des leishmanioses tégumentaires.	25
Figure 7 : Lésions observées au cours des leishmanioses tégumentaires.....	26
Figure 8 : Distribution géographique de la leishmaniose viscérale dans l’Ancien Monde et le Nouveau Monde.....	27
Figure 9 : Leishmaniose viscérale.....	29
Figure 10 : Rôle des neutrophiles au niveau du site de transmission des <i>Leishmania</i>	35
Figure 11 : Représentation schématique des rôles des polynucléaires neutrophiles dans l’activation macrophagique, l’activation lymphocytaire et la leishmanicidie.....	38
Figure 12 : Balance Th/Th2 et immunosuppression au cours de la leishmaniose viscérale.....	41
Figure 13 : Activation macrophagique et leishmanicidie.....	46
Figure 14 : Suivi de souris infectées avec <i>L. infantum</i> par imagerie bioluminescente.....	47
Figure 15 : Cellules immunitaires hépatiques.....	48
Figure 16 : Processus de maturation des granulomes en réponse à <i>L. donovani</i> , contrôle de la charge parasitaire et involution des granulomes.....	51
Figure 17 : Activation des cellules étoilées du foie et fibrose hépatique.....	53
Figure 18 : Mécanismes d’échappement des leishmanies aux défenses de leur hôte.....	57
Figure 19 : Représentation schématique de la structure de l’IL-33.	61
Figure 20 : Expression d’IL-33 dans le foie chez la souris.....	63
Figure 21 : Représentation schématique des mécanismes de sécrétion et modification de l’IL-33.....	66
Figure 22 : Signalisation de l’IL-33 via ST2.....	72
Figure 23 : Régulation de la signalisation de l’IL-33 via sST2, sIL-1RAcP et SIGIRR.....	73
Figure 24 : Dosage d’IL-33 sérique et expression hépatique d’IL-33 au cours de la leishmaniose viscérale humaine.....	94
Figure 25 : Permissivité des cellules étoilées activées à <i>L. donovani</i>	98
Figure 26 : Viabilité et croissance des cellules étoilées activées exposées à <i>L. donovani</i>	99
Figure 27 : Expression d’IL-33 par les cellules étoilées activées exposées à <i>L. donovani</i>	99
Figure 28 : Dosage d’IL-33 sérique au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale chez la souris C57BL/6.....	103
Figure 29 : Corrélation de l’expression d’IL-33 et ST2 dans le foie de souris C57BL/6 infectées par <i>L. donovani</i>	104

Figure 30 : Localisation préférentielle de l'IL-33 dans les granulomes hépatiques des souris C57BL/6 infectées par <i>L. donovani</i>	104
Figure 31 : Recherche des cellules exprimant l'IL-33 dans le foie des souris C57BL/6 60 jours après infection par <i>L. donovani</i>	106
Figure 32 : Stratégie de caractérisation des populations cellulaires en cytométrie en flux.....	110
Figure 33 : Dosage d'IL-33 sérique et expression hépatique d'IL-33 au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale chez la souris BALB/c.....	111
Figure 34 : Expression de ST2 dans le foie des souris BALB/c 60 jours post-infection après infection par <i>L. donovani</i>	112
Figure 35 : Charge parasitaire hépatique et hépatomégalie chez les souris BALB/c WT ou ST2 ^{-/-} infectées par <i>L. donovani</i>	113
Figure 36 : Expression de cytokines Th1 chez les souris BALB/c déficientes en ST2 ou sauvages traitées avec de l'IL-33 recombinante après infection par <i>L. donovani</i>	114
Figure 37 : Expression des ARNm des chimiokines CCL2, CXCL2 et KC, et des récepteurs CCR2 et CXCR2 dans le foie de souris BALB/c déficientes en ST2 ou sauvages traitées avec de l'IL-33 recombinante et infectées par <i>L. donovani</i>	116
Figure 38 : Recrutement des polynucléaires neutrophiles et des monocytes chez les souris BALB/c déficientes en ST2 ou sauvages traitées par de l'IL-33r infectées par <i>L. donovani</i>	117
Figure 39 : Expression de NF-κBp35 chez les souris BALB/c ST2 ^{-/-} et BALB/c sauvages traitées par l'IL-33r après infection par <i>L. donovani</i>	118

II. Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau de classification des complexes pathogènes de <i>Leishmania</i>	18
Tableau 2 : Principales espèces de phlébotomes impliquées dans la transmission des leishmanies.....	21
Tableau 3 : Relation structure/fonction du granulome hépatique au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale.	52
Tableau 4 : Place de l'axe IL-33/ST2 au cours des maladies virales.....	77
Tableau 5 : Place de l'axe IL-33/ST2 au cours des maladies bactériennes.....	79
Tableau 6 : Place de l'axe IL-33/ST2 au cours des maladies fongiques.....	81
Tableau 7 : Place de l'axe IL-33/ST2 au cours des maladies dues à des helminthes.....	84
Tableau 8 : Place de l'axe IL-33/ST2 au cours des maladies dues à des protozoaires.....	86
Tableau 9 : Corrélations des niveaux d'expression hépatique d'IL-33 et ST2 avec les niveaux d'expression de différentes cytokines clé de la réponse granulomateuse.....	107

Introduction

Les leishmanioses sont des maladies tropicales négligées, allant de lésions cutanées bénignes à des atteintes viscérales mortelles en absence de traitement. Elles sont dues à des protozoaires flagellés du genre *Leishmania* qui infectent l'Homme, ainsi que de nombreuses espèces de mammifères domestiques et sauvages, après leur transmission par un insecte hématophage, le phlébotome.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime le nombre de personnes exposées à 350 millions dans 98 pays de par le monde (Alvar et al., 2012), avec 14 millions de personnes infectées et près de 2 millions de nouveaux cas par an, tous tableaux cliniques confondus. Des flambées épidémiques apparaissent également de façon cyclique, en association avec les épisodes de famines ou de guerres civiles dans les principaux foyers endémiques, comme observé notamment en Inde entre 1977 et 1980 et au Soudan en 1989 (Dye et Wolpert, 1988; Thakur et Kumar, 1992; Zijlstra et al., 1995; Seaman et al., 1996). En outre, l'immunosuppression constitue un terrain particulièrement favorable au développement des leishmanioses qui sont considérées comme des maladies opportunistes des patients immunodéprimés, très sujets aux rechutes. Depuis les années 1970, l'épidémie sidéenne a donc contribué à leur propagation, tant dans les Pays du Sud tels que le Soudan et l'Éthiopie, que dans le Bassin Méditerranéen (Alvar et al., 1997; Alvar et al., 2008).

Les leishmanioses sont donc un important problème de santé publique et sont incluses depuis 1976 parmi les maladies prioritaires prises en compte dans le Programme Spécial de Formation et Recherche dans les Maladies Tropicales, développé par le Programme des Nations Unies pour le Développement, la Banque Mondiale et l'OMS. Il n'existe à ce jour aucun vaccin chez l'Homme, de sorte que la prophylaxie repose principalement sur des actions ciblant les phlébotomes, et une surveillance des réservoirs via des approches interdisciplinaires, médicales, vétérinaires et environnementales (Palatnik-de-Sousa et Day, 2011). La stratégie thérapeutique repose quant à elle sur l'emploi de médicaments de maniement difficile, présentant des effets indésirables importants, des traitements contraignants de longue durée et un coût élevé difficilement accessible pour les patients les plus démunis. Par ailleurs, l'apparition de résistances des leishmanies à ces médicaments complique davantage leur emploi. Il n'existe donc aucun schéma thérapeutique optimal et il convient d'adapter le traitement à chaque patient (Gangneux, 1999; Singh et al., 2012). La recherche scientifique est actuellement activement orientée vers la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques et d'un vaccin efficace (Singh et Sundar, 2012; Singh et al., 2012), ce qui implique une meilleure compréhension de l'immunologie des leishmanioses.

Sur le plan immunologique, les leishmanioses sont le modèle ayant permis de démontrer pour la première fois le contrôle génétique des susceptibilités et résistance à l'infection chez la souris (Blackwell et al., 1994). C'est également sur un modèle de leishmaniose cutanée murine que l'importance de la dichotomie Th1/Th2 et le rôle des sous-populations de lymphocytes T CD4+ ont été illustrés d'une façon particulièrement manifeste (Locksley et al., 1987; Reiner et Locksley, 1995). Ainsi, au cours de la leishmaniose cutanée, il est clairement établi que la réponse immunitaire Th1 permet le contrôle de l'infection, tandis qu'une réponse Th2 est responsable d'une ulcération chronique défavorable pour l'hôte (Kemp et al., 1994b). En revanche, s'il existe au cours de la leishmaniose viscérale, le rôle de cette balance immunitaire est moins franc. En effet, parmi les organes ciblés par les leishmanies viscérotropes, le foie présente un micro-environnement tolérogène particulier, du fait de son exposition permanente à des antigènes et toxiques provenant principalement de l'alimentation (Sheth et Bankey, 2001). Or, il est établi que le contexte Th2 spécifique du foie contribue positivement à la mise en place d'une réponse granulomateuse, caractérisée par le recrutement séquentiel de différentes populations de cellules immunitaires autour des macrophages infectés, aboutissant à l'activation macrophagique garante de la clairance parasitaire hépatique, ce qui n'est pas observée dans la rate, les ganglions et la moelle osseuse (Kaye et al., 2004; Gangneux et al., 2006; Stanley et Engwerda, 2007). La leishmaniose viscérale constitue donc un modèle particulièrement pertinent pour l'étude de la réponse immunitaire anti-infectieuse et l'étude de l'importance du micro-environnement cellulaire et tissulaire dans la résolution des infections.

Ainsi, les leishmanioses demeurent aujourd'hui un important problème de santé publique dans de nombreux pays du monde, et constituent également un sujet de recherche biomédicale de grand intérêt.

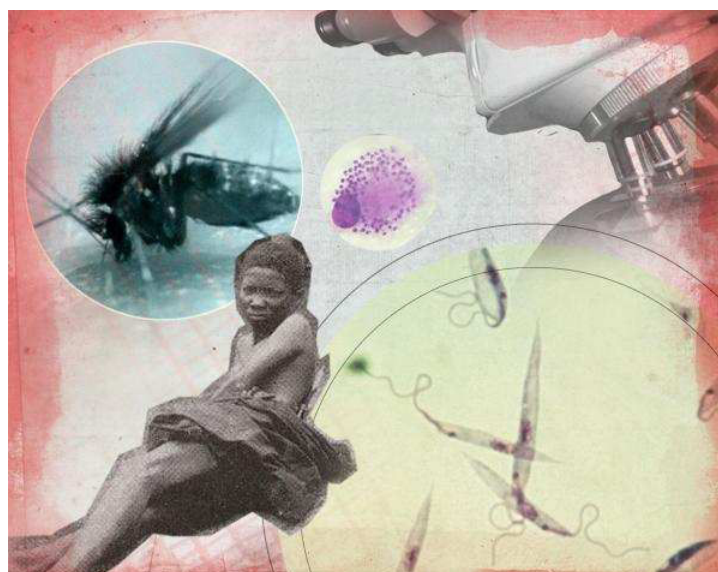


Figure 1 : Les leishmanioses, des maladies tropicales négligées. Source : Wellcome^{trust}.

I. Historique des découvertes

Si les leishmanioses tégumentaires caractérisées par des lésions manifestes sont connues depuis le VII^{ème} siècle avant notre ère, ce n'est qu'en 1885 que le Colonel D.D. Cunningham les associe à la présence d'un parasite (Cunningham, 1885) qui ne fut décrit qu'au début du XX^{ème} siècle.

Contrairement aux leishmanioses tégumentaires, la leishmaniose viscérale est absente de toute source historique jusqu'au XIX^{ème} siècle. Elle était pourtant répandue dans l'Antiquité et fut récemment identifiée chez des momies de l'Égypte ancienne et de la Haute-Nubie (Zink et al., 2006), mais aussi durant la Renaissance où elle atteignit notamment la duchesse de Florence, Eleonora di Toledo (1522-1562), épouse de Cosimo I de Medici (Nerlich et al., 2012). En dépit des nombreux cas apparus à travers les âges, la première description de leishmaniose viscérale remonte à Roser qui attira l'attention en 1835 sur une affection principalement caractérisée par une splénomégalie douloureuse chez neuf enfants au Péloponnèse. Vinrent ensuite les observations de Cigliano en Italie (1867), de Pallas à Hydra (1880), de Karamitsa et Stephanos en Grèce (1881). En Inde, après que le Gouvernement Britannique prit le pouvoir sur toute l'Inde Britannique, le gouvernement du Bengale s'inquiéta de rapports de la Commission Sanitaire du Bengale (1864-1866, 1873) sur une épidémie de fièvres résistantes à la quinine dans le district de Burdwan, responsable d'une morbidité et mortalité importantes ayant des conséquences sévères sur la productivité locale. Par la suite, un rapport de l'Inspecteur général des Hôpitaux civils, Dr. J. Elliot, mentionne en 1872 une « fièvre malarique intermittente » survenue par cycles épidémiques dans différents districts entre 1824 et 1862, avec notamment une première épidémie ayant fait 75 000 victimes dans le district de Jessore en 1824-1825. De telles épidémies ont été relatées tout au long du XIX^{ème} siècle sous les vocables de kala azar (signifiant fièvre noire, fièvre fatale ou misère noire en sanscrit) ou fièvre dum-dum. Dr. J.J. Clarke, membre de la Commission sanitaire de l'Inde, publia notamment en 1882 une centaine d'observations établies entre 1869 et 1870 durant l'épidémie de « cachexie malarique » apparue dans le district de Garo. Des cas de fièvres similaires associés à une splénomégalie et une inflammation hépatique furent en fait sporadiquement décrits dès le XVIII^{ème} siècle. Malgré ces descriptions cliniques détaillées, aucune étiologie n'était alors connue. Bien que l'absence de périodicité des fièvres, l'absence d'hématozoaires et l'inefficacité de la quinine infirmaient cette hypothèse, des auteurs tels que Sir Léonard Rogers évoquaient généralement une forme de paludisme, voire un paludisme associé à une autre infection comme suggéré par Sir Ronald Ross en 1899. D'autres auteurs évoquèrent une ankylostomose (Giles, 1897) ou une forme

maligne de mélitococcie (Bentley, 1902). En 1886, Marchand observa quant à lui, lors de la nécropsie d'un patient chinois, des pathogènes semblables à ceux décrits par le Colonel Cunningham dans la leishmaniose cutanée (Gibson, 1983; England, 1986).

Les préparations de rates d'un soldat ayant contracté la fièvre dum-dum près de Calcutta et décédé à l'Hôpital Militaire de Londres en 1900 circulèrent chez différents biologistes. Les petits corps ovales qu'elles contenaient furent étudiés et décrits comme de nouveaux parasites apparentés à des trypanosomes par Sir Leishman du Corps de Santé Britannique en 1901 (Leishman, 1903). La même année, le Capitaine Charles Donovan observait à l'Hôpital de Madras des éléments semblables dans les ponctions spléniques de trois patients (Donovan, 1903). Par recoupement des observations de Leishman et Donovan, Sir Ronald Ross conclut en novembre 1903 à un nouveau protozoaire d'origine controversée auquel le taxon *Leishmania donovani* fut attribué. En 1904, Sir Rogers obtint la forme flagellée de *L. donovani* et démontra la relation entre leishmanies et trypanosomes, ce qui fut controversé jusqu'à ce que Leishman confirme ces découvertes à Netley en 1904, sur un nouveau patient atteint de fièvre dum-dum (Gibson, 1983; England, 1986). Dès lors, les deux états des leishmanies étaient connus. *L. donovani* fut par la suite identifié par le Dr. Sheffield Neave au Soudan puis en Egypte. En 1904, Cathoire et Laveran étudièrent l'anémie splénique infantile en Tunisie, dont l'étiologie fut attribuée par Charles Nicolle en 1908 à un nouveau taxon du genre *Leishmania*, *L. infantum*. La première culture de leishmanies fut obtenue en 1908 par Nicolle et Sicre qui découvrirent dans l'ulcère cutané d'un chamelier de Tozeur, des protozoaires morphologiquement identiques à ceux découverts en 1903 dans la rate. Dès lors, l'histoire des leishmanioses tégumentaires et viscérale se joignirent. En 1911, Vianna appela *L. braziliensis* un parasite préalablement observé dans des lésions oro-nasales au Brésil. Par la suite, une grande diversité d'espèces leishmaniennes fut décrite selon la diversité des présentations cliniques tégumentaires dans le Nouveau Monde et dans l'Ancien Monde. La leishmaniose viscérale du Nouveau-Monde a quant à elle été décrite pour la première fois par le brésilien Carlos Chagas en 1911. Dans les années suivantes, l'affection fut formellement identifiée par son analogie clinique et épidémiologique avec les leishmanioses de l'Ancien Monde en Argentine (1926), au Brésil (1934), au Venezuela (1941), au Guatemala (1949) et au Mexique (1951). Chagas crut à une nouvelle espèce que Da Cunha appela *L. chagasi* en 1937. Finalement, les techniques de biologie moléculaire, et particulièrement l'électrophorèse des iso-enzymes mise au point par Chance dans les années 1970, ont permis d'établir une approche cladistique du genre et d'attester notamment la synonymie de *L. infantum* et *L. chagasi* (Mauricio et al., 2000).

Une fois les maladies décrites et les pathogènes identifiés, se posait la question de la transmission. Si Avicenne attribuait la lésion cutanée à la piqûre d'un moustique, c'est au début du XIX^{ème} siècle que les frères Sargent à l'Institut Pasteur d'Alger soupçonnèrent le phlébotome d'être

le vecteur du Bouton de Biskra. Cette hypothèse fut confirmée en 1911 lorsque Wenyon mit en évidence des promastigotes dans l'insecte à Alep et Bagdad, puis en 1921 lorsque les frères Sargent contaminèrent un sujet sain à Alger à l'aide de phlébotomes capturés à Biskra. L'intervention des phlébotomes dans les complexes pathogènes sud-américains fut démontrée ensuite en 1922 lorsqu'Aragao infecta un chien avec *L. braziliensis* par inoculation d'un broyat de phlébotomes préalablement nourri sur une lésion. L'hypothèse de la transmission du kala azar par le phlébotome fut également émise au début du XIX^{ème} siècle par Patton qui démontra la présence d'amastigotes dans le sang périphérique des patients et de promastigotes dans l'intestin moyen des insectes gorgés avec ce sang. L'hypothèse fut confirmée en 1924 par Knowles, Napier et Smith. La transmission de *L. infantum* par les phlébotomes dans le Bassin Méditerranéen fut confirmée en 1926 par Parrot et Donatien. L'élevage des phlébotomes en laboratoire dès 1925 permit l'initiation d'importantes études épidémiologiques émanant de la Commission du kala azar, qui évalua la dynamique de transmission des leishmanies par les phlébotomes à Bassam entre 1926 et 1930 (Jarry, 1999).

Enfin, l'histoire des leishmanioses prit un nouveau tournant à partir de 1985 avec la description des premiers cas de co-infection VIH-leishmanies (de la Loma et al., 1985; Clauvel et al., 1986). Depuis lors, l'histoire des leishmanioses est étroitement liée à celle du SIDA et de l'immuno-dépression.

II. Cycle des leishmanioses

1. Généralités

Les leishmanies sont injectées à leur hôte mammifère sous une forme flagellée (dite promastigote) au cours d'une piqûre par une femelle phlébotome. Dans le derme du mammifère, elles sont phagocytées par les macrophages résidents au sein desquels elles se différencient en amastigotes dépourvus de flagelle et se multiplient. Elles peuvent ensuite migrer vers la rate, la moelle osseuse et le foie, où elles induisent les symptômes classiquement associés à la pathologie viscérale. Au cours d'un repas sanguin ultérieur, la femelle phlébotome prélève le sang du mammifère infecté, contenant des leishmanies amastigotes au sein des phagocytes. Celles-ci arrivent dans le tube digestif de l'insecte, où elles sont libérées, se différencient en promastigotes et se multiplient. Certaines d'entre elles s'accumulent ensuite dans le tube digestif de l'insecte, tandis que d'autres migrent vers les trompes de l'appareil salivaire et seront injectées dans la peau d'un prochain hôte mammifère (Figure 2).

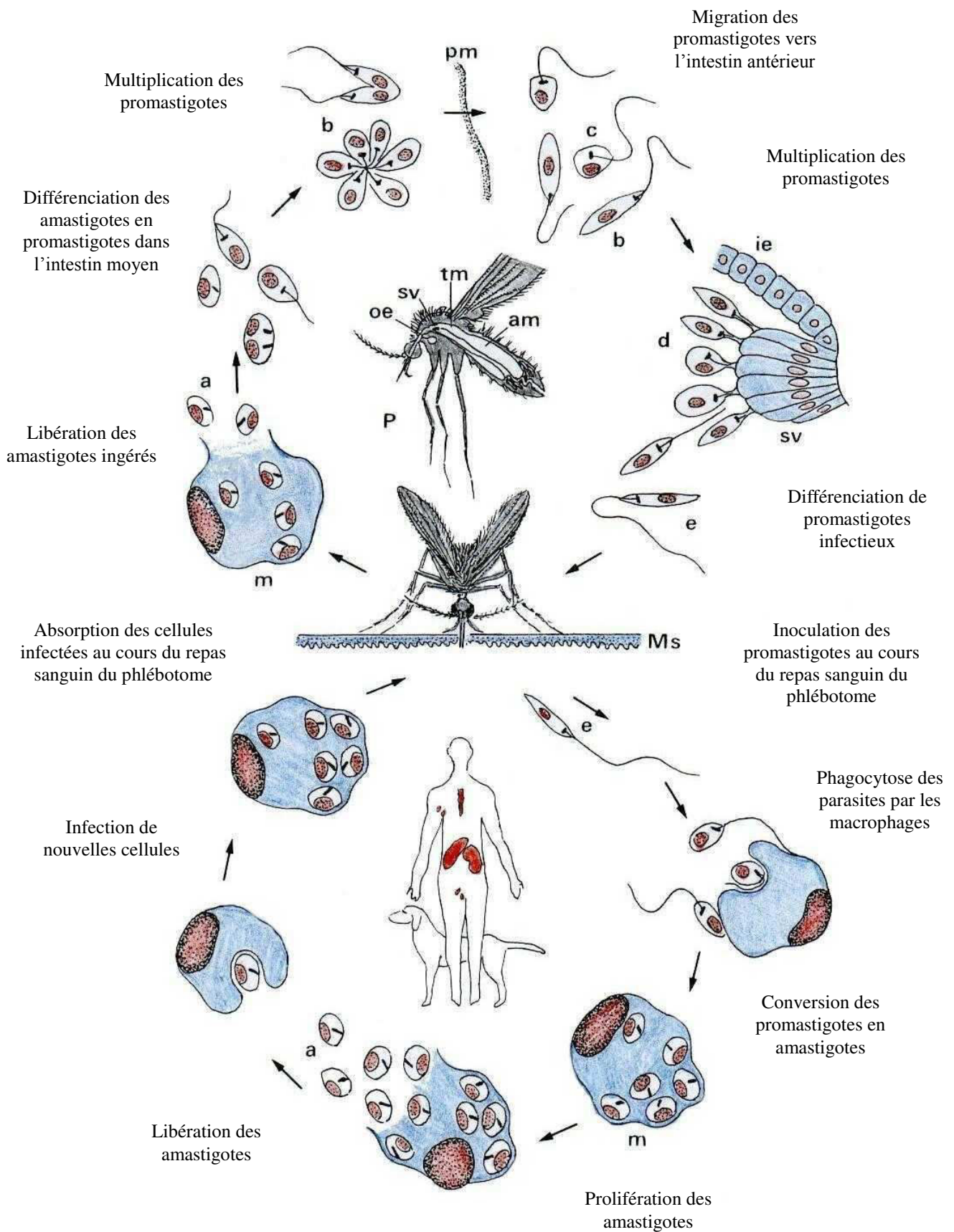


Figure 2 : Cycle biologique des parasites du genre *Leishmania*. D'après le cycle proposé par le Centre National de Référence des *Leishmania* (<http://www.parasitologie.univ-montpl.fr/images/cycle.jpg>).

2. Parasite

Les leishmanies sont des protozoaires appartenant au genre *Leishmania* Ross, 1903 ; la place de ce genre dans la classification de Levine (1980) est la suivante :

REGNE : Protista

SOUS-REGNE : Protozoa

EMBRANCHEMENT : Sarcomastigophora

SOUS-EMBRANCHEMENT : Mastigophora

CLASSE : Zoomastigophorea

ORDRE : Kinetoplastida

SOUS-ORDRE : Trypanosomatina

FAMILLE : Trypanosomatidae

GENRE : *Leishmania*

Il est difficile de distinguer les différentes espèces de leishmanies d'un point de vue morphologique, tant au stade promastigote qu'au stade amastigote. Outre les légères variations morphologiques, les premiers critères d'identification reposent donc sur les aspects cliniques et épidémiologiques des leishmanioses, qui ont été complétés ultérieurement de critères culturels et expérimentaux chez l'animal de laboratoire ou chez le vecteur. Ce sont les techniques de biologie et immunologie telles que le test de Noguchi-Adler, le sérotypage du facteur excrété et l'utilisation d'anticorps monoclonaux, ainsi que les techniques biochimiques telles que radiorespirométrie, l'agglutination par les lectines et l'électrophorèse des iso-enzymes qui ont permis d'affiner et de standardiser l'identification des espèces. Depuis les années 1980, les nouveaux outils de biologie moléculaire ont enrichi les techniques d'identification, avec notamment l'analyse des fragments de restriction et l'analyse des microsatellites en PCR. Le séquençage récemment entrepris de nombreuses souches issues de différentes espèces de leishmanies devraient également dans les années à venir apporter de puissants outils phylogénétiques (Ivens et al., 2005; Downing et al., 2011; Downing et al., 2012). Cependant, la technique de choix pour l'identification des espèces leishmaniennes reste l'électrophorèse des iso-enzymes, permettant de regrouper les souches de leishmanies en zymodèmes selon leur profil enzymatique, permettant une identification de ces souches au niveau spécifique et infraspécifique. L'évolution des techniques d'identification a permis d'aboutir aujourd'hui à une taxonomie cladistique complexe intégrant les différents critères d'identification avec une place importante des analyses biochimiques. Bien qu'il n'existe qu'un genre *Leishmania*, deux sous-genres ont été différenciés, *Leishmania* et *Viannia*, sur la base du cycle

intravectorel impliquant respectivement le développement des leishmanies dans la partie antérieure ou postérieure de l'intestin du phlébotome. Ces sous-genres sont divisés en complexes phylogénétiques correspondant dans la plupart des cas à des situations épidémiologiques particulières et comprenant les espèces identifiées sur la base des seuls critères enzymatiques (Pratlong et Lanotte, 1999) (Tableau 1).

Tableau 1 : Tableau de classification des complexes pathogènes de Leishmania. Classification de Lainson et Shaw (1987). D'après Pratlong et Lanotte (Dedet, 1999).

Sous-genre <i>Leishmania</i>	Sous genre <i>Viannia</i>
Caractéristique : parasites limités à l'intestin moyen et antérieur du phlébotome Distribution : Ancien et Nouveau Monde	Caractéristique : développement dans l'intestin postérieur du phlébotome Distribution : Nouveau-Monde
Complexe <i>Leishmania (L.) donovani</i> L. (L.) donovani L. (L.) infantum L. (L.) chagasi L. (L.) archibaldi Espèces hors complexe L. (L.) donovani L. (L.) tropica L. (L.) aethiopica L. (L.) gerbilli L. (L.) major Complexe <i>Leishmania (L.) mexicana</i> L. (L.) mexicana L. (L.) enriettii L. (L.) amazonensis L. (L.) venezuelensis Espèces possibles du complexe L. (L.) mexicana L. (L.) pifanoi L. (L.) garnhami Complexe <i>Leishmania (L.) hertigi</i> L. (L.) hertigi L. (L.) deanei	Complexe <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> L. (L.) braziliensis L. (L.) guyanensis L. (L.) panamensis L. (L.) peruviana

Les leishmanies sont des protozoaires relativement évolués chez lesquels sont observés la plupart des organites spécifiques des eucaryotes supérieurs. Elles sont entourées par une membrane plasmique qui présente sur sa face externe une enveloppe cellulaire d'épaisseur variable, le glycocalyx, composée principalement de glucides liés à des lipides et à des protéines membranaires. Cette membrane protège les leishmanies contre les agents agressifs, assure le transfert de métabolites et permet les interactions avec les hôtes qu'il habite successivement, et notamment les interactions avec les cellules intestinales du phlébotome et les cellules phagocytaires mammaliennes. Elle joue donc un rôle primordial dans l'établissement et le maintien du parasitisme. Comme toutes les cellules eucaryotes complexes, les leishmanies contiennent un noyau contenant le matériel génétique organisé en 36 chromosomes, ainsi que de nombreux organites bordés par une membrane et participant à la biosynthèse des constituants parasitaires comme le réticulum

endoplasmique et l'appareil de Golgi, ou à la dégradation des composants parasites ou exogènes tels que des endosomes et lysosomes. Un réseau de microtubules assure le maintien de l'architecture cellulaire sous la membrane plasmique et permet la mobilité flagellaire grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Outre la singularité de leur flagelle antérieur, les leishmanies sont caractérisées par la présence d'un organe typique des kinétoplastidés, le kinétoplaste, généralement en position juxtanucléaire, correspondant à une portion particulière de l'unique mitochondrie, qui contient l'ADN mitochondrial.

Les leishmanies se présentent à leurs hôtes successifs sous deux formes morphologiques distinctes, promastigote et amastigote (Figure 3). Les promastigotes sont une forme extracellulaire mobile vivant dans le tube digestif du phlébotome. Ils présentent un corps plus ou moins fuselé de 5 à 20 μm de long et 1 à 4 μm de large, prolongé par un flagelle émergent de leur pôle antérieur pouvant atteindre une longueur de 20 μm . Sous cette forme, le kinétoplaste est situé entre le noyau et la base du flagelle. Les amastigotes nichent au sein de vacuoles parasitophores, à l'intérieur des cellules phagocytaires mononucléées et plus particulièrement des macrophages. A ce stade, ils présentent un corps ovoïde d'environ 4 μm de long et 2 μm de large. Cette forme intracellulaire non mobile est également munie d'un flagelle, mais celui-ci est très court et ne dépasse pas le corps cellulaire (Antoine et al., 1999).

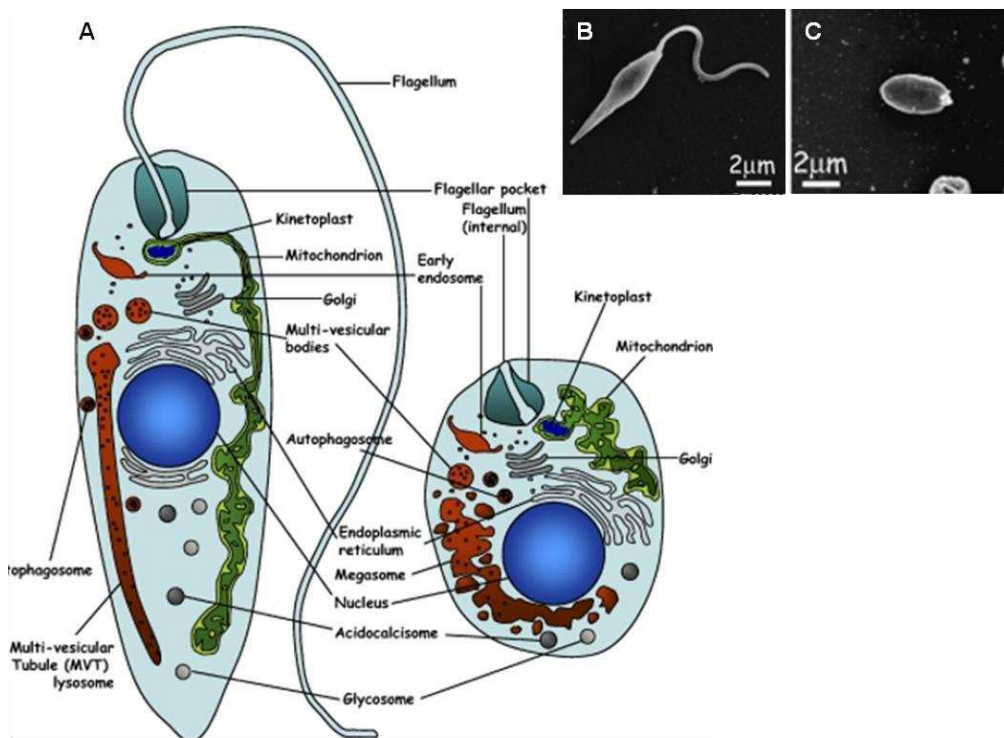


Figure 3 : Formes promastigote et amastigote des protozoaires du genre *Leishmania*. Représentation schématique des organelles principales d'un promastigote à gauche et d'un amastigote à droite (A). Images de microscopie électronique à balayage d'un promastigote procyclique en culture (B) et d'un amastigote isolé à partir d'un macrophage infecté isolé à partir d'une souris (C). D'après Besteiro et al., 2007.

La propagation des leishmanies se fait principalement par reproduction asexuée (Rougeron et al., 2010; Rougeron et al., 2011). Après l'apparition d'un flagelle-fils de petite taille, la division nucléaire s'effectue sans disparition préalable de l'enveloppe nucléaire et les chromosomes non condensés se répartissent dans les noyaux fils par migration le long d'un fuseau mitotique intra-nucléaire bipolaire composé de microtubules. Enfin, le kinétoplaste se divise à son tour. La cytodierèse s'effectue ensuite selon l'axe longitudinal des parasites commençant généralement au pôle antérieur.

3. Vecteur

Le vecteur des leishmanioses, le phlébotome, est un diptère hématophage de la famille des Psychodidae et de la sous-famille des Phlebotominae, qui comprend environ 700 espèces dont la systématique est controversée dans la communauté scientifique. Seuls les genres *Phlebotomus* et *Lutzomyia* sont impliqués dans l'épidémiologie des leishmanioses, dans l'Ancien Monde et le Nouveau Monde, respectivement. Les phlébotomes sont largement répandus dans le monde, partout où règne une température assez élevée (20-26°) pour leur permettre d'entrer en activité, au moins une partie de l'année. Ils sont donc répartis en zones tropicales où ils sont actifs toute l'année, et sub-tropicales où ils présentent une phase de repos hivernal, la diapause. Chaque espèce est inféodée à une aire géographique donnée, ainsi qu'à un paysage particulier au sein de cette aire. Le réchauffement climatique amorcé au début du XX^{ème} siècle tend à étendre l'aire de répartition géographique des phlébotomes et pourrait ainsi causer une recrudescence de cas de leishmanioses dans des régions géographiques aujourd'hui préservées (Dujardin et al., 2008; Shaw et al., 2009; Ready, 2010; Fischer et al., 2011).

Les phlébotomes sont des diptères de petite taille (2 à 5 mm) au corps grêle et allongé, recouvert d'une fine pilosité (Figure 4). La durée de vie des femelles phlébotomes est de deux semaines à trois mois, selon la température et l'hygrométrie. La durée de vie des mâles est moindre. Durant la journée, les phlébotomes se cachent dans des endroits retirés, sombres et relativement humides. De mœurs nocturnes, ils sortent à la tombée du jour si la température est assez élevée (19-20°) et s'il y a peu de vent. La femelle phlébotome pique alors les mammifères pour se nourrir du sang qui est essentiel au développement de ses larves. Elle est donc alors potentiellement contaminée par un repas sanguin sur un hôte infecté, mais cela n'aboutit pas nécessairement à la formation de promastigotes infectieux. En effet, il existe des interactions très spécifiques entre le parasite et son vecteur se traduisant pas un spectre d'hôtes relativement étroit (Tableau 2) (Léger et Depaquit, 1999).

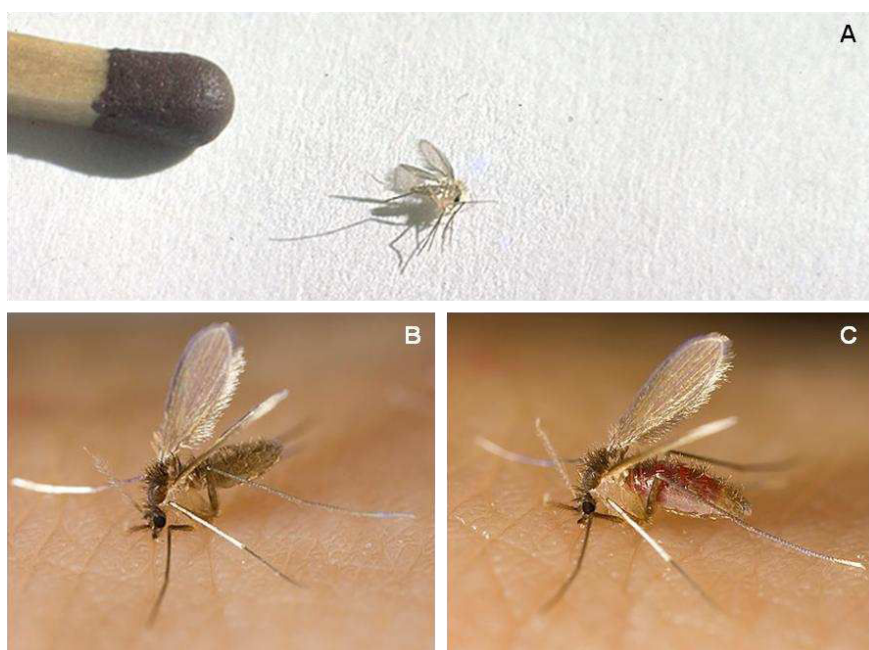


Figure 4 : Phlébotomes. Photographie d'une femelle phlébotome comparée à une tête d'allumette (A) Femelle *Phlebotomus argentipes* se gorgeant de sang humain (B-C). Crédits photos : Jean-Pierre Dedet et Ray Wilson.

Tableau 2 : Principales espèces de phlébotomes impliquées dans la transmission des leishmanies. D'après Dedet, 2002.

Genres	Sous-genres	Espèces incriminées	Espèces de <i>Leishmania</i> transmises
Ancien Monde			
Phlebotomus	Phlebotomus	patasi, duboscqi	major
	Paraphlebotomus	sergenti alexandri alexandri	tropica donovani (major)
	Synphlebotomus	martini ansarii	donovani (major)
	Larrousius	perniciosus, ariasi, perfilewi, neglectus, langeroni longipes, pedifer	infantum aethiopica
	Alderius	chinensis	infantum
	Euphlebotomus	argentipes	donovani
Nouveau Monde			
Lutzomyia	Lutzomyia	longipalpis diabolica	chagasi mexicana
	Nyssomyia	olmea olmea flaviscutellata olmea bicolor intermedia umbratilis, anduzei, whitmani trapidoi	mexicana amazonensis venezuelensis braziliensis guyanensis panamenis
	Psychodopygus	wellcomei panamensis	braziliensis (panamenis)
	Helcocyrtomyia	peruensis	peruviana
	Pintomyia	pessoai	braziliensis

Pour pouvoir se développer au sein du phlébotome, les leishmanies doivent franchir de nombreux obstacles tels que les enzymes digestives, la membrane péritrophique entourant le repas sanguin ou encore l'excrétion du contenu de l'intestin médian suite à la digestion, ce qui implique le passage par différents stades caractérisés par un remodelage cellulaire et biochimique significatif. Les amastigotes ingérés sont libérés par la rupture de leurs cellules hôtes lors de l'ingestion, et se transforment en promastigotes procycliques capables de proliférer. Puis ils se différencient en promastigotes nectomonades correspondant à un stade migratoire non-proliférant, allant du tube digestif postérieur au tube digestif antérieur grâce à leur flagelle facilitant l'adhérence aux microvillosités intestinales et évitant ainsi leur élimination par le transit intestinal. Ils se différencient en promastigotes leptomonades capables de se multiplier. Ils sont les précurseurs du processus final de différenciation des promastigotes au sein du phlébotome, la métacyclogenèse, aboutissant à l'accumulation de promastigotes métacycliques à la limite entre le tube digestif médian et le tube digestif antérieur. Ces promastigotes métacycliques correspondent au stade infectieux pour les mammifères. Incapables d'adhérer significativement aux cellules intestinales du phlébotome, ils peuvent être régurgités durant un repas sanguin ultérieur. Ce mécanisme de transmission des promastigotes métacycliques à un nouvel hôte est facilité par la production par les promastigotes leptomonades d'un gel de protéophosphoglycane filamenteux obstruant physiquement l'intestin de façon concomitante avec la métacyclogenèse, ce qui permet l'accumulation des promastigotes métacycliques plutôt que leur élimination via le transit digestif (Sacks, 2001; Bates et Rogers, 2004; Rogers et al., 2004; Bates, 2008; Wilson et al., 2010) (Figure 5).

Dans la nature, la prévalence d'infection des populations de phlébotomes par *Leishmania* n'excède pas 0,1%, y compris dans les zones endémiques. Les leishmanies sont donc capables d'influencer le comportement de la femelle phlébotome afin de favoriser leur transmission. En effet, l'infection accroît l'occurrence de piqûres après une interruption du repas sanguin et favorise les repas sanguins sur plusieurs hôtes successifs. Ces deux aspects du comportement du vecteur sont finement réglés sur la différenciation du parasite dans l'intestin, de sorte qu'ils ne sont observés que lorsque les promastigotes infectieux sont présents. Ces mécanismes procurent un avantage sélectif aux leishmanies qui sont ainsi plus facilement transmises aux mammifères (Rogers et Bates, 2007).

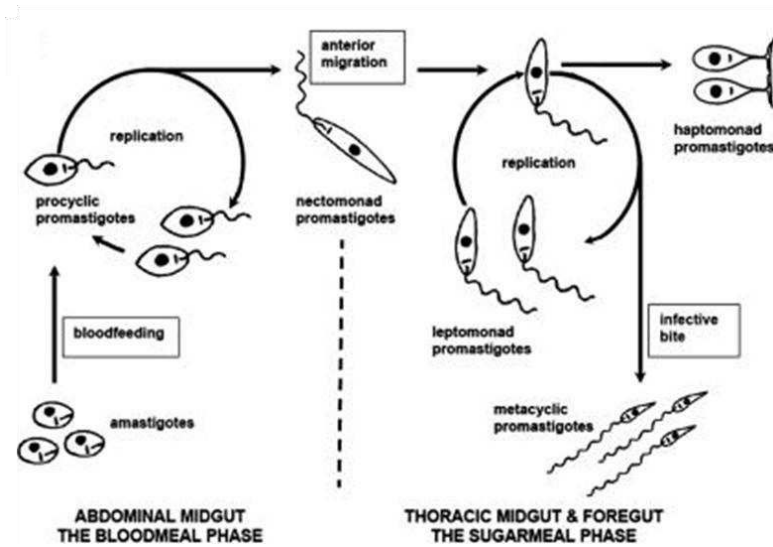


Figure 5 : Séquence de développement des cinq formes promastigotes majeures. D'après Bates et al., 2007.

4. Hôtes et réservoirs

Les leishmanies, qu'elles soient pathogènes ou non pour l'Homme, infectent les mammifères. Ceux-ci peuvent être des hôtes réservoirs ou accidentels selon le complexe pathogène incriminé. Les hôtes réservoirs permettent la survie du parasite jusqu'à la prochaine saison de transmission, et doivent être infestants pour le vecteur, avec des parasites présents au niveau de lésions tégumentaires chroniques, voire dans la peau saine ou dans le sang. Ceci implique une pathogénicité modérée du parasite à l'égard de son hôte réservoir, permettant un équilibre entre le maintien du parasitisme et les défenses immunitaires de l'hôte. Les parasites ne peuvent être transmis à l'Homme que si la niche écologique du vecteur intègre simultanément celle de l'Homme et celle du réservoir, ou si les migrations humaines placent l'Homme au croisement des niches du vecteur et du réservoir.

Dans l'Ancien Monde, 37 espèces de mammifères appartenant à 25 genres ont été trouvées infestées par des leishmanies appartenant à 8 complexes. Dans le Nouveau Monde, 25 espèces de mammifères appartenant à 21 genres sont porteurs de leishmanies appartenant à 7 complexes du sous-genre *Leishmania*, et 26 espèces appartenant à 18 genres sont porteurs de 7 complexes du genre *Viannia*. L'Homme est en général un hôte accidentel pour les leishmanies, à l'exception des complexes *L. tropica* et *L. donovani*, considérés comme strictement anthroponotiques, avec l'Homme comme unique réservoir. A l'inverse, les Canidae, en particulier les chiens domestiques, occupent une place prépondérante dans les foyers de leishmaniose viscérale à *L. infantum* de l'Ancien et du Nouveau Monde, tandis que l'Homme est un hôte accidentel.

Au cours de son repas sanguin sur l'un de ses hôtes réservoir ou accidentel, le phlébotome infesté injecte 10 à 100 promastigotes métacycliques dans le derme, conjointement avec de la salive contribuant à l'établissement de l'infection, notamment via des effets immunomodulateurs et vasodilatateurs (Andrade et al., 2007). Les promastigotes se lient alors aux macrophages dermiques résidents et monocytes fraîchement recrutés au niveau du site infectieux qui les phagocytent rapidement. Les phagosomes ainsi produits peuvent aboutir à la destruction des promastigotes ou être convertis en un nouvel organite, la vacuole parasitophore, au sein de laquelle les promastigotes se différencient en amastigotes, mieux adaptés à la vie intracellulaire, et capables de proliférer par scissiparité. Il est généralement admis que la rupture des macrophages très infectés aboutit à la libération d'amastigotes rapidement phagocytés par d'autres macrophages. En effet, les amastigotes sont plus facilement phagocytés que les promastigotes et moins prompts à déclencher une flambée oxydative destructrice, ce qui favorise leur établissement et leur propagation au sein des cellules hôtes. Selon l'espèce leishmanienne incriminée et le statut immunologique de l'hôte, l'infection est contenue au niveau de la peau ou disséminée dans les muqueuses faciales, les ganglions lymphatiques ou les organes profonds tels que le foie, la rate et la moelle osseuse par des mécanismes encore relativement incompris.

III. Variabilité des présentations cliniques chez l'Homme

Il existe plusieurs espèces de leishmanies pathogènes pour l'Homme conduisant, selon les espèces, à trois formes cliniques principales : la leishmaniose cutanée bénigne, la leishmaniose cutanéomuqueuse délabrante pour les tissus et la leishmaniose viscérale potentiellement mortelle. Cependant, cette variabilité de présentations cliniques n'est pas entièrement expliquée par la seule biodiversité parasitaire, une même espèce pouvant être responsable de plusieurs formes de leishmanioses. Le statut immunitaire de l'hôte joue également un rôle important dans l'expression phénotypique de ces infections, comme en témoigne le nombre relativement important de formes asymptomatiques ou l'apparition de formes patentes chez les patients immunodéprimés. La susceptibilité génétique ainsi que le micro-environnement cellulaire sont également potentiellement impliqués dans le déterminisme des différentes manifestations cliniques.

1. Leishmanioses tégumentaires

La leishmaniose cutanée est la forme la plus commune de leishmanioses, avec 0,7 à 1,2 millions de nouveaux cas par an. Principalement observée au Maghreb, en Afrique de l'Ouest et de l'Est, avec 90% des cas mondiaux concentrés en Afghanistan, Brésil, Iran, Pérou, Arabie Saoudite et Syrie (Alvar et al., 2012) (figure 6).

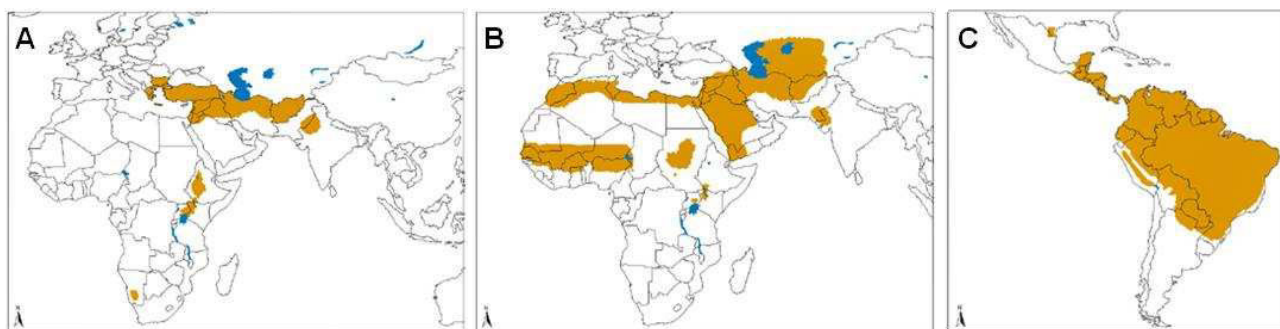


Figure 6 : Distribution des leishmanioses tégumentaires. Répartition géographique des leishmanioses cutanées à *L. tropica* et *L. aethiopia* (A) et des leishmanioses cutanées à *L. major* (B) dans l'Ancien Monde. Répartition des leishmanioses cutanéomuqueuses dans le Nouveau Monde (C). D'après l'OMS.

Les formes de leishmaniose cutanée de l'Ancien Monde, également connues sous les noms de bouton d'Orient, bouton d'Alep ou encore clou de Biskra, sont en général « sèches », indolores, strictement cutanées et localisées (si l'on excepte les formes disséminées à *L. aethiopia*) (Figure 7A-B). Elles régressent généralement spontanément en quelques semaines à quelques mois. A l'inverse, les leishmanioses tégumentaires du Nouveau Monde sont plus sévères, du fait de leur caractère ulcérant et « humide », récidivant, diffus et mutilant, avec une atteinte cutanéomuqueuse très destructrice en l'absence de traitement, en particulier au niveau de la face. Après guérison, les cicatrices rétractiles indélébiles peuvent être la cause d'une exclusion sociale et de sérieux problèmes sociologiques (Figure 7C) (Weiss, 2008). La leishmaniose cutanéomuqueuse est observée exclusivement au Nouveau-Monde, où 90% des cas sont réunis en Bolivie, au Brésil et au Pérou.

Le diagnostic des leishmanioses tégumentaires repose dans un premier temps sur des critères cliniques. Ensuite, ce diagnostic est confirmé par le frottis d'un prélèvement par raclage du fond de l'ulcération qui, après coloration au May-Grunwald Giemsa, met en évidence la présence de leishmanies. La mise en culture du prélèvement en milieu NNN confirme également ce diagnostic par l'obtention d'une culture de promastigotes mobiles, qui peuvent ensuite être identifiés par biologie moléculaire pour un diagnostic spécifique. Selon le complexe pathogène incriminé, la

stratégie thérapeutique repose sur l'emploi de dérivés pentavalents de l'antimoine, qui restent le traitement de choix des leishmanioses tégumentaires, ainsi que sur l'emploi d'Amphotéricine B, de sels de pentamidine ou de miltefosine, en particulier dans le cas de leishmanioses tégumentaires du Nouveau-Monde résistantes aux antimoniés.



Figure 7: Lésions observées au cours des leishmanioses tégumentaires. Leishmaniose cutanée de l'Ancien Monde en Afghanistan (A). Leishmaniose cutanée du Nouveau Monde au Nicaragua (B). Lésion active de la muqueuse nasale au cours de la leishmaniose cutanéomuqueuse du Nouveau-Monde dans les basses terres amazoniennes (C). Crédits photos : Paula Bronstein, Action Damien / Jean Platteau et Calvopina et al., 2006.

2. Leishmaniose viscérale

La leishmaniose viscérale, principalement due à *L. infantum* et *L. donovani*, correspond à un tableau clinique plus sévère, puisqu'elle est mortelle en absence de traitement. Elle est observée dans 62 pays de l'Ancien et du Nouveau Monde et concerne 200 millions d'individus (Guerin et al., 2002) avec environ 200 000 à 400 000 nouveaux cas par an, dont 90% sont regroupés dans seulement 6 pays : l'Inde, le Bangladesh, le Soudan, le Soudan du Sud, l'Éthiopie et le Brésil (Alvar et al., 2012). Il est convenu de distinguer la leishmaniose viscérale indienne, appelée kala azar, de la leishmaniose viscérale zoonotique à *L. infantum*. Les cas de kala azar sont principalement observés en Afrique et en Asie mineure, et plus particulièrement en Inde, avec 50% des cas de leishmaniose viscérale mondiaux rassemblés dans l'état du Bihar, au nord-est du pays. La leishmaniose viscérale à *L. infantum* (*L. chagasi*) est observée en Amérique Latine, en Asie Centrale, en Afrique de l'Est et dans le bassin méditerranéen. Ce dernier représente un foyer historique de leishmaniose viscérale à *L. infantum*, en particulier en France, Espagne, Italie, Portugal et Croatie. En France, les régions concernées sont la Corse, la Côte d'Azur, la Provence, le Languedoc-Roussillon et les Cévennes (Figure 8).

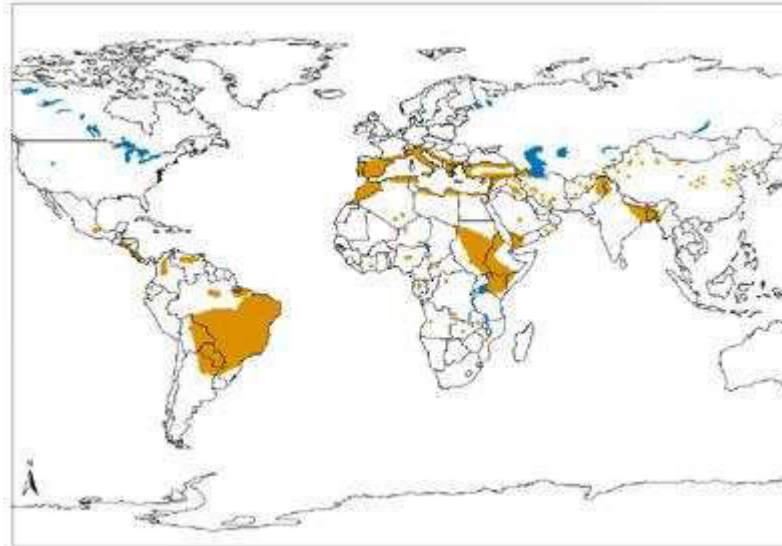


Figure 8 : Distribution géographique de la leishmaniose viscérale dans l’Ancien Monde et le Nouveau Monde. D’après l’OMS.

La leishmaniose viscérale zoonotique classique touche principalement le jeune enfant ; d’où le nom de *L. infantum*. Après une phase d’invasion insidieuse liée à une altération de l’état général de l’enfant, une triade symptomatique caractéristique se met en place en plusieurs semaines : fièvre, anémie et splénomégalie. La fièvre est irrégulière, capricieuse et résistante aux antibiotiques et aux anti-palludéens ; elle persiste durant plusieurs semaines. L’anémie se manifeste par une intense pâleur cireuse, éventuellement modulée par un ictère donnant un teint verdâtre. La splénomégalie est homogène avec une rate dure, lisse et indolore à la palpation pouvant dépasser l’ombilic. L’abdomen ainsi distendu contraste souvent avec la cachexie du patient (Figure 9A). Une hépatomégalie plus modérée, ferme et indolore, sans ascite ni ictère peut être associée à ces symptômes, ainsi que des adénopathies. Un syndrome hémorragique ou un épisode diarrhéique peuvent compléter le tableau, notamment en phase finale de la maladie. Il existe également chez l’enfant des formes atypiques, avec une splénomégalie isolée, une fièvre isolée au long cours, une atteinte rénale ou un syndrome d’activation macrophagique.

Outre cette forme classique de leishmaniose viscérale à *L. infantum* observée chez l’enfant, il existe des formes souvent moins caractéristiques chez l’adulte, avec des tableaux incomplets présentant une fièvre sans splénomégalie, une splénomégalie fébrile sans anémie ou une splénomégalie non fébrile. L’apparition de la maladie dans ce cas est en général associée à une immunosuppression sous-jacente, telle que l’immunosuppression induite par le VIH. L’apparition de la maladie résulte donc dans ce cas d’une infection primaire du sujet immunodéprimé ou de la réactivation d’une infection latente. Si dans la majorité des cas, le tableau clinique présente des

signes typiques, le diagnostic clinique de la leishmaniose viscérale peut être particulièrement difficile chez l'immunodéprimé. Les patients co-infectés par le VIH développent par exemple volontiers des manifestations inhabituelles et trompeuses compliquant le diagnostic, en particulier une viscéralisation pouvant s'étendre à des organes habituellement peu envahis, tels que les poumons, le larynx, le tube digestif et la peau. La leishmaniose viscérale de l'immunodéprimé s'accompagne de sérieuses difficultés thérapeutiques et d'une importante tendance à la rechute (Peters et al., 1990; Kubar et al., 1998; Desjeux et Alvar, 2003; Mary et al., 2004; Bourgeois et al., 2008; Colomba et al., 2009; Bourgeois et al., 2010).

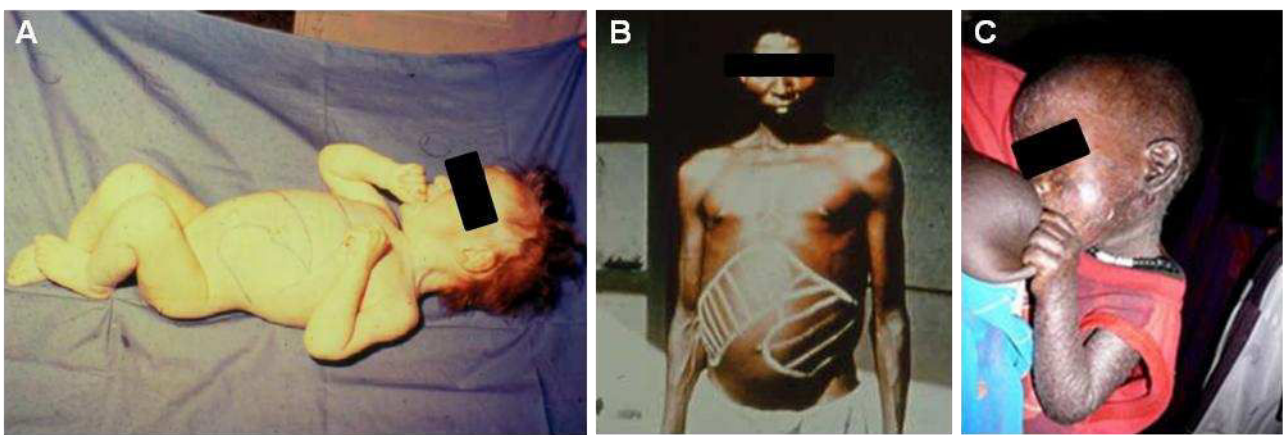


Figure 9 : Leishmaniose viscérale. Photographies d'un cas de leishmaniose viscérale chez l'enfant (A). Photographie d'un cas de kala azar chez l'adulte (B). Photographie d'un enfant présentant une dermatite post-kala azar au Soudan (C). Crédits photos : Philippe Desjeux et www.sudanmedicalrelief.org.

La leishmaniose viscérale anthroponotique, ou kala azar, atteint toutes les tranches d'âge de vie. La triade symptomatique est quasiment systématique, comme décrit par Thomas Briscoe dès 1869 : « The disease is brought on by repeated attacks of intermittent or remittent fever ; the spleen becomes enormously enlarged ; appetite very great : the sufferer loses flesh, and becomes a perfect skeleton, and, in general dies within a year ». En 1932, Twining écrit : « We sometimes see a chronic enlargement of the spleen, in adults of pale, sallow and unhealthy aspect ; who eat and drink as they did in health, and seem to endure the disease for many months without much suffering: except the inconvenience of a tumid belly, attended with shortness of breath ». En effet, après une phase d'incubation généralement silencieuse de 10 jours à un an, la maladie se déclare brutalement, avec des accès fébriles pseudo-palustres, l'apparition d'une anémie et d'un syndrome hépato-splénique, éventuellement associé à des adénopathies, et la mise en place d'une sévère cachexie (Figure 9B). Le kala azar se caractérise aussi par de multiples atteintes cutanées : des

teintes bistres du tégument, des macules érythémateux, des taches dépigmentées et une fréquente hyperpigmentation du visage, des mains et des pieds (à l'origine du terme kala azar). Il existe une autre manifestation cutanée, le PKDL (Post Kala azar Dermal Leishmaniasis), se présentant sous la forme de nodules, indolores, siégeant sur le visage ou sur le reste du corps (Figure 9C). Elle peut survenir au cours du développement de la maladie avec, dans ce cas, des nodules où abondent les leishmanies, soit après la mise en place du traitement. Ils apparaissent quelquefois après des années, parfois jusqu'à vingt ans après une guérison clinique dans les foyers indiens (Deniau et Houin, 1999).

Si l'observation d'une splénomégalie et/ou d'une hépatomégalie associées à des fièvres anarchiques orientent le diagnostic chez un patient résidant ou ayant voyagé en zone endémique, de nombreux arguments biologiques non spécifiques sont également évocateurs de leishmaniose viscérale : une anémie normochrome normocytaire peu régénérative (par hémolyse, hypersplénisme, inflammation et atteinte médullaire), une leuconéutropénie souvent profonde, une thrombopénie modérée et tardive, un syndrome inflammatoire avec hypoalbuminémie et hypergammaglobulinémie à IgG. De telles observations incitent le praticien à poursuivre les investigations avec des examens complémentaires de certitude, tels que l'examen direct après coloration, la mise en culture sur milieu spécifique ou encore de la biologie moléculaire sur une ponction de moelle osseuse ou sur le sang périphérique. La sérologie est également un argument d'orientation majeur pour l'hôte immunocompétent. L'isolement du parasite en culture permet un diagnostic spécifique et la caractérisation du zymodème incriminé.

Le traitement de la leishmaniose viscérale constitue de réelles difficultés thérapeutiques, du fait des coûts et de la toxicité des molécules classiquement utilisées, de l'apparition de résistances des parasites à ces molécules, ainsi que de l'état des patients souvent immunodéprimés. Parmi les molécules de première intention, deux sels d'antimoine chimiquement voisins sont employés, l'antimoniote de méglumine (Glucantime[®], Aventis) et le stibogluconate de sodium (Pentostam[®], GlaxoSmithKline) d'efficacité similaire. Le Glucantime[®] est prescrit quotidiennement pendant 28 jours par voie intra-musculaire profonde. Ces molécules peuvent être mal tolérées dès le début du traitement avec des effets secondaires modérés, tels que céphalées, vomissements ou myalgies ne conduisant pas à l'arrêt du traitement. En revanche, une intoxication survient parfois en fin de traitement, ce qui impose une surveillance rapprochée des patients en milieu hospitalier. Une mauvaise tolérance cardiaque, hématologique ou hépatique impose une diminution des doses voire un arrêt du traitement (Gangneux, 1999). L'apparition d'isolats parasitaires résistants aux antimoniés en Inde ne permet plus l'emploi de ces molécules en première intention. L'amphotéricine B (AmB) désoxycholate (Fungizone[®], Boyer Pharma) est donc l'alternative thérapeutique de choix dans le cas de leishmaniose viscérale résistante aux antimoniés en Inde (Gangneux, 1999). Administré par voie

intraveineuse durant 30 jours sous surveillance rapprochée, sa toxicité néphrologique et hématologique élevée compliquent son emploi. Depuis le développement de formulations lipidiques mieux tolérées, l'AmB liposomale (Ambisome[®], Gilead Sciences) est utilisé dans le traitement des leishmanioses viscérales en particulier chez les enfants et patients immunodéprimés, ainsi qu'en cas de résistance aux antimonies ou stibio-intolérance (Gangneux et al., 1996a). L'Ambisome[®] s'administre classiquement en 6 injections intra-veineuses lentes les 5 premiers jours puis le dixième, mais des schémas d'administration différents sont parfois employés chez l'immunodéprimé (Gangneux et al., 1996b). Outre ces molécules, l'administration quotidienne de Miltefosine par voie orale durant 28 jours est une alternative efficace en Inde, notamment chez l'enfant. Néanmoins, il est nécessaire de contrôler les fonctions hépatiques et néphrologiques au cours du traitement, et de possibles effets tératogènes contre-indiquent son emploi chez les femmes en âge de procréer (Sundar et al., 1998). Différentes molécules ont été proposées pour le traitement des leishmanioses viscérales, mais la diversité des résultats cliniques limite leur emploi aux traitements de seconde intention, en mono voire en bithérapie (Desjeux et Alvar, 2003). Il s'agit de l'aminosidine sulfate (Gabbriomycin[®]) et la pentamidine (Pentacarinat[®]). L'allopurinol, le métronidazole ou encore les dérivés azolés antifongiques (kétoconazole, itraconazole) inhibant la synthèse d'ergostérol chez les leishmanies ont également été employés avec un succès variable (Gangneux, 1999). Face aux contraintes et difficultés thérapeutiques de la leishmaniose viscérale, la recherche scientifique s'attache encore aujourd'hui à développer de nouvelles molécules anti-leishmaniennes (Dureau et al., 2010; Eltayeb et Ibrahim, 2012; Singh et al., 2012). Des immunothérapies visant à optimiser les défenses de l'hôte contre les leishmanies sont enfin envisagées. Des essais ont notamment indiqué que l'IFN- γ majore l'efficacité du Glucantime[®] et pourrait être intéressant en bi-thérapie (Gangneux, 1999). Le ciblage du système immunitaire de l'hôte semble donc pertinent et fait l'objet de nombreuses recherches (Dalton et Kaye, 2010; Karmakar et al., 2012; Mukhopadhyay et al., 2012).

3. Portage asymptomatique, persistance parasitaire et risques de réactivation

Si l'infection par *L. infantum* ou *L. donovani* évolue volontiers vers une leishmaniose viscérale potentiellement mortelle en absence de traitement, elle peut également évoluer vers des formes sub-cliniques caractérisées par des symptômes modérés et transitoires, voire demeurer silencieuse et exempte de symptômes. De nombreux travaux publiés depuis les années 1970 indiquent que les formes patentes correspondent finalement à la face émergée de l'iceberg et que les formes sub-cliniques et asymptomatiques sont plus fréquentes qu'on ne le supposait, chez l'Homme et le chien (Pampiglione et al., 1975; Badaro et al., 1986; Meller-Melloul et al., 1991; Michel et al., 2011). Suite à la primo-infection, la majorité des sujets reste donc asymptomatique ou développe une

forme bénigne spontanément résolutive de la maladie. En outre, après une leishmaniose viscérale patente ou bénigne guérie, les parasites persistent durablement dans l'organisme contribuant alors au portage asymptomatique des leishmanies (Bogdan, 2008). Chez l'Homme, dans le cas de *L. infantum/chagasi*, le portage asymptomatique représente selon les études de 0,5 à 58 % des individus contrôlés dans le Bassin Méditerranéen (Papadopoulou et al., 2005; Mary et al., 2006), et de 0,05 à 73,4 % en Amérique du Sud (Passos et al., 2005; Silveira et al., 2010). Dans le cas de *L. donovani*, différentes études récentes ont démontré l'existence d'un portage asymptomatique d'une fréquence allant de 6,2 à 20,8 % selon les régions étudiées et les outils employés (Bhattarai et al., 2009; Das et al., 2011; Hasker et al., 2013). La proportion de porteurs asymptomatiques dépend donc des zones géographiques considérées, mais aussi des tests de détection employés. En général, l'amplification de l'ADN kinétoplastique et la détection d'anticorps spécifiques par Western Blot sont plus sensibles que les autres méthodes de détection, telles que l'intradermo-réaction à la leishmanine ou les tests d'immuno-fluorescence des anticorps (Michel et al., 2011). Ainsi, de nombreux progrès ont été faits dans l'évaluation de la fréquence du portage asymptomatique grâce à l'emploi de techniques fines de biologie moléculaire. Toutefois, il est possible que l'importance du portage asymptomatique soit sous-estimée aujourd'hui encore dans de nombreuses aires endémiques.

La persistance des leishmanies à l'abri des défenses de l'hôte après une primo-infection asymptomatique ou une leishmaniose viscérale guérie pourrait contribuer à expliquer la résistance à la ré-infection chez les sujets asymptomatiques. En effet, la présence de leishmanies vivantes à bas bruit conduirait à une stimulation continue du système immunitaire inné et adaptatif, et pourrait contribuer au maintien de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ mémoires protectrices (Bogdan, 2008). Toutefois, la persistance parasitaire et le portage asymptomatique peuvent également s'avérer fortement délétères. En effet, si la souche de leishmanies incriminée ainsi que les prédispositions génétiques des sujets conditionnent partiellement l'expression de la maladie, leur âge et leur statut immunologique jouent également un rôle important. Ainsi, lorsque le statut immunologique des porteurs asymptomatiques évolue, ceux-ci peuvent développer une forme patente ultérieure parfois jusqu'à 5 ans après un séjour en zone endémique (Rosenthal et al., 1988), ou une rechute après une leishmaniose viscérale guérie (Mary et al., 2004; Bourgeois et al., 2008). L'immunodéficience induite par le VIH constitue l'un des facteurs de risque de réactivation parasitaire les plus fréquents, et occasionne l'apparition de formes patentes ou de formes chroniques actives, parfois associée à une localisation inhabituelle des leishmanies (Peters et al., 1990; Kubar et al., 1998; Desjeux et Alvar, 2003; Colomba et al., 2009; Bourgeois et al., 2010). Les traitements immunosuppresseurs administrés dans le cas de maladies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïdes (Pittalis et al., 2006; Molto et al., 2010) ou une immunosuppression iatrogène dans le cadre d'une greffe

d'organe (Basset et al., 2005; Xynos et al., 2009) sont également un facteur de risque de réactivation leishmanienne. En conséquence, il est recommandé dans ce dernier cas, de rechercher un portage asymptomatique possible des leishmanies, à la fois chez le donneur et le receveur d'organe, afin d'éviter le risque de réactivation chez le receveur, ainsi que le risque d'une primo-infection chez le receveur par le greffon infecté du donneur (Basset et al., 2005; Bautista et al., 2012). La pauvreté et la malnutrition sont également des facteurs de risque de réactivation des leishmanies (Alvar et al., 2006; Boelaert et al., 2009), ce qui pourrait expliquer en partie les flambées épidémiques de kala azar durant les épisodes de famine et de guerre civile. Enfin, il arrive occasionnellement que des réactivations parasitaires surviennent chez des sujets apparemment immunocompétents (Colomba et al., 2004; Lagadinou et al., 2013). Sur une cohorte de sujets asymptomatiques suivis en Inde, 69 % ont présenté un kala azar dans l'année suivant leur recrutement. Une prophylaxie des leishmanioses latentes a donc été proposée comme une piste pour l'éradication de la leishmaniose viscérale (Singh et al., 2002).

Le portage asymptomatique des leishmanies n'est donc pas l'épiphénomène autrefois soupçonné, et il semble aujourd'hui important de contrôler la fréquence des porteurs asymptomatiques, qui constituent des sujets à hauts risques pour l'apparition d'une leishmaniose viscérale patente, mais également un réservoir potentiel de leishmanies (Michel et al., 2011).

Partie 2 : Physiopathologie et immunologie de la leishmaniose viscérale

Au cours de la leishmaniose viscérale, les parasites du genre *Leishmania* sont capables de détourner les défenses de l'hôte afin de coloniser la moelle osseuse et les viscères, tels que le foie et la rate, qui mettent en jeu des réponses immunes tissulaires distinctes.

I. Réponse cutanée initiale et dissémination viscérale

La première défense de l'organisme contre les agents infectieux est la barrière constituée par l'épiderme et les muqueuses, ainsi que les vaisseaux sanguins dont la régulation permet l'infiltrat de cellules immunocompétentes. Au niveau de la peau, les leishmanies interagissent en premier lieu avec les cellules résidentes, c'est-à-dire les kératinocytes, les macrophages dermiques et les cellules dendritiques, ainsi qu'avec de nombreux facteurs solubles.

Outre leur fonction de barrière mécanique entre l'hôte et l'environnement, les kératinocytes sont capables de sécréter des molécules participant à la régulation de la réponse immunitaire. En réponse à *L. major*, ils ont notamment été associés à la production de médiateurs immuno-modulateurs comme l'IL-12, l'IL-1 β , l'ostéopontine, l'IL-4 et l'IL-6, participant ainsi à l'initiation d'une immunité protectrice contre les leishmanies (Ehrchen et al., 2010).

Les protéines du complément constituent également l'une des premières lignes de défense de l'organisme contre les micro-organismes qui parviennent à passer outre la protection des barrières épithéliales et muqueuses. L'activation de ces protéines par la voie classique entraîne la fixation de C3 sur la membrane plasmique des parasites et son clivage en C3b, capable de se fixer au LPG ou à la protéine gp63 et de déclencher la formation du complexe lytique C5b-9 aboutissant à la lyse parasitaire (Pearson et Steigbigel, 1980). Les promastigotes qui échappent à l'action délétère du complément infectent leurs cellules cibles capables de phagocytose.

Les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques dermiques jouent le rôle de sentinelles contre les micro-organismes au niveau de l'épiderme et du derme, respectivement. Dans des conditions homéostatiques, les cellules de Langerhans sont immobiles et caractérisées par des mouvements de leurs dendrites, tandis que les cellules dendritiques dermiques sont hautement motiles et évoluent continuellement dans l'espace interstitiel (Ng et al., 2008). Après infection par *L. major*, elles s'immobilisent en réponse aux PAMP et phagocytent rapidement un grand nombre de leishmanies. Des travaux récents ont démontré que ce sont ces cellules dendritiques dermiques Langerin⁻ qui migrent vers les ganglions lymphatiques et participent à la mise en place d'une

immunité protectrice contre *L. major* (Ritter et al., 2004; Brewig et al., 2009). L'implication des cellules de Langerhans et des cellules dendritiques dermiques dans l'initiation d'une réponse immune spécifique contre les leishmanies viscérotropes n'est pas documentée.

Les macrophages dermiques phagocytent également les promastigotes par un mécanisme dépendant du CR3 (Locksley et al., 1988). Néanmoins, les cibles principales des leishmanies ne sont pas les macrophages résidents, mais les macrophages migrants en provenance de la circulation sanguine. Les promastigotes de *L. major* sont notamment capables d'induire la production de CXCL1 agissant comme un chimio-attractant pour les monocytes et neutrophiles (Racoosin et Beverley, 1997)

Les polynucléaires neutrophiles, l'un des premiers types cellulaires à migrer vers le site de l'infection sont capables de phagocyter les leishmanies (Chang, 1981; Pearson et Steigbigel, 1981). Une fois ingérées, les leishmanies peuvent être détruites par des enzymes protéolytiques ainsi que par la production d'espèces réactives de l'oxygène. Les neutrophiles ayant phagocyté des leishmanies sécrètent de l'IL-8, dans le but d'attirer d'autres neutrophiles au site de l'infection (Laufs et al., 2002). Les neutrophiles sont des cellules à demi-vie courte, du fait d'un mécanisme apoptotique déclenché après 6 à 10 heures (Squier et al., 1995). Cependant, les leishmanies peuvent prolonger la vie des neutrophiles de 2 à 3 jours (Aga et al., 2002). L'intérêt pour les leishmanies est de laisser le temps aux neutrophiles notamment, de recruter des monocytes/macrophages par la sécrétion de chimiokines (Scapini et al., 2000). Une fois les macrophages au contact des neutrophiles infectés, ceux-ci entrent en apoptose et sont alors phagocytés (Fadok et al., 1992). L'ingestion de cellules apoptotiques n'active pas la machinerie microbicide des macrophages (Meagher et al., 1992) et serait donc pour les leishmanies une manière idéale d'entrer silencieusement dans leurs cellules hôtes préférentielles (Laskay et al., 2003; Gueirard et al., 2008). Les neutrophiles infectés phagocytés par les cellules dendritiques seraient également capables de réprimer les propriétés fonctionnelles de ces dernières (Ribeiro-Gomes et al., 2012) (Figure 10). En outre, les promastigotes de *L. donovani* sont capables d'induire la sécrétion par les neutrophiles d'un piège extracellulaire, constitué de structures filamenteuses, capables de les piéger et les tuer (Guimaraes-Costa et al., 2009). Ce mécanisme permettrait de contenir l'infection au niveau du site de l'inoculation, mais pourrait également être un moyen d'immobiliser les promastigotes afin de faciliter leur phagocytose par les phagocytes mononucléés recrutés au niveau du site infectieux (Gabriel et al., 2010).

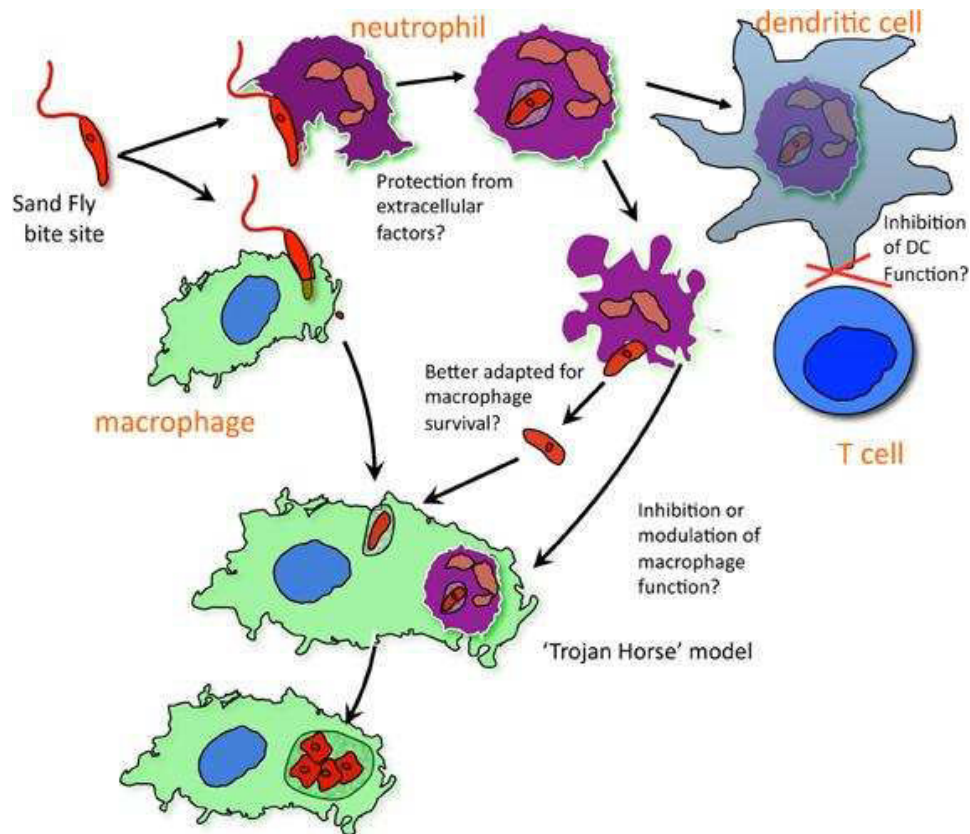


Figure 10 : Rôle des neutrophiles au niveau du site de transmission des *Leishmania*. D'après Ribeiro-Gomes et al., 2012.

Lors de son repas sanguin, la femelle phlébotome inocule avec les promastigotes certains éléments salivaires capables d'influencer les défenses innées de l'hôte au niveau de la peau. Des extraits de glande salivaire de *Lutzomyia longipalpis* ont été notamment démontrés comme inducteurs de la sécrétion de CCL2, attirant ainsi les monocytes au niveau du site de la piqûre (Teixeira et al., 2005). Le maxadilan produit par *Lutzomyia longipalpis* présente quant à lui un effet vasodilatateur (Lerner et Shoemaker, 1992), et pourrait donc favoriser l'infiltrat des neutrophiles et monocytes, cellules cibles des leishmanies assurant leur colonisation des viscères.

Ainsi, ces différents acteurs moléculaires et cellulaires permettent l'organisation d'une réponse locale, avec le recrutement en premier lieu des polynucléaires neutrophiles entre 1 et 24 heures après infection. L'infiltrat devient ensuite principalement mononucléaire avec l'afflux majoritaire après 48 heures de monocytes, qui s'organisent en nodules afin de circonscrire les parasites. Des granulomes bien organisés sont observés et corrèlent avec la disparition des leishmanies, comme observé après 45 jours chez le hamster syrien infecté par *L. donovani* (Laurenti et al., 1990). Cependant, cette réponse spécifique et efficace s'organise en un temps relativement long permettant

la dissémination des leishmanies viscérotropes avant la clairance parasitaire cutanée. *L. donovani* est notamment détecté au niveau du foie et des organes lymphoïdes, à partir de 45 jours après infection chez le hamster syrien (Laurenti et al., 1990). Chez l'immunodéprimé, les leishmanies sont aussi disséminées via la circulation sanguine dans des tissus moins typiques (Rosenthal et al., 2000), tels que la peau (Perrin et al., 1995; Colebunders et al., 1999), l'estomac et les intestins (Laguna et al., 1994; Balkhair et Ben Abid, 2008), les poumons (Heudier et al., 1993) ou les cavités pleurale (Munoz-Rodriguez et al., 1997) ou péritonéale (Munoz-Rodriguez et al., 1997; Oregioni et al., 2003).

II. Réponse immune au cours de la leishmaniose viscérale

1. Immunité innée

Les cellules endothéliales constituent l'une des premières lignes de défense contre les infections dans les tissus. Dans le foie, la clairance des antigènes provenant de la circulation sanguine se produit en premier lieu au niveau des cellules endothéliales sinusoïdales. Elles sont en effet capables de phagocytose et d'endocytose, elles expriment constitutivement à leur membrane les molécules nécessaires à la présentation antigénique et l'induction de la lympho-prolifération (CD54, CD80, CD86, CD40 et CMH de classe I et II) et peuvent fonctionner comme des cellules présentatrices d'antigènes pour les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Knolle et Gerken, 2000; Limmer et al., 2000). Au cours de la leishmaniose viscérale, les cellules endothéliales sinusoïdales sont permissives à *L. donovani*. En réponse au céramide produit par les cellules de Kupffer, elles modifient la balance entre la NO synthase endothéliale et la NAD(P)H oxydase, aboutissant à la répression du taux de dérivés réactifs de l'azote circulants, contribuant ainsi à la progression de la leishmaniose viscérale au niveau systémique (Chowdhury et al., 2011). Des propriétés immuno-modulatrices, telles que la répression de l'IFN- γ au niveau des cellules T CD4⁺, sont observées chez la souris (Carambia et al., 2013), et mériteraient d'être explorées au cours de la leishmaniose viscérale humaine. Enfin, l'expression de VCAM-1 accrue au niveau des cellules endothéliales au cours de la leishmaniose cutanée favorise l'infiltrat de monocytes et lymphocytes (Henseleit et al., 1995). Une fonction similaire au cours de la leishmaniose viscérale n'est pas exclue.

Les polynucléaires neutrophiles jouent un rôle décisif au cours de la réponse contre les leishmanies viscérotropes. Le niveau plasmatique de la myéloperoxydase (MPO), enzyme majoritairement exprimée par les neutrophiles, est significativement accru chez les patients atteints de leishmaniose viscérale comparés à des sujets sains, et corrèle avec le niveau d'IL-8 (Elshafie et

al., 2011). La moitié des neutrophiles circulant expriment la molécule CD28 qui intervient dans l'induction de la sécrétion d'IFN- γ par les macrophages et l'activation des lymphocytes T (Venuprasad et al., 2002; Venuprasad et al., 2003). Au cours de la leishmaniose expérimentale, les neutrophiles jouent un rôle protecteur important lors des stades précoces suivant l'infection par *L. infantum* ou *L. donovani* (Rousseau et al., 2001; McFarlane et al., 2008). Après infection de souris BALB/c par *L. infantum*, les neutrophiles phagocytent et détruisent rapidement les leishmanies. La suppression des neutrophiles induit une augmentation de la charge parasitaire splénique, mais n'influence pas la charge parasitaire hépatique. Au cours de l'infection tardive, la suppression des neutrophiles n'influence pas les charges parasitaires hépatiques et spléniques, suggérant un rôle précoce de ces cellules n'influençant pas la mise en place d'une réponse chronique dans ce modèle (Rousseau et al., 2001). Cependant, chez des souris BALB/c infectées par *L. donovani*, la suppression des neutrophiles induit des charges parasitaires accrues dans la rate, la moelle osseuse, et dans une moindre mesure dans le foie. Cette susceptibilité accrue est associée à une splénomégalie accrue, un délai de maturation des granulomes hépatiques et une répression de l'expression de la NO synthase inductible (iNOS). La suppression des neutrophiles induit également des niveaux accrus d'IL-4 et d'IL-10 dans le sérum et dans la rate, ainsi qu'une répression de la sécrétion d'IFN- γ par les cellules spléniques T CD4⁺ et CD8⁺. Outre leur fonction leishmanicide effectrice, les neutrophiles semblent être des acteurs influençant les défenses de l'hôte en faveur d'une immunité protectrice de type Th1 (McFarlane et al., 2008). Par ailleurs, l'élastase des neutrophiles est capable d'induire l'activation des macrophages et leur activité leishmanicide dépendante du TNF- α au cours de la leishmaniose cutanée à *L. major* (Ribeiro-Gomes et al., 2007), et pourrait jouer un rôle protecteur similaire au cours de la leishmaniose viscérale (Figure 11).

Comme les neutrophiles, les macrophages peuvent capturer des micro-organismes par phagocytose. Dans le cas des leishmanies, la phagocytose des promastigotes est induite par l'engagement des récepteurs du complément CR1 et CR3 avec les protéines C3b et C3bi respectivement, fixées à la surface des promastigotes (Rosenthal et al., 1996). Une fois phagocytés, les promastigotes se différencient en amastigotes au sein de vacuoles parasitophores. Comme les vésicules des compartiments pré-lysosomiaux ou lysosomiaux, les vacuoles parasitophores se caractérisent par un pH acide inférieur à 5. Elles contiennent des quantités importantes de protéines lysosomiales et leur membrane est associée à plusieurs protéines impliquées dans les processus de dégradation et d'apprêtement des antigènes. Les leishmanies amastigotes sont des organismes acidophiles dont le métabolisme est optimal à pH 4 à 5,5, de sorte qu'elles résistent relativement bien à l'environnement inhospitalier des vacuoles parasitophores (Zilberstein et Shapira, 1994). Elles sont résistantes aux hydrolases et aux protéases lysosomiales, vraisemblablement parce que les protéines qu'elles expriment à leur surface sont masquées par des glyco-inositol-phospholipides

(McConville et al., 2007). L'infection des macrophages par des pathogènes intracellulaires induit généralement la production rapide de facteurs chimiotactiques tels que CCL2 et CCL20 et de cytokines telles que le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-12, qui provoquent et amplifient la réaction inflammatoire en attirant et activant d'autres cellules immunitaires (Basu et Ray, 2005). La résolution de l'infection repose sur l'activation des macrophages et la production de dérivés réactifs de l'azote (Bogdan et al., 2000b).

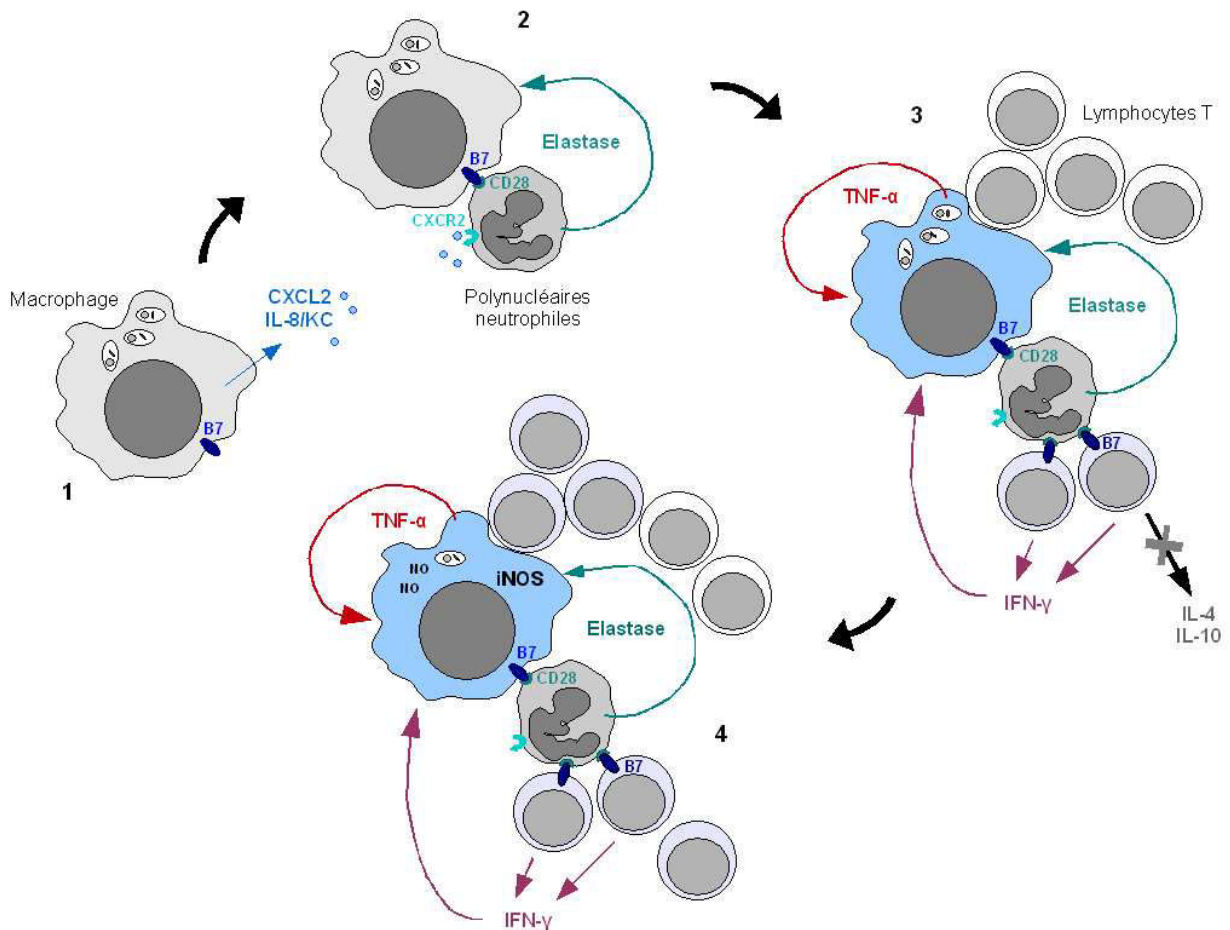


Figure 11 : Représentation schématique des rôles des polynucléaires neutrophiles dans l'activation macrophagique, l'activation lymphocytaire et la leishmanicidie. Sécrétion par les macrophages infectés des chimiokines assurant le recrutement des polynucléaires neutrophiles (1). Interaction CD28/B7 des macrophages avec les neutrophiles recrutés et l'élastase neutrophilique (2). Recrutement des lymphocytes T et activation lymphocytaire Th1 via l'interaction CD28/B7 avec les polynucléaires neutrophiles, et activation macrophagique dépendante de l'interaction avec les polynucléaires neutrophiles et du TNF- α et l'IFN- γ produits (3). Induction par l'élastase des neutrophiles de la leishmanicidie dépendante du TNF- α via le NO produit par la NO synthase inducible (iNOS) (4). Schéma proposé à partir des données de Venuprasad et al., 2002 et 2003, Ribeiro-Gomes et al., 2007 et McFarlane et al., 2008.

Les cellules dendritiques sont recrutées notamment par le CCL20 exprimé par les macrophages infectés. Elles sont capables de phagocyter les leishmanies notamment via les CR1 et CR3, la lectine de type C DC-SIGN et les récepteurs aux IgG Fc γ RI et Fc γ RIII (Woelbing et al., 2006). Des cellules dendritiques contenant des leishmanies sont donc observées au cours des leishmanioses

expérimentales cutanées (Blank et al., 1993; Moll et al., 1995a; Moll et al., 1995b; Woelbing et al., 2006) et viscérales (Gorak et al., 1998). Plus que des cellules hôtes, en raison de leur forte densité en molécules du CMH de classe I et II, elles constituent des cellules présentatrices d'antigènes particulièrement performantes, capables d'induire efficacement l'activation des cellules T (Marovich et al., 2000; Guermonprez et al., 2002). De plus, les cellules dendritiques sont la source de différentes cytokines telles que l'IL-12 (Cella et al., 1996), l'IL-10 (Qi et al., 2003) et l'IFN- γ (Stober et al., 2001). Au début de l'infection par *Leishmania*, les cellules dendritiques sont notamment une source majeure d'IL-12, cytokine favorisant la différenciation des cellules T naïves en lymphocytes Th1 protecteurs (Reis e Sousa et al., 1997).

Les lymphocytes NK sont l'un des premiers types cellulaires recrutés au niveau du site infectieux. Plusieurs études ont montré que des promastigotes vivants de *Leishmania* sont capables de stimuler les cellules NK humaines qui sécrètent précocement des niveaux importants d'IFN- γ influençant positivement les défenses de l'hôte (Akuffo et al., 1993; Nylén et al., 2003).

2. Rôle des lymphocytes B et réponse humorale

L'infection par les parasites du genre *Leishmania* est caractérisée chez l'Homme par l'activation des lymphocytes B et l'apparition d'anticorps spécifiques anti-leishmaniens. Dans la leishmaniose cutanée, ils sont généralement détectés durant la phase active de la maladie. Ils constituent un marqueur prédictif d'une évolution défavorable et s'amenuisent après un traitement efficace (Miles et al., 2005). Des études réalisées chez la souris BALB/c infectée par *L. major* suggèrent que la réponse spécifique des lymphocytes B par la production d'anticorps contribue à la progression de la maladie, via l'activation des lymphocytes T régulateurs, l'induction d'IL-10 et la promotion d'une réponse Th2 au niveau des lésions cutanées (Sacks, 1988; Miles et al., 2005; Ronet et al., 2010). En revanche, chez des souris C3H/HeN résistantes à l'infection, les lymphocytes B semblent contribuer à la mise en place d'une réponse T favorable au contrôle de l'infection au niveau des lésions cutanées dues à *L. major* (Scott et al., 1986). Au cours de la leishmaniose viscérale, des taux élevés d'anticorps spécifiques sont détectés chez l'Homme (Ravindran et al., 2004), mais le rôle de ces anticorps est encore relativement confus. Au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale, des études ont identifié des lymphocytes B220⁺ dans les granulomes hépatiques de souris BALB/c infectées par *L. donovani* (McElrath et al., 1988). Ces cellules B seraient associées à un retard de formation des granulomes et de clairance parasitaire chez des souris C57BL/6 (Smelt et al., 2000). Toutefois, le recrutement exacerbé des neutrophiles et les dommages hépatiques observés chez les souris déficientes en lymphocytes B suggèrent un rôle pour les lymphocytes B dans la régulation nécessaire de l'immuno-pathologie au cours de la leishmaniose viscérale (Smelt et al., 2000). Chez

les souris BALB/c, l'activation précoce des lymphocytes B en réponse à l'infection par *L. infantum* et la production d'IgM en conséquence a été associée à l'exacerbation de la leishmaniose viscérale (Deak et al., 2010).

3. Rôle des lymphocytes T et balance Th1/Th2

Le contrôle de l'infection par les parasites du genre *Leishmania* est toujours associé à une réponse immunitaire de type Th1 dominante, caractérisée par la sécrétion d'IFN- γ et d'IL-2. Les formes sévères de leishmaniose cutanée à *L. major* sont associées à une forte réponse de type Th2 caractérisée par la sécrétion d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10, alors qu'une réponse Th1 caractérisée par la production d'IFN- γ et d'IL-2 prédomine dans les formes modérées de la maladie (Heinzel et al., 1989; Gaafar et al., 1995). Au cours de la leishmaniose viscérale, le contrôle de l'infection dépend des réponses immunes cellulaires innée et adaptative induites par l'IFN- γ , conduisant à la destruction intracellulaire des parasites par les macrophages activés (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998). Cependant, la dichotomie Th1/Th2 n'est pas aussi claire qu'au cours de la leishmaniose cutanée, et le contrôle de l'infection repose sur une délicate balance entre les réponses Th1 et Th2. Différentes études suggèrent que des réponses mixtes Th1/Th2 sont induites au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale (Rolao et al., 2007), au cours des leishmanioses viscérales humaines (Zwingenberger et al., 1990; Kemp et al., 1993b; Kemp et al., 1993c; Kurtzhals et al., 1994; Bahrenscheer et al., 1995; D'Oliveira Junior et al., 1997; Sundar et al., 1997a). En effet, des dosages cytokiniques plasmatiques réalisés chez des patients présentant une leishmaniose viscérale active à *L. infantum/chagasi* révèlent un profil mixte inflammatoire et régulateur, caractérisé par une augmentation simultanée d'IL-8, d'IFN- γ , de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-10 (Peruhype-Magalhaes et al., 2006). Au sein de ce milieu mixte Th1/Th2, la phase active de la maladie est caractérisée par une réponse Th1 réprimée avec de faibles niveaux d'IFN- γ , associée à une réponse Th2 élevée avec de hauts niveaux d'IL-4 (Carvalho et al., 1985; Zwingenberger et al., 1990; Holaday et al., 1993; Hailu et al., 2001). Plus que le développement d'une réponse Th2, c'est la suppression antigène-spécifique de la réponse immunitaire cellulaire qui entraîne la progression de la maladie (Haldar et al., 1983; Sacks et al., 1987; Carvalho et al., 1988; Carvalho et al., 1989). La polarisation Th1 et l'immunité cellulaire anti-leishmanienne protectrices sont restaurées par une chimiothérapie efficace (Koech, 1987; Hailu et al., 2001).

Les acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans le maintien de l'environnement mixte Th1/Th2 et dans l'immunosuppression de la réponse cellulaire ont été étudiés au cours de la leishmaniose viscérale. Chez les sujets asymptomatiques, l'IFN- γ est produit par une sous-population particulière de lymphocytes T CD4⁺ sécrétant conjointement de l'IL-5 susceptible de

contribuer à la résistance à l'infection chez l'Homme (Mary et al., 1999). Les lymphocytes T CD8⁺ sont également une source importante d'IFN-γ chez les sujets résistants (Mary et al., 1999). Cependant, des clones de lymphocytes T CD8⁺ isolés à partir de patients en phase aiguë de leishmaniose viscérale induisent la production d'IL-10 et pourraient participer à la progression de la maladie (Gasim et al., 1998). En effet, il a été décrit chez certains patients une proportion plus importante de cellules CD8⁺ que de lymphocytes CD4⁺ (Gasim et al., 1998; Holaday, 2000). Ainsi, la population de lymphocytes CD8⁺ suppresseurs et les populations CD4⁺ Th1 pourraient avoir des effets régulateurs opposés contribuant respectivement aux mécanismes de sensibilité et résistance (Holaday, 1999). Des études réalisées sur le sang périphérique de sujets guéris ont démontré que les cellules T productrices d'IL-4 et d'IFN-γ sont principalement des clones CD4⁺ tandis que les cellules T CD8⁺ seraient faiblement impliquées dans ces productions cytokiniques (Kemp et al., 1999). Cette étude a permis de démontrer l'existence de trois types de cellules T CD4⁺ : des cellules Th1 productrices d'IFN-γ, des cellules Th2 productrices d'IL-4, et une population non conventionnelle produisant simultanément de l'IFN-γ et de l'IL-10 et susceptible de jouer un rôle régulateur important de la balance Th1/Th2 (Kemp et al., 1999) (Figure 12).

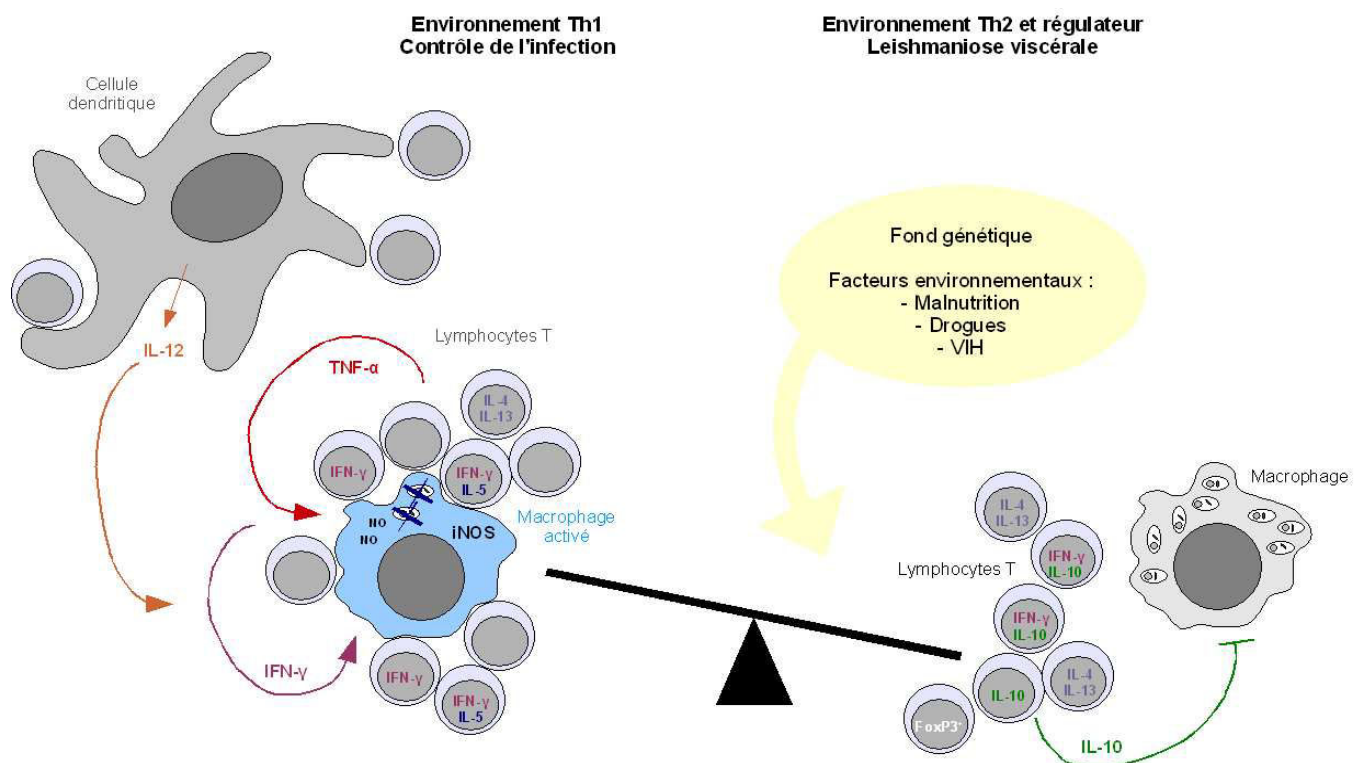


Figure 12 : Balance Th/Th2 et immunosuppression au cours de la leishmaniose viscérale. Le contrôle de l'infection par *Leishmania* repose sur la mise en place d'une réponse Th1 solide, induisant l'activation macrophagique et la leishmanicidie dépendante du monoxyde d'azote (NO), dans un environnement Th2 limitant l'immuno-pathologie. Dans un environnement immunosuppresseur, la présence d'IL-10 dans un environnement Th2 réprime les fonctions macrophagiques et la leishmanicidie conduisant à une leishmaniose viscérale active. D'après Nylén et Sacks, 2007.

4. Fonctions cytokiniques au cours de la leishmaniose viscérale

L'IFN- γ principalement produit par les lymphocytes T CD4⁺ possède de nombreuses propriétés immuno-modulatrices. Il joue notamment un rôle essentiel dans l'activation macrophagique et la leishmanicidie par les voies dépendantes du peroxyde d'hydrogène et de l'oxyde nitrique (NO) induites par le TNF- α (Murray et al., 1984; Hoover et al., 1985; Reiner et al., 1990). Outre cette induction de l'activation macrophagique, l'IFN- γ dispose d'autres propriétés immuno-modulatrices, telles que l'augmentation de l'expression du CMH de classe II à la surface des macrophages et l'augmentation de la présentation antigénique aux lymphocytes T, une action sur la différenciation des lymphocytes Th0 en Th1 et la prolifération des Th1, ainsi que la stimulation des cellules cytotoxiques NK et T CD8⁺ (Murray, 1990). Le défaut d'IFN- γ observé chez les patients est donc considéré comme l'un des éléments fondamentaux du développement des infections leishmaniennes (Zwingenberger et al., 1990; Caldas et al., 2005). Cependant, aux stades très précoces de la maladie, une grande quantité d'IFN- γ est sécrétée, comme observé chez des individus présentant une séro-conversion ou une infection sub-clinique en zone d'endémie (Bacellar et al., 1991). Bien que les causes de cette sécrétion initiale d'IFN- γ et de son déclin de production lors la phase active de la maladie ne soient pas clairs, l'IFN- γ alors principalement sécrété par les cellules NK pourrait jouer un rôle primordial dans les mécanismes d'activation macrophagique de l'immunité innée (Nylen et al., 2003). Divers essais d'administrations d'IFN- γ , de façon expérimentale chez la souris ou à des fins thérapeutiques chez les patients atteints de leishmaniose viscérale, démontrent le rôle majeur de cette cytokine dans l'établissement d'un environnement immun propice à la clairance parasitaire et l'optimisation de l'efficacité des chimiothérapies (Badaro et al., 1990; Murray, 1990; Harms et al., 1993; Squires et al., 1993; van Lunzen et al., 1993; Sundar et al., 1994; Sundar et Murray, 1995; Sundar et al., 1997b; Wadhone et al., 2009).

L'IL-12 joue un rôle pivot au cours de la réponse immune anti-leishmanienne. C'est un facteur de stimulation des cellules NK, un facteur de maturation des lymphocytes cytotoxiques et un immuno-régulateur majeur de l'initiation et du maintien de la réponse Th1. L'IL-12 joue également un rôle important dans l'induction de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T et les cellules NK (Chan et al., 1992; Trinchieri et al., 1992; Scott, 1993). Dans l'infection murine à *L. major*, l'IL-12 est un puissant inducteur de la réponse Th1 et de l'immunité protectrice (Heinzel et al., 1993). Suite à la stimulation par des lysats de leishmanies, l'IL-12 est produite par les cellules mononucléées circulantes de patients guéris de leur leishmaniose viscérale, mais pas par celles de patients en phase active de la maladie. Ce défaut d'IL-12 semble être l'une des caractéristiques de la progression de la leishmaniose viscérale, indiquant le rôle majeur de l'IL-12 au cours de la maladie (Bacellar et al., 2000). L'IL-12 joue en effet un rôle régulateur inverse de la fonction immunosuppressive de l'IL-

10. L'addition d'IL-12 recombinante ou d'un anticorps neutralisant l'IL-10 restaure la production d'IFN- γ , ainsi que la réponse lympho-proliférative des cellules mononucléées du sang périphérique provenant de patients en phase active de leishmaniose viscérale et stimulées par un lysat de leishmanies viscérotropes (Ghalib et al., 1995; Bacellar et al., 1996; Bacellar et al., 2000). Inversement, un anticorps neutralisant l'IL-12 ou une IL-10 recombinante inhibe la production de l'IFN- γ essentielle au contrôle efficace de l'infection (Ghalib et al., 1995).

La capacité suppressive de l'IL-10 sur l'activité microbicide des macrophages induite par l'IFN- γ est bien établie dans différentes maladies (de Waal Malefyt et al., 1991; Oswald et al., 1992). Dans des macrophages humains dérivés de monocytes d'individus sains, l'IL-10 recombinante inhibe la voie leishmanicide dépendante du monoxyde d'azote dirigée contre *L. infantum*, *L. major* et *L. braziliensis* (Vouldoukis et al., 1997). Des études brésiliennes montrent que des cultures de cellules mononucléées sanguines provenant de patients atteints de leishmaniose viscérale aiguë et stimulées par des antigènes de *L. infantum/chagasi* produisent significativement plus d'IL-10 que des cellules provenant de patients guéris, alors qu'il n'y a aucune libération d'IL-10 chez les personnes asymptomatiques (Holaday et al., 1993). In vivo, des patients développant une leishmaniose viscérale à *L. infantum/chagasi* présentent un nombre réduit de monocytes exprimant le TNF- α et une absence d'augmentation des taux de nitrites et de nitrates. Cette inhibition de la réponse macrophagique semble corrélée à la présence d'IL-10 dans leur plasma (Peruhype-Magalhaes et al., 2006). Chez des patients en phase active de leishmaniose viscérale au Soudan et en Inde, le niveau d'expression des ARNm d'IL-10 est élevé dans des échantillons de moelle osseuse, de ganglions lymphatiques et de rate, ainsi que dans les cellules mononucléées du sang périphérique, et diminue après une thérapie efficace (Ghalib et al., 1993; Karp et al., 1993). Une combinaison d'anticorps bloquants l'IL-4 et l'IL-10 restaure simultanément la réponse lympho-proliférative et la production d'IFN- γ dans les cultures de cellules mononucléées du sang périphérique de patients atteints de leishmaniose viscérale stimulées par des antigènes leishmaniens (Carvalho et al., 1994). L'IL-10 notamment sécrétée par les macrophages (de Waal Malefyt et al., 1991) inhibe donc la production d'IFN- γ , notamment par la répression de la synthèse de l'IL-12 par les macrophages, les lymphocytes B ou les cellules dendritiques (D'Andrea et al., 1993), aboutissant ainsi à un défaut d'activation macrophagique et de leishmanicidie. L'inhibition de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ producteurs d'IL-10 par l'IL-6 semble intervenir dans la protection contre les infections à *L. donovani* chez la souris (Stager et al., 2006). Ces observations indiquent clairement que la suppression de la réponse Th1 induite par l'IL-10 massivement produite est la principale cause de la susceptibilité à la maladie (Carvalho et al., 1994; Murphy et al., 2001). Dans une récente étude de patients atteints de leishmaniose viscérale et PKDL en Inde, le niveau circulant d'IL-10 a été corrélé avec les charges parasitaires qui diminuent après

traitement. Les auteurs proposent donc l'IL-10 comme un marqueur permettant d'évaluer simplement l'efficacité des traitements (Verma et al., 2010). En outre, le blocage de l'IL-10 et de son récepteur pourraient donc constituer d'intéressantes perspectives thérapeutiques (Murray et al., 2002).

L'IL-4 est considérée comme la signature cytokinique de la réponse immunitaire Th2. Elle est souvent rapportée sécrétée dans le sérum et le surnageant de culture de cellules mononucléées du sang périphérique (Zwingenberger et al., 1990; Sundar et al., 1997a) et l'expression de son ARNm est couramment observée au cours de la leishmaniose viscérale humaine (Ghalib et al., 1993; Carvalho et al., 1994). L'IL-4 a été décrite comme capable de réprimer l'activation macrophagique induite par l'IFN- γ en réponse à *L. donovani* in vitro (Lehn et al., 1989) ; elle pourrait donc contribuer à la progression de la maladie. Cependant, certaines études montrent que l'IL-4 n'est pas toujours produite chez les patients présentant une leishmaniose viscérale (Cillari et al., 1988; Carvalho et al., 1994; Kemp et al., 1994a). Certaines études suggèrent que son rôle serait mineur et que la répression de l'IFN- γ et de la réponse Th1 au cours de la maladie serait plus volontiers due à l'action de l'IL-10 qu'à la présence d'IL-4 (Carvalho et al., 1994; Bacellar et al., 2000; Lehmann et al., 2000). En outre, d'autres études démontrent un rôle protecteur de l'IL-4 dans le développement d'une réponse hépatique efficace (Stager et al., 2003), ainsi que dans l'efficacité des chimiothérapies (Alexander et al., 2000), suggérant un rôle ambivalent de cette cytokine dépendant notamment du micro-environnement tissulaire.

L'IL-13 est une autre cytokine classiquement associée à la réponse Th2 (Oliphant et al., 2011). Elle est impliquée dans la progression de la leishmaniose cutanée et est décrite comme un facteur de susceptibilité à l'infection (Mohrs et al., 1999; Matthews et al., 2000; Sosa et al., 2001; Alexander et al., 2002; Castilho et al., 2010). Elle est également produite au cours de la leishmaniose viscérale (Babaloo et al., 2001), bien que son rôle semble dans ce cas plutôt protecteur. En effet, des souris BALB/c déficientes en IL-4R α , récepteur commun à l'IL-4 et l'IL-13, présentent une moindre capacité à contrôler les charges parasitaires hépatiques et spléniques que les souris sauvages, et dans une moindre mesure les souris IL-4 $^{-/-}$. Ceci peut s'expliquer par des niveaux sériques d'IFN- γ plus faibles et par un défaut de maturation des granulomes hépatiques (Stager et al., 2003). Chez des souris BALB/c IL-13 $^{-/-}$, la sécrétion initiale d'IFN- γ et l'assemblage des granulomes hépatiques sont altérés, bien que cela n'affecte ni le contrôle de la réplication parasitaire précoce, ni la résolution de l'infection hépatique, ni la réponse aux chimiothérapies dans ce modèle (Murray et al., 2006b). Ce résultat suggère un rôle transitoire mineur de l'IL-13 dans la mise en place d'une réponse efficace. Enfin, dans une autre étude, des souris BALB/c IL-13 $^{-/-}$ présentent des charges parasitaires significativement accrues dans le foie, la rate et la moelle osseuse. Elles présentent également un niveau accru d'IL-4 et d'IL-10 et un défaut d'IFN- γ dans le sérum, associés à un retard significatif

de maturation des granulomes hépatiques (McFarlane et al., 2011). Ainsi, l'IL-13 pourrait jouer un rôle protecteur dans le foie, en favorisant l'assemblage des granulomes hépatiques au cours de la leishmaniose viscérale.

Le TGF- β est une cytokine participant à la susceptibilité vis-à-vis de la leishmaniose cutanée (Barral-Netto et Barral, 1994). Il est également produit au cours de la leishmaniose viscérale humaine (Gantt et al., 2003) et expérimentale chez la souris et le hamster (Rodrigues et al., 1998; Wilson et al., 1998; Melby et al., 2001), bien que son rôle biologique soit encore mal défini. L'activation du TGF- β par des facteurs parasitaires permet la création d'un micro-environnement immédiat favorisant localement la survie de *L. infantum/chagasi* (Gantt et al., 2003). Le blocage du TGF- β à l'aide d'un antagoniste de son récepteur induit chez la souris BALB/c une inhibition de la réplication de *L. donovani*, mais des effets limités sur l'activité leishmanicide des granulomes. L'injection de TGF- β exacerbe l'infection hépatique précoce, mais n'empêche pas la résolution de l'infection (Murray et al., 2005). Le rôle du TGF- β dans la réponse hépatique contre *Leishmania* semble donc transitoire. Toutefois, le TGF- β produit au niveau du foie semble influencer la physiopathologie de l'infection, notamment par l'induction d'une fibrose hépatique (Duarte et al., 2009).

5. Activation macrophagique et leishmanicidie

La mobilisation des lymphocytes T antigènes-spécifiques conduit à une élimination des parasites par les macrophages infectés par deux mécanismes complémentaires. Le premier mécanisme est l'induction de l'apoptose des macrophages infectés après engagement de CD95L, une molécule de la famille du TNF- α exprimée à la surface des lymphocytes Th1, et de son récepteur CD95 dont l'expression à la surface des macrophages infectés est augmentée par l'IFN- γ (Conceicao-Silva et al., 1998). Le deuxième mécanisme par lequel les lymphocytes T participent à l'élimination des leishmanies est l'activation des propriétés leishmanicides des macrophages. Cette activation repose principalement sur l'induction par l'IFN- γ de l'expression d'iNOS. Cette enzyme catalyse la synthèse du monoxyde d'azote à partir de L-arginine, aboutissant à la production d'intermédiaires réactifs de l'azote toxiques pour les amastigotes (Bogdan et al., 2000b, 2000c; Horta et al., 2012). La conversion de son substrat en L-ornithine par l'arginase limite l'action d'iNOS (Mills, 2012), et s'oppose en conséquence à la leishmanicidie. Ainsi, la protéine iNOS a pu être détectée en quantité importante dans les sites inflammatoires et dans les ganglions lymphatiques de souris infectées par *L. major* (Stenger et al., 1994), et les souris déficientes en iNOS succombent à l'infection (Wei et al., 1995). L'induction de la synthèse de iNOS par les macrophages dépend à la fois de la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T et les cellules NK, et de la sécrétion autocrine de TNF- α par les

macrophages. L'effet du TNF- α sur la synthèse de iNOS est toutefois relativement modeste puisque des souris n'exprimant pas le TNF- α ou son récepteur p55 sont capables de limiter la multiplication de *L. major* (Nashleanas et al., 1998). Outre le rôle majeur du monoxyde d'azote dans le contrôle précoce et tardif de l'infection, les radicaux réactifs de l'oxygène produits par la NADPH oxydase sont également impliqués dans la leishmanicidie, et sont en particulier nécessaires au contrôle de la charge parasitaire splénique (Blos et al., 2003; Antoine et al., 2004) (Figure 13).

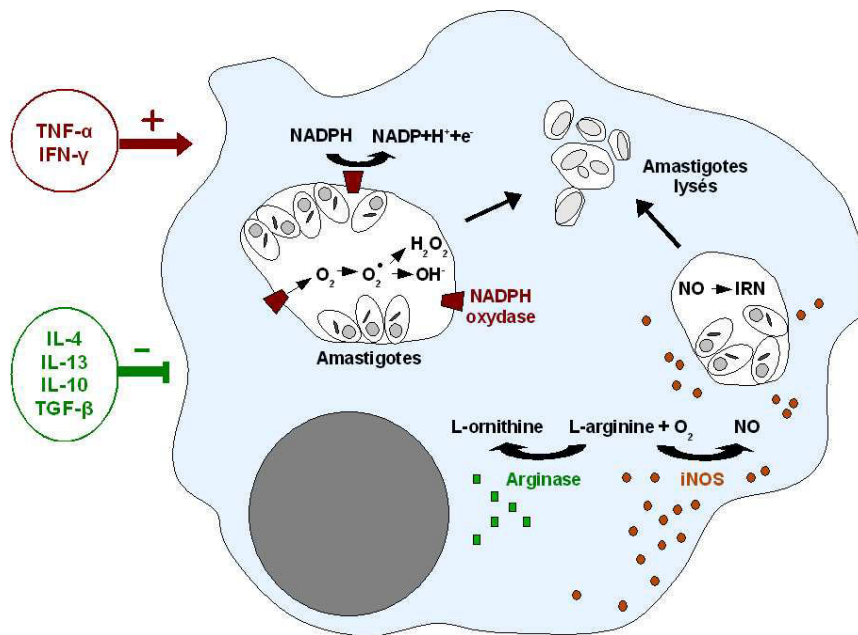


Figure 13 : Activation macrophagique et leishmanicidie. La lyse des amastigotes est liée à la production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène par la NADPH oxydase aboutissant à la production d'eau oxygénée (H_2O_2) toxique, ainsi qu'à la production de monoxyde d'azote (NO) par la NO synthase inducible (iNOS), aboutissant à la production d'intermédiaires réactifs de l'azote (IRN). Ces mécanismes sont activés ou inhibés par les principales cytokines produites par les lymphocytes, ainsi que par l'arginase qui partage le substrat de l'iNOS et inhibe ainsi son action. D'après Antoine et al., 2004.

III. Physiopathologie organe-dépendante et spécificités du foie

1. Immunité tissulaire différentielle au cours de la leishmaniose viscérale

L'infection expérimentale avec *L. donovani* est caractérisée par des réponses immunes différentes selon les organes. Le foie est le site d'une infection aiguë résolutive avec des dommages tissulaires minimes et une résistance à la ré-infection, tandis que la rate devient le site d'une persistance parasitaire (Smelt et al., 1997; Engwerda et Kaye, 2000). Une charge parasitaire élevée est ainsi observée précocement dans le foie, mais est finalement contrôlée, tandis que la charge

parasitaire splénique croît lentement mais persiste à des niveaux élevés, comme observé au cours de la leishmaniose expérimentale chez la souris (Engwerda et Kaye, 2000; Lang et al., 2009) (Figure 14).

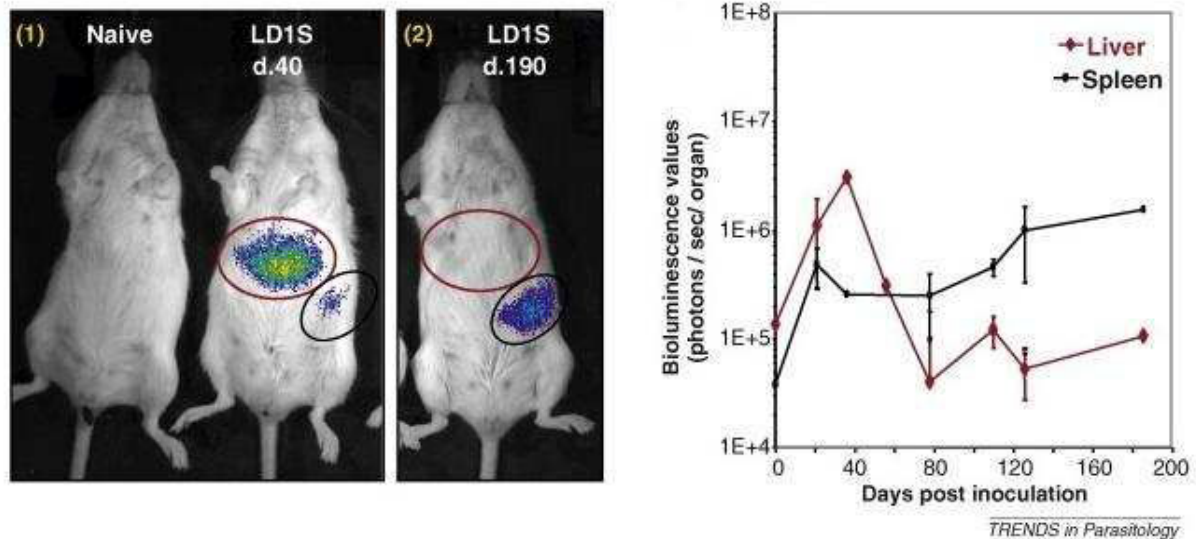


Figure 14 : Suivi de souris infectées avec *L. infantum* par imagerie bioluminescente. Suivi de souris BALB/c infectées par voie intrapéritonéale avec 4×10^8 promastigotes bioluminescents de *L. donovani* (LD1S-luci). La bioluminescence est contrôlée durant 6 mois dans le foie (en rouge) et la rate (en bleu). Alors qu'à 40 jours post-infection, la bioluminescence est détectée dans le foie et la rate (A1, B), après 190 jours, elle n'est plus détectable que dans la rate (A2, B). D'après Lang et al., 2009.

Le contrôle de l'infection hépatique chez la souris requiert une réponse de l'hôte coordonnée impliquant le développement d'infiltrats cellulaires, s'organisant en granulomes inflammatoires autour des macrophages infectés (Murray et al., 1992; Engwerda et al., 1998; Engwerda et Kaye, 2000; Stanley et Engwerda, 2007). Cette réponse granulomateuse correspond, chez l'Homme, à la réponse protectrice observée chez la majorité des individus infectés par *L. donovani* (Moreno et al., 1988; el Hag et al., 1994). Chez l'animal, la persistance parasitaire au niveau de la rate est accompagnée d'un échec de la formation granulomateuse, d'une splénomégalie, d'une perturbation de la micro-architecture tissulaire incluant une atteinte des follicules B et de la zone marginale, aboutissant à une activité hématopoïétique perturbée (Gutierrez et al., 1984; Smelt et al., 1997; Engwerda et al., 2002). De la même manière chez l'Homme, l'examen de nécropsies spléniques de patients atteints de leishmaniose viscérale montre une diminution des petits lymphocytes, une désintégration de la pulpe blanche et l'absence de centres germinatifs (Veress et al., 1977; Zijlstra et al., 1995).

2. Acteurs cellulaires de la réponse granulomateuse hépatique

Le foie est un organe riche en cellules immunitaires qui représentent près de 40 % des cellules non parenchymateuses. Les cellules de Kupffer, localisées le long des sinusoides hépatiques, sont les macrophages majoritaires du foie (Figure 15). Ce sont des cibles importantes des leishmanies viscérotropes (Crocker et al., 1984; Beattie et al., 2010a). D'autres types cellulaires sont représentés et localisés principalement au niveau des sinusoides, tels que les cellules dendritiques interstitielles, de nombreux types lymphocytaires (cellules B, cellules T $\alpha\beta$ CD4⁺ et CD8⁺, cellules T $\gamma\delta$, cellules NKT) et différentes classes de NK (Mehal et al., 2001) (Figure 15).

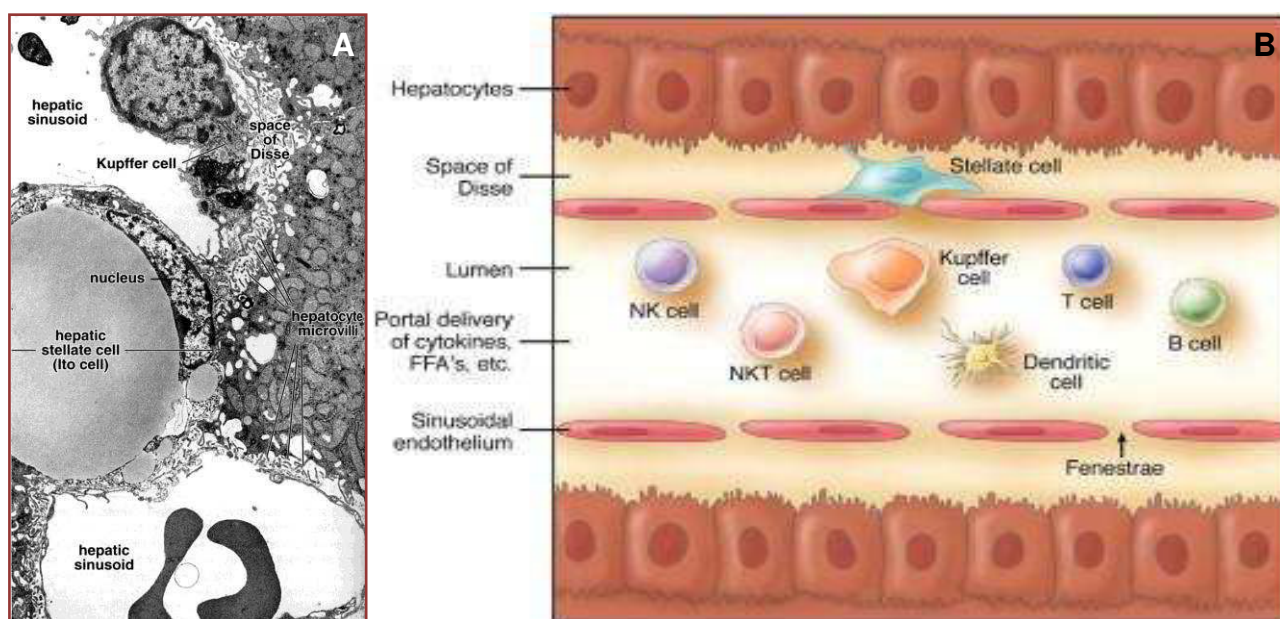


Figure 15 : Cellules immunitaires hépatiques. Les cellules immunes du foie incluant les cellules de Kupffer, les lymphocytes B et T, les cellules NK et NKT ainsi que les cellules dendritiques, sont localisées dans les sinusoides hépatiques caractérisés par un endothélium discontinu et hautement fenêtré, entouré par l'espace de Disse contenant les cellules étoilées du foie. Une photographie de sinusoides hépatiques en microscopie électronique, présentant notamment une cellule de Kupffer, est exposée en figure A, et une représentation schématique est proposée en figure B. D'après Shoelson et al., 2007 et Ross et Pawlina, 2006.

Au cours d'une réponse efficace de l'hôte, les cellules de Kupffer ainsi que les cellules dendritiques interstitielles phagocytent les leishmanies. Une fois infectées, les cellules de Kupffer fusionnent entre elles afin de former des cellules multinucléées autour desquelles s'organisent les granulomes (Murray, 2001). Les premières cellules recrutées sont les lymphocytes NKT interagissant avec les cellules de Kupffer, afin d'induire la production de CCL2, CCL3, CXCL2, CXCL5 et CXCL10 (Cotterell et al., 1999; Svensson et al., 2005; Beattie et al., 2010b; Robert-Gangneux et al., 2012). Ces chimiokines permettent alors le recrutement initial de monocytes et de

neutrophiles essentiels au contrôle efficace de la croissance parasitaire (Cervia et al., 1993; Smelt et al., 2000; McFarlane et al., 2008). Les cellules NKT, ainsi que les NK sont aussi importantes dans les stades précoces de la formation granulomateuse grâce à leur capacité à produire rapidement de grandes quantités de cytokines inflammatoires telles que l'IFN- γ (Amprey et al., 2004; Svensson et al., 2005; Robert-Gangneux et al., 2012). Enfin, les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ sont recrutées en réponse à diverses chimiokines et cytokines suite au recrutement de monocytes et neutrophiles, et assurent alors la promotion d'un environnement cytokinique et chimiokinique propice à la résolution de l'infection par *Leishmania* dans le foie (Cotterell et al., 1999; Mary et al., 1999). Les granulomes inflammatoires ainsi formés constituent une réponse immunitaire antigène-spécifique orchestrée par les cellules mononucléées, d'apparition retardée, persistante (Murray, 2001). Dans des conditions optimales, les granulomes inflammatoires constituent un micro-environnement permettant de limiter l'extension de l'infection, de concentrer les cellules effectrices (macrophages, lymphocytes T) et les médiateurs solubles (cytokines, facteurs de croissance), de détruire la cible microbienne puis de réparer les lésions tissulaires. Dans la leishmaniose viscérale humaine, la présence de granulomes hépatiques épithélioïdes giganto-cellulaires apparaît habituellement corrélée au contrôle de l'infection et à la latence clinique (Murray, 2000).

3. Fonctions cytokiniques au cours de la réponse granulomateuse hépatique

Outre sa richesse cellulaire, le système immunitaire hépatique présente un environnement cytokinique particulier. En effet, le TGF- β et l'IL-10 y sont sécrétées en grande quantité, créant un contexte favorable à une réponse immune de type Th2 plutôt tolérogène (Rialland et al., 2000; Goddard et al., 2004; Cabillic et al., 2006). La réponse immune efficace Th1 systémique requise pour le contrôle de l'infection par *Leishmania* se met donc en place dans un environnement hépatique Th2, expliquant la mixité de la réponse observée chez les patients guéris d'une leishmaniose viscérale (Kemp et al., 1993a).

Il existe un certain nombre de cytokines Th1 nécessaire à la formation granulomateuse efficace, incluant l'IL-12, l'IFN- γ , la lymphotoxine, le GM-CSF, l'IL-2 et le TNF- α (Murray et al., 1993; Tumang et al., 1994; Ghalib et al., 1995; Murray et al., 1995; Murray et al., 1997; Engwerda et al., 2004a; Engwerda et al., 2004b; Murray et al., 2006a). Ces cytokines sont nécessaires à la stimulation de production de chimiokines et à la production de molécules leishmanicides par les cellules de Kupffer infectées (Kaye et al., 2004). L'IL-12 et l'IFN- γ jouent un rôle pivot dans le foie au cours de la leishmaniose viscérale. En effet, le développement des granulomes hépatiques requiert la production d'IFN- γ dépendante de l'IL-12 par les cellules T, pour l'activation des monocytes/macrophages, des cellules de Kupffer et des cellules T (Taylor et Murray, 1997). De

façon intéressante, les cellules dendritiques différenciées en milieu conditionné hépatique sont caractérisées par un phénotype semi-mature tolérogène, associé à des propriétés d'immunostimulation réprimées. Cependant, leur infection par *L. donovani* restaure leurs propriétés de stimulation de la lymphoprolifération et la production d'IFN- γ dépendante de l'IL-12, et pourraient donc favoriser la résolution de l'infection (Donaghy et al., 2010). Si l'IFN- γ joue un rôle majeur, les mécanismes anti-parasitaires dépendants du TNF- α peuvent partiellement compenser l'absence d'IFN- γ chez les souris déficientes (Taylor et Murray, 1997). A la suite de l'activation des macrophages dépendante des cellules T, des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote sont produits et sont responsables de la mort parasitaire au sein des macrophages infectés (Murray et Nathan, 1999; Murray et al., 2006c).

Si la présence systémique de cytokines Th1 est essentielle au contrôle de l'infection, les cellules hépatiques infectées produisent principalement des cytokines de types Th2, de part le micro-environnement tissulaire particulier. L'IL-10 sécrétée joue notamment un rôle autocrine et réduit les capacités de capture et de présentation antigénique, ainsi que les possibilités d'activation des lymphocytes T CD4⁺ par les cellules dendritiques interstitielles. Néanmoins, elle pourrait favoriser la réaction granulomateuse hépatique par un mécanisme spécifique du foie (Iizasa et al., 2005). L'IL-4 est également requise pour la résolution de l'infection hépatique et pour la promotion des cellules T CD8⁺ qui sont importantes pour une protection à long terme (Stager et al., 2003). De nombreuses cytokines immuno-régulatrices telles que l'IL-10, le TGF- β et l'IL-27 sont produites dans le granulome en développement, afin de réguler l'immunité protectrice hépatique et de prévenir ainsi l'immunopathologie associée à une réponse immune exacerbée (Wilson et al., 1998; Murphy et al., 2001; Rosas et al., 2006).

4. Cinétique d'assemblage des granulomes au cours de la leishmaniose expérimentale

Une étude des modifications histopathologiques survenant au niveau du foie chez des souris BALB/c infectées par *L. donovani*, montre que le nombre de granulomes hépatiques s'accroît jusqu'à la huitième semaine, puis décroît (Gutierrez et al., 1984). L'infection des cellules de Kupffer initie le processus d'inflammation granulomateuse. Les NKT hépatiques migrent alors vers les cellules de Kupffer infectées et leurs interactions favorisent le recrutement des cellules mononucléées dans le foie. Jusqu'à la quatrième semaine après infection, des petits foyers inflammatoires regroupant quelques cellules macrophagiques associées à des NKT sans véritable organisation sont observés. Ces granulomes hépatiques immatures, aux limites mal définies, répartis sur l'ensemble du parenchyme, sont associés à un parasitisme élevé. Puis jusqu'à la huitième semaine, différents types cellulaires sont massivement recrutés : monocytes, lymphocytes T CD4⁺ et

CD8⁺, histiocytes. Ces cellules s'organisent autour des cellules de Kupffer infectées fusionnées afin de former des granulomes épithélioïdes giganto-cellulaires, présentant éventuellement des dépôts de collagène. A partir de la huitième semaine, 70 % des granulomes présentent cet aspect épithélioïde giganto-cellulaire et une diminution du nombre de parasites intracellulaires est alors observée. Une fois les leishmanies détruites, les granulomes dits stériles se désassemblent progressivement dans un processus d'involution. L'inflammation granulomateuse hépatique se résout en 8 semaines post-infection avec l'élimination de la majorité des parasites (Murray, 2001; Moore et al., 2013) (Figure 16). Toutefois, l'évolution de la réponse dépend du fond génétique de l'hôte, de la virulence de l'isolat parasitaire employé et de l'inoculum. Une grande variabilité interindividuelle chez la souris pourrait également expliquer des différences de cinétique selon les études (Honore et al., 1998; de La Llave et al., 2011).

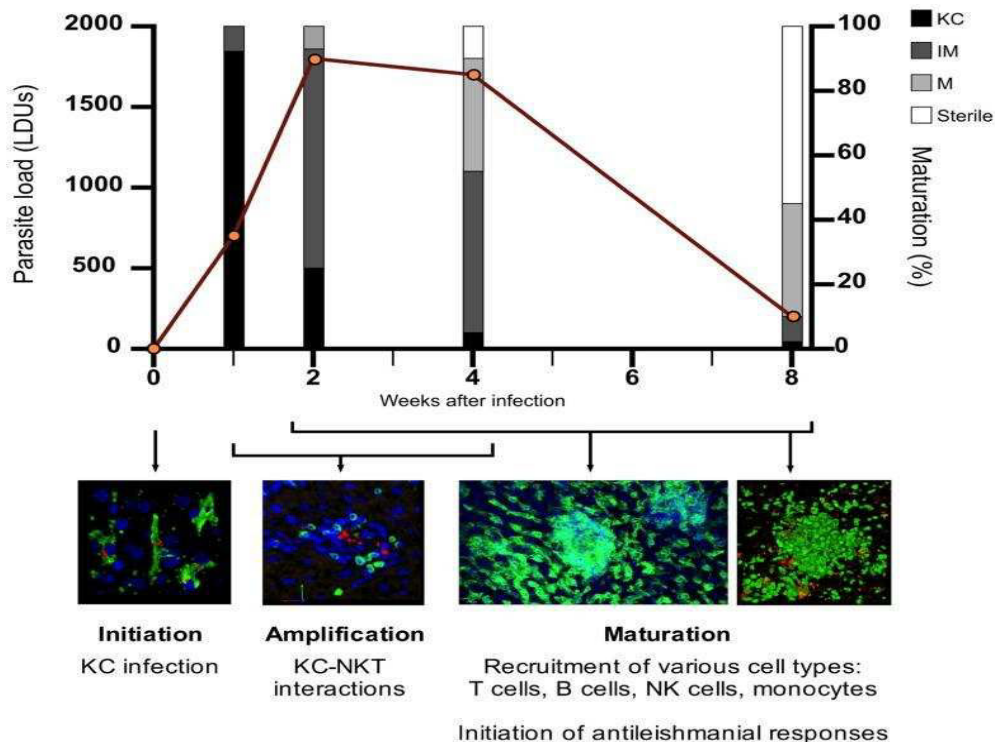


Figure 16 : Processus de maturation des granulomes en réponse à *L. donovani*, contrôle de la charge parasitaire et involution des granulomes. Légende : KC : Cellule de Kupffer ; IM : granulome immature ; M : granulome mature; Sterile : granulome stérile. D'après Moore et al., 2013.

Cette réponse granulomateuse est particulièrement efficace puisque 80 % des leishmanies sont éliminées du foie huit semaines après l'infection (Murray et al., 1987). Toutefois, la persistance au-delà d'un an de formes amastigotes intracellulaires à l'état quiescent est observée chez les souris BALB/c au sein de granulomes hépatiques, traduisant un processus d'évasion à la fonction

d'élimination des parasites par le granulome. En outre, un large spectre de réponses granulomateuses est observé en faisant varier les conditions expérimentales : du granulome de structure normale incapable d'activités leishmanicides, au granulome hypertrophié avec lyse parasitaire accrue, jusqu'à la présence d'une activité leishmanicide en l'absence de structure tissulaire spécifique (granulome invisible) (Murray, 2001) (Tableau 3).

Tableau 3 : Relation structure/fonction du granulome hépatique au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale. D'après Murray, 2001.

Structure du granulome	Fonction du granulome	Souris et conditions expérimentales
Normale	Normale	Résistance acquise souris BALB/c et C57BL/6
Aucune	Aucune	Souris athymiques déficientes en lymphocytes T ou dont les lymphocytes T CD4 ⁺ ou CD8 ⁺ sont supprimés Souris traitées par des anticorps monoclonaux anti-CR3 ou ICAM-1 KO avec absence d'infiltrat inflammatoire. Souris présentant une réponse Th1 déficiente (IL-12 ^{-/-} ou IFN- γ ^{-/-}). Souris avec réponse Th2 induite (administration d'IL-4 et d'IL-10). Souris BALB/c et C57BL/6 traitées par du TNF- α à forte dose.
Normale	Aucune	Souris iNOS ^{-/-} incapables de générer les dérivés du monoxyde d'azote. Souris transgénique IL-10 (réponse Th1 mais macrophages désactivés).
Hypertrophique	Majorée	Souris traitées par administration d'IL-2 ou GM-CSF. Souris BALB/c IL-10 ^{-/-} ou traitées par un anti-récepteur de l'IL-10.
Nocif	Inefficace	Souris TNF- α ^{-/-} .
Hypertrophique	Normale	Souris BALB/c traitées par IL-1 ou G-CSF.
Normale	Majorée	Souris BALB/c traitées par IL-12 ou IFN- γ .
Aucune	Normale ou majorée	Souris BALB/c immunes infectées par <i>L. donovani</i> durant la phase chronique de 8 à 12 semaines. Souris immunes traitées par la cyclosporine A (inhibant l'immunité cellulaire) avant et après ré-infection par <i>L. donovani</i> .

5. Fibrose hépatique

Au cours de la leishmaniose viscérale, l'atteinte hépatique n'est pas systématique et concerne entre 50 et 95 % des cas selon les études et les foyers endémiques (Gangneux et al., 2006). Lorsqu'elle est observée, elle se caractérise principalement par une hépatomégalie importante

souvent associée à une fibrose hépatique chez l'Homme (Duarte et Corbett, 1987; Corbett et al., 1993; el Hag et al., 1994). La fibrose hépatique est également décrite au cours de la leishmaniose canine (Rallis et al., 2005; Melo et al., 2009; Silva et al., 2013) et s'accompagne de lésions fibreuses dans d'autres organes tels que la rate, les reins et les poumons (Silva et al., 2013). La fibrose est également décrite au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale chez la souris BALB/c. Des dépôts de collagène III et de protéoglycanes sont dans ce cas observés dans les granulomes et les espaces portes de 4 à 20 semaines après infection par *L. donovani*, et des dépôts de laminine sont observés au niveau de la membrane basale des nouveaux vaisseaux sanguins autour des espaces portes de 8 à 20 semaines après infection (Leite et Croft, 1996).

Le développement de la fibrose est lié à l'activation et l'hypertrophie des cellules étoilées du foie dans l'espace de Disse. Chez des sujets sains, ces cellules sont dans un état quiescent et assurent principalement des fonctions de stockage et de métabolisme des rétinoïdes. Cependant, en réponse à des xénobiotiques ou à des agents pathogènes, elles s'activent et acquièrent un phénotype myofibroblastique proliférant, contractile, profibrosant et pro-inflammatoire (Friedman, 2008) (Figure 17).

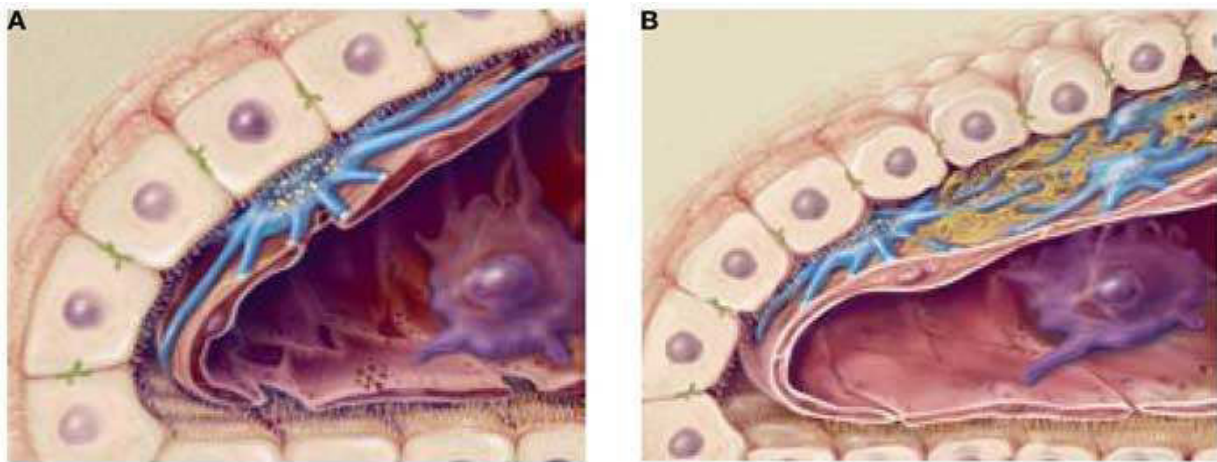


Figure 17 : Activation des cellules étoilées du foie et fibrose hépatique. Dans le foie sain, les cellules étoilées du foie (en bleu) stockant les rétinoïdes sont localisées dans l'espace sub-endothélial entre les hépatocytes et les cellules endothéliales sinusoidales, où elles émettent des prolongements encerclant les sinusoides. Les hépatocytes présentent des microvillosités indiquant leur état différencié et les cellules endothéliales sinusoidales contribuent au transport rapide de solutés à travers l'espace sub-endothélial (A). En cas de fibrose, les cellules étoilées sont activées et entourées de dépôts de matrice extracellulaire, les hépatocytes perdent leurs microvillosités et la porosité sinusoidale est réduite (B). D'après Friedman et al., 2004.

Quelle qu'en soit l'étiologie, l'activation des cellules étoilées du foie et l'induction de la fibrose sont classiquement associées à un environnement Th2 caractérisé par la production de cytokines telles que le TGF- β (Badaro et al., 1986; Czaja et al., 1989; Gressner, 1992; Bedossa et Paradis, 1995; Dooley et ten Dijke, 2012), l'IL-13 (Fichtner-Feigl et al., 2006) et plus récemment l'IL-33,

comme démontré par d'autres chercheurs de l'équipe (Marvie et al., 2010). Au cours de la leishmaniose viscérale humaine, l'activation des cellules de Kupffer induit la production d'un niveau élevé de TGF- β , qui serait responsable de l'hypertrophie des cellules étoilées fibroblastiques, de l'élargissement de l'espace de Disse et des dépôts de matrice extracellulaire en conséquence (Duarte et al., 2009). L'implication d'autres cytokines telles que l'IL-13 ou encore l'IL-33 dans le développement de la fibrose hépatique induite par l'infection leishmanienne n'est pas décrite.

IV. Mécanismes d'échappement des défenses de l'hôte et persistance parasitaire.

1. Échappement au complément

Une fois inoculés chez leur hôte, les promastigotes sont sujets à la lyse par le complément, mais disposent toutefois de mécanismes de résistance. Les promastigotes procycliques ne peuvent pas résister à l'action du complément alors que les formes métacycliques infestantes peuvent y échapper (Puentes et al., 1989). La glycoprotéine de surface gp63 abondamment exprimée au stade de promastigotes métacycliques, favorise la protéolyse de C3b et sa conversion en molécule inactive C3bi, favorisant ainsi l'opsonisation et l'internalisation du parasite (Russell, 1987; Puentes et al., 1988; Brittingham et al., 1999). Les promastigotes de *L. major* déficients gp63^{-/-} dérivés de cultures in vitro ou de phlébotomes présentent une sensibilité accrue à la lyse induite par le complément. A l'inverse, des mutants surexprimant gp63 sont significativement plus résistants à la lyse (Joshi et al., 2002). Chez certaines espèces de leishmanies, la résistance au complément serait liée à l'élongation du LPG qui survient lors de la métacyclogénèse. Il forme alors un glycocalix de 10 nm d'épaisseur dont l'encombrement stérique semble empêcher l'accès des complexes d'attaque C5b-9 à la membrane plasmique (Sacks, 1992). Ainsi, la perte du LPG induit une susceptibilité à la lyse par le complément chez l'Homme, en dépit de l'abondance de gp63 (Spath et al., 2003a). Enfin, les promastigotes, notamment de *L. donovani*, possèdent sur la face externe de leur membrane plasmique des protéines kinases capables d'inactiver C3 et C3b par phosphorylation (Hermoso et al., 1991) (Figure 18A).

2. Résistance à la lyse intracellulaire

Les leishmanies ont développé un mécanisme de lutte contre la fusion phago-lysosomale une fois phagocytées, notamment en inhibant la fusion des phagosomes avec les organelles endocytiques enrichies en hydrolases. Ce mécanisme dépend du LPG à la surface des promastigotes qui prévient la formation ou la perturbation de micro-domaines lipidiques dans la membrane du phagosome (Desjardins et Descoteaux, 1997; Dermine et al., 2000; Dermine et al., 2005; Arshad et al., 2011). En outre, des leishmanies observées dans le cytosol dans différentes études (Desjardins et Descoteaux, 1997; Rittig et al., 1999; Dermine et al., 2000; Rittig et Bogdan, 2000; Dermine et al., 2005; Arshad et al., 2011) suggèrent l'existence d'un autre mécanisme d'échappement à la lyse phago-lysosomales, probablement dépendant d'une cytolysine, la leishporine, décrite dans différentes espèces leishmaniennes (Almeida-Campos et Horta, 2000; Noronha et al., 2000).

Les promastigotes et amastigotes de différentes espèces sont également capables de résister partiellement aux espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Miller et al., 2000; Holzmuller et al., 2005; Holzmuller et al., 2006; Giudice et al., 2007; Mukbel et al., 2007). Ceci peut s'expliquer par l'action du LPG et de la gp63 sur la protéine kinase C et ses substrats (Turco, 1999), par la possible séquestration des espèces réactives de l'oxygène par les phosphoglycanes (Chan et al., 1989; Turco, 1999; Spath et al., 2003a; Spath et al., 2003b) et l'expression de la superoxyde dismutase, de la catalase et/ou des peroxyredoxines associées à la survie des leishmanies dans les macrophages (Barr et Gedamu, 2003; Ghosh et al., 2003; Plewes et al., 2003; Adak et Datta, 2005; Harder et al., 2006) (Figure 18B).

3. Répression de la présentation antigénique

La mise en place d'une réponse efficace acquise requiert la présentation d'antigènes leishmaniens aux lymphocytes. Les leishmanies de différentes espèces sont capables de réprimer cette étape de présentation antigénique au niveau des cellules dendritiques et de macrophages infectés (Meier et al., 2003; Chakraborty et al., 2005). Cette répression est liée à la séquestration intracellulaire des antigènes parasite apprêtés (Kima et al., 1996), l'internalisation et la dégradation des molécules du CMH de classe II (Courret et al., 2001) et l'augmentation de la fluidité membranaire et la perturbation consécutive des radeaux lipidiques des macrophages (Chakraborty et al., 2005). Dans les cellules dendritiques dérivées de monocytes humains, l'infection par *L. donovani* induit la répression de l'expression de CD1a, CD1b et CD1c et prévient l'activation restreinte au CD1 des lymphocytes T (Amprey et al., 2004), alors que l'infection par *L. amazonensis* altère surtout l'expression de CD80 et CD1a dans les co-cultures de cellules dendritiques et lymphocytes T

(Favali et al., 2007). La persistance des amastigotes leishmaniens dans les cellules semble donc partiellement facilitée par les effets inhibiteurs des fonctions de présentation antigénique induits par les leishmanies (Figure 18C)

4. Régulation de l'infiltrat cellulaire

Les promastigotes peuvent induire un effet chimiotactique sélectif sur les polynucléaires neutrophiles via un facteur chimiotactique leishmanien, le LCF. Les contacts des neutrophiles avec les promastigotes de *L. major* influencent la capacité des neutrophiles à sécréter des chimiokines. Ils sont en particulier capables d'induire la sécrétion d'IL-8 favorisant ainsi le recrutement et la survie des neutrophiles, et de réprimer la production de CXCL10, chimiokine notamment associée au recrutement et à l'activation protectrice des NK et à la résistance contre *Leishmania* (van Zandbergen et al., 2002) (Figure 18D).

5. Modulation de la réponse cytokinique

L'IL-10 est une cytokine clé au cours des leishmanioses cutanées et viscérales jouant un rôle critique pour la survie et la persistance à long terme des leishmanies. Les leishmanies sont capables d'activer les macrophages pour la production d'IL-10, en particulier s'ils sont opsonisés à l'aide d'anticorps ou du complément (Carrera et al., 1996; Mosser et Brittingham, 1997; Guizani-Tabbane et al., 2004; Miles et al., 2005; Padigel et Farrell, 2005; Thomas et Buxbaum, 2008). En outre, le monoxyde d'azote permettant la leishmanicidie constitue un signal de différenciation pour les lymphocytes T régulateurs (Niedbala et al., 2007). Ainsi, l'hypothèse a été émise que l'expression de l'iNOS au cours de la leishmaniose pourrait contribuer à la coexistence hôte-pathogène, en contenant l'infection parasitaire, tout en prévenant son éradication complète, en induisant la différenciation des lymphocytes T régulateurs producteurs d'IL-10 et capables de désactiver les propriétés macrophagiques (Bogdan et al., 2000b). Enfin, la fonction immunosuppressive de l'IL-10 est contrebalancée par l'IL-12. Or, les macrophages infectés par les leishmanies ne produisent que peu ou pas d'IL-12, contribuant ainsi également à la persistance parasitaire (Belkaid et al., 1998). La susceptibilité à la maladie est liée à l'immunosuppression induite par l'IL-10, mais également à une polarisation Th2 de la réponse immune. Un antigène leishmanien, LACK pour "Leishmania homolog of receptors for activated C kinase" induit l'activation précoce des lymphocytes T CD4⁺ et joue un rôle pivot dans l'orientation Th2 délétère de la réponse, caractérisée par la production d'IL-4 et d'IL-5. Ceci induit notamment la production d'anticorps inefficaces au détriment d'une réponse cellulaire Th1 protectrice (Julia et al., 1996) (Figure 18D).

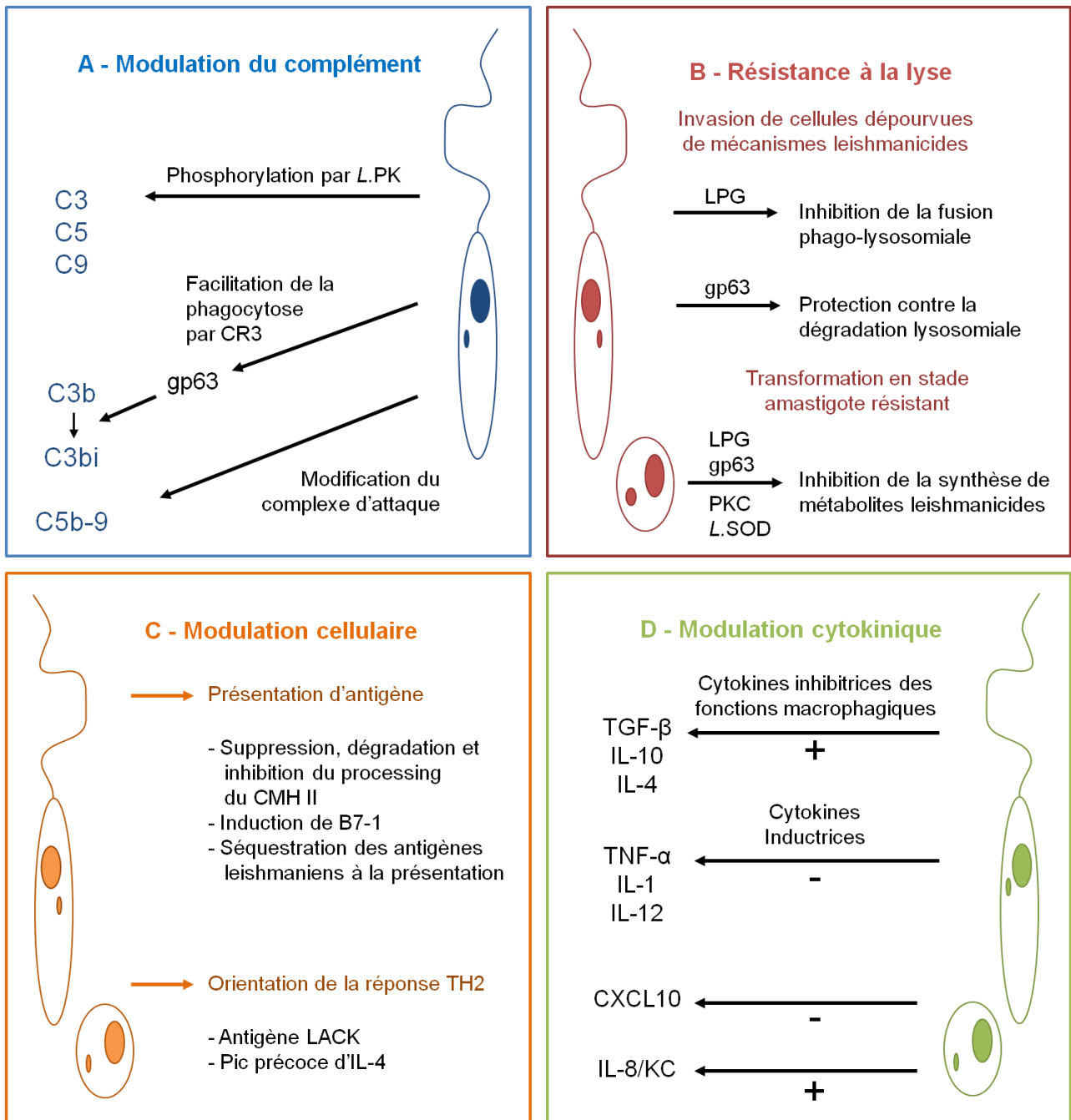


Figure 18 : Mécanismes d'échappement des leishmanies aux défenses de leur hôte. Modulation de la voie du complément notamment via les kinases leishmaniennes (L. PK) (A). Mécanisme de résistance à la lyse cellulaire dépendante de la synthèse de métabolites leishmanicides notamment via la Protéine Kinase C (PKC) et l'expression de la Sodium Oxyde Dismutase (SOD) (B). Modulation cellulaire (C). Modulation cytokinique (D).

6. Cellules sanctuaires

Si les cellules cibles préférentielles des leishmanies sont les cellules présentatrices d'antigènes, d'autres types cellulaires myéloïdes ou fibroblastiques, dépourvus de mécanismes leishmanicides effecteurs, ont été décrits permissifs aux leishmanies. Au sein de ces cellules dites sanctuaires, les leishmanies sont incapables de se multiplier et se maintiennent à l'abri des défenses de l'hôte, ce qui contribue à la persistance parasitaire même à l'issue de traitements efficaces (Bogdan et Rollinghoff, 1998; Gangneux et al., 2005). Au cours de la leishmaniose cutanée, les précurseurs myéloïdes immatures et les monocytes (Mirkovich et al., 1986), ainsi que les fibroblastes de la peau et des ganglions lymphatiques (Bogdan et al., 2000a) ont été décrits comme des cellules sanctuaires pour *L. major*. In vivo, la persistance de *L. major* après une leishmaniose cutanée résolue a été démontrée comme étroitement liée à l'infection des fibroblastes (Bogdan et al., 2000a). Au cours de la leishmaniose viscérale, les macrophages stromiques sialoadhesin⁺ de la moelle osseuse ont été décrits permissifs à *L. donovani* et *L. infantum* (Leclercq et al., 1996; Cotterell et al., 2000). Dans le foie, les hépatocytes ont été montrés permissifs in vitro et in vivo aux leishmanies (Angarano et al., 1998; Tafuri et al., 2001; Gangneux et al., 2005). En modèle expérimental de primo-culture d'hépatocytes humains, ils présentent un pourcentage d'infection à *L. donovani* n'excédant pas 2 %, une faible toxicité cellulaire et une absence de multiplication parasitaire. Ils pourraient donc correspondre à un type de cellules sanctuaires au sein duquel les parasites peuvent rester quiescents à l'abri de la réponse de l'hôte (Gangneux et al., 2005). D'autres types de cellules sanctuaires ne sont pas exclus.

I. Historique des découvertes

L'IL-33 est une cytokine appartenant à la famille de l'IL-1, décrite pour la première fois en tant que telle en 2005, bien qu'elle fût préalablement décrite en tant que facteur nucléaire en 1999 chez le chien et en 2003 chez l'Homme et la souris.

En 1999 au Japon, l'équipe de Jun Takeda s'est intéressée aux processus moléculaires des vasospasmes continus des artères cérébrales après hémorragie sous-arachnoïdienne, en étudiant les gènes exprimés de façon différentielle au niveau des artères vasospastiques dans deux modèles canins d'hémorragie cérébrale. Parmi les gènes inconnus les plus surexprimés, les auteurs se sont particulièrement intéressés à DVS-27 et ont démontré sa localisation nucléaire par immunofluorescence au niveau de cellules transfectées avec un vecteur permettant l'expression de DVS-27. Par ailleurs, des études *in vitro* ont montré que DVS-27 est fortement induit par l'IL-1 α , l'IL- β ainsi que plus modérément par l'IFN- γ au niveau de cellules musculaires lisses d'artère ombilicale humaine, suggérant que cette nouvelle protéine est associée à l'inflammation (Onda et al., 1999).

En 2003, des travaux menés à Toulouse par l'équipe de Jean-Philippe Girard ont permis de caractériser une nouvelle protéine humaine, Nuclear Factor of High Endothelial Vénule (NF-HEV), préférentiellement exprimée par les cellules endothéliales cuboïdales, comparées à des cellules micro-vasculaires de polypes nasaux et à des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (Baekkevold et al., 2003). Des alignements de séquences d'acides aminés ont permis d'établir l'identité de NF-HEV avec le facteur DVS-27 préalablement décrit chez le chien, ainsi que la conservation de la protéine chez la souris. La localisation nucléaire ainsi que la structure de NF-HEV comprenant un domaine hélice-tour-hélice de liaison à l'ADN témoigne de sa liaison à l'hétérochromatine et suggère un rôle régulateur de l'expression génique, conforté par des études ultérieures de la même équipe (Carriere et al., 2007).

En parallèle à ces travaux toulousains, l'équipe de Robert Kastelein à San Francisco s'intéressait au récepteur ST2, également appelé T1 ou IL-1RL1 («interleukin 1 receptor-like 1»). Il s'agit d'un membre de la famille des récepteurs de l'IL-1 appartenant à la superfamille des « Toll-like/IL-1 receptors », demeuré longtemps orphelin depuis sa découverte en 1989 (Klemenz et al., 1989; Tominaga, 1989) et caractérisé en 1998 comme un marqueur sélectif de cellules Th2 (Xu et al., 1998). Une analyse des banques de séquences *in silico* sur la base structurale des protéines de la famille de l'IL-1 a permis d'identifier en 2005 un nouveau membre à cette famille, l'IL-33 (ou IL-1F11), assimilé à DVS-27 et NF-HEV (Schmitz et al., 2005; Carriere et al., 2007). Des expériences

in vitro et in vivo ont permis aux auteurs de démontrer que l'IL-33 est le ligand spécifique du récepteur ST2, dont la liaison induit une réponse immunitaire de type Th2 (Schmitz et al., 2005).

En 2007, il a été démontré que c'est l'hétérodimère constitué par ST2 et le récepteur accessoire de l'IL-1 (IL-1RAcP) qui permet la signalisation de l'IL-33 (Chackerian et al., 2007), caractérisée notamment par l'activation des voies des MAP kinases et de NF- κ B (Schmitz et al., 2005).

II. IL-33 : Structure, sources, fonctions nucléaires, sécrétion

L'IL-33 est une cytokine de la famille de l'IL-1, qui comprend notamment l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-18. Elle partage donc de nombreuses caractéristiques structurales avec ces cytokines.

1. Structure

Le gène codant l'IL-33 est localisé sur le bras court du chromosome 9 chez l'Homme, sur le chromosome 11 chez le chien et sur le chromosome 19 chez la souris. Il est constitué de 7 exons répartis sur 16 kb d'ADN génomique chez l'Homme, avec une organisation conservée chez ses orthologues canin et murin. Il existe deux transcrits différents pour ce gène, il33a et il33b, contenant des régions non traduites différentes en 5', mais codant pour la même protéine. Les analyses de séquences indiquent que la traduction de ces ARNm se fait à partir de deux exons non codants différents, distants d'environ 20 kb, joints au premier exon codant par un mécanisme d'épissage alternatif. Ceci permet une régulation différentielle de la traduction de l'IL-33 en fonction du type cellulaire et du stimulus inflammatoire (Talabot-Ayer et al., 2012).

Les deux transcrits codent pour une protéine de 30 kDa constituée de 270 acides aminés chez l'Homme. Ses orthologues canin et murin codent pour des protéines de 30 kDa pour 263 acides aminés et 29,9 kDa pour 266 acides aminés, avec des pourcentages d'identité de 59 et 48 %, respectivement. L'alignement des séquences en acides aminés révèle en effet la présence de deux régions conservées entre les espèces, séparées par une région centrale divergente (Baekkevold et al., 2003). La région N-terminale comprend au niveau de sa structure tertiaire un domaine hélice-tour-hélice nécessaire et suffisant pour la liaison de l'IL-33 à la chromatine (Carriere et al., 2007). La région C-terminale de l'IL-33 comprend quant à elle douze feuillets β regroupés sous la forme d'une structure formée de trois unités beta-beta-beta-boucle-beta et appelée « β -trefoil », correspondant à la signature des cytokines la famille de l'IL-1, permettant la liaison aux récepteurs de la famille de l'IL-1R (Dinarello et Savage, 1989; Priestle et al., 1989; Schmitz et al., 2005).

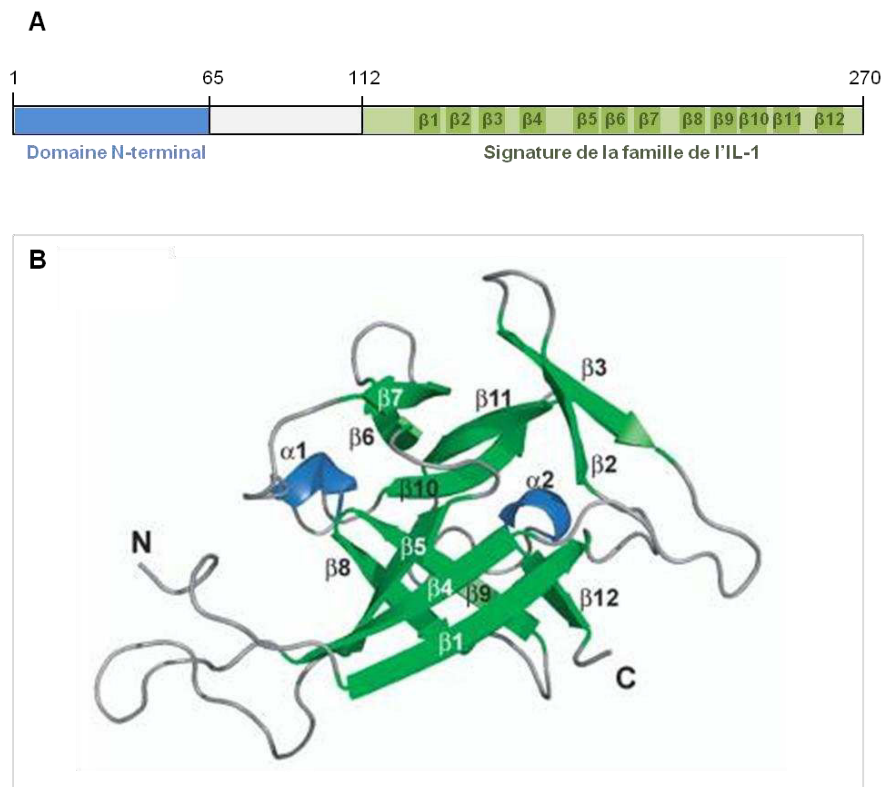


Figure 19 : Représentation schématique de la structure de l'IL-33. Structure primaire (A). Structure secondaire (B). Le domaine N-terminal contenant deux domaines hélice-tour-hélice est présenté en bleu, et le domaine C-terminal contenant les 12 feuillets β caractéristiques de la famille de l'IL-1 sont présentés en vert. D'après Girard, et Lingel et al., 2009.

La séquence en acides aminés de l'IL-33 comprend un site de clivage par les caspases 1 et 3 au niveau de l'acide aspartique 178, entre les quatrième et cinquième brins β . L'IL-33 ainsi clivée est incapable d'activer le récepteur ST2 (Cayrol et Girard, 2009). En contrepartie, l'IL-33 contient également des sites de clivage par des sérines protéases des polynucléaires neutrophiles, la cathepsine G et l'élastase, produisant des formes d'IL-33 clivées biologiquement actives chez l'Homme et la souris, *in vitro* et *in vivo*. Les produits de ce clivage présentent *in vivo* une efficacité dix fois supérieure à la forme complète de l'IL-33. Ainsi, un micro-environnement inflammatoire pourrait exacerber les fonctions de l'IL-33 par la production de ces formes clivées d'efficacité accrue (Lefrançais et al., 2012).

2. Sources cellulaires

L'IL-33 a été décrite historiquement au niveau des cellules endothéliales (Onda et al., 1999; Baekkevold et al., 2003). Chez le chien, l'hémorragie cérébrale induit la production d'IL-33 (DVS-27) par les cellules endothéliales activées des artères vasospastiques (Onda et al., 1999). Chez

l'Homme et la souris, les cellules cuboïdales caractéristiques de vaisseaux post-capillaires particulièrement différenciés, appelés « high endothelial venule », sont caractérisées par l'expression constitutive d'IL-33, facteur nucléaire susceptible de réguler leur phénotype spécialisé (Baekkevold et al., 2003). Elles favorisent l'infiltrat immunitaire au niveau des tissus lymphoïdes secondaires, mais aussi au niveau des tissus non-lymphoïdes dans le cas d'inflammations chroniques comme celles induite par la maladie de Crohn ou la polyarthrite rhumatoïde (Girard et Springer, 1995; Girard et al., 2012). Ces cellules cuboïdales sont également observées au niveau de certains mélanomes et cancers du sein où elles facilitent l'influx lymphocytaire témoin d'un pronostic encourageant (Martinet et al., 2011; Martinet et al., 2012a; Martinet et al., 2012b). L'IL-33 est également décrite dans des cellules endothéliales non cuboïdales dans un grand nombre de tissus incluant le foie (Moussion et al., 2008) (Figure 20A).

Suite à sa description dans les cellules endothéliales, l'expression d'IL-33 a été décrite dans de nombreux types cellulaires dans certains contextes d'activation (Mirchandani et al., 2012). L'IL-33 a notamment été décrite en 2008 comme une alarmine, exprimée de façon constitutive ou inductible dans les cellules endothéliales, ainsi que dans divers types cellulaires exposés à l'environnement extérieur, permettant ainsi sa rapide sécrétion en cas d'agression. Cette étude a notamment permis de démontrer l'expression constitutive d'IL-33 chez l'Homme, au niveau des cryptes amygdaliennes et des glandes salivaires, des cellules épithéliales intestinales et des kératinocytes cutanés (Moussion et al., 2008). L'IL-33 est particulièrement exprimée au niveau des kératinocytes des patients atteints de psoriasis et dans une lignée de kératinocytes immortalisés HaCaT traitées par du TNF- α , où elle renforcerait la production d'IL-6, MCP-1 et VEGF induite par le TNF- α , contribuant ainsi à la biologie du psoriasis (Balato et al., 2012). Au niveau de l'intestin, la colite ulcéreuse induit une induction spécifique d'IL-33 corrélée à la sévérité de la maladie dans les cellules épithéliales (Pastorelli et al., 2010).

L'IL-33 est également classiquement décrite au niveau des fibroblastes de différents tissus. L'IL-33 est en effet constitutivement exprimée par les cellules réticulaires fibroblastiques des tissus lymphoïdes (Moussion et al., 2008) et dans les fibroblastes embryonnaires de souris (Talabot-Ayer et al., 2012). Son expression est aussi induite au cours de processus pathologiques, dans les fibroblastes et myofibroblastes. Il a été démontré qu'un traitement hépatotoxique de douze semaines au tétrachlorure de carbone chez la souris est capable d'induire la surexpression et la sécrétion de l'IL-33 par les cellules étoilées hépatiques myofibroblastiques, favorisant une réponse immunitaire de type Th2 propice au développement d'une fibrose hépatique. Un résultat similaire a également été observé sur des patients humains ayant développé une fibrose, le niveau d'IL-33 étant dans ce cas corrélé à la sévérité de la fibrose (Marvie et al., 2010) (Figure 20B). L'IL-33 est aussi exprimée au niveau des myofibroblastes des intestins et du colon et pourrait jouer un rôle important dans la

physio-pathologie des inflammations du bol intestinal et colites ulcéraives et dans la guérison des lésions muqueuses (Kobori et al., 2010; Sponheim et al., 2010). Dans la peau, l'IL-33 est surexprimée dans les myofibroblastes suite à une exposition à l'ovalbumine, à l'entérotoxine B staphylococcique ou à un traitement par le TNF- α et l'IFN- β , cytokines induites par un traitement par de l'ARN double brin mimant une infection virale. Cette expression d'IL-33 est réprimée par les traitements topiques classiquement employés contre les dermatites atopiques, suggérant un rôle majeur de l'IL-33 dans ces maladies (Savinko et al., 2012). Au cours des poussées de polyarthrite rhumatoïde, l'IL-33 est induite dans les fibroblastes synoviaux, et contribue à l'inflammation exacerbée caractéristique de la maladie (Campo et al., 2012). Enfin, l'IL-33 est exprimée dans les myofibroblastes cardiaques en réponse aux stress mécaniques. Elle assure à ce niveau un rôle cardio-protecteur, en réprimant l'activation de NF- κ B induite par l'angiotensine-II et la phényléphrine, limitant ainsi l'hypertrophie fibroblastique et la fibrose (Sanada et al., 2007).

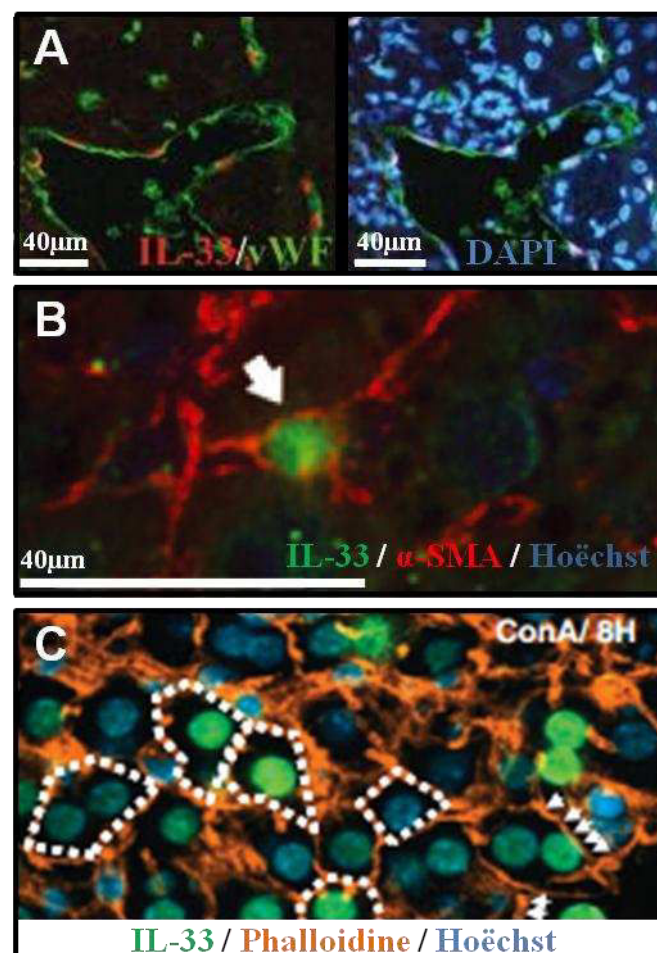


Figure 20 : Expression d'IL-33 dans le foie chez la souris. Expression constitutive dans les cellules endothéliales hépatiques (A). Expression d'IL-33 induite par un traitement de 12 semaines au CCl₄ (B). Expression d'IL-33 induite par un traitement de 8 heures à la Concanavaline A (ConA) dans les hépatocytes (C). D'après Moussion et al., 2008 ; Marvie et al., 2010 et Arshad et al., 2011.

Les cellules musculaires lisses sont également une source possible d'IL-33. Ceci a été observé au niveau des poumons, de façon constitutive (Schmitz et al., 2005) ou de façon exacerbée en présence d'asthme sévère, l'IL-33 étant décrite à ce niveau comme potentialisant l'asthme allergique (Kurowska-Stolarska et al., 2008; Prefontaine et al., 2009). Les cellules musculaires lisses artérielles expriment constitutivement l'IL-33 (Schmitz et al., 2005) et les cardiomyocytes enfin induisent l'expression et la sécrétion d'IL-33 en réponse aux stress inflammatoires et mécaniques (Kakkar et al., 2012).

L'IL-33 est donc largement exprimée dans les cellules endothéliales, épithéliales, musculaires lisses et fibroblastiques de nombreux tissus, mais elle est également exprimée dans les tissus spécialisés. Au niveau du foie, outre les cellules étoilées (Marvie et al., 2010), les hépatocytes engagés dans une voie de mort cellulaire peuvent exprimer l'IL-33 (Figure 20C), comme cela a été démontré sur des modèles d'hépatite aiguë chez la souris (Arshad et al., 2011; Arshad et al., 2012a) où elle contribue à la sévérité de la pathologie (Chen et al., 2012a). L'IL-33 est aussi exprimée au sein d'autres tissus spécialisés, au niveau de types cellulaires très différents, tels que les adipocytes (Wood et al., 2009), les ostéoblastes (Saidi et al., 2011; Saleh et al., 2011) ou les cellules gliales du système nerveux central (Hudson et al., 2008).

Au niveau du système immunitaire, des motifs moléculaires associés aux pathogènes ou PAMP (Lipopolysaccharide bactérien, ARN double brin ou Poly(I:C) viraux...) ou des cytokines proinflammatoires induisent l'expression d'IL-33 dans les cellules immunitaires, en particulier au niveau des cellules de l'immunité innée (Mirchandani et al., 2012; Talabot-Ayer et al., 2012). Exprimée au niveau des mastocytes activés par les IgE via le FcεRI *in vitro* et *in vivo*, l'IL-33 contribue à la phase tardive de l'inflammation dans un modèle d'anaphylaxie dépendant des mastocytes (Hsu et al., 2010). L'IL-33 est également exprimée par les cellules dendritiques (Schmitz et al., 2005; Yanagawa et al., 2011; Talabot-Ayer et al., 2012) et les macrophages (Schmitz et al., 2005; Ohno et al., 2009; Chang et al., 2011; Rani et al., 2011; Talabot-Ayer et al., 2012) *in vitro* et *in vivo*. Au cours de la colite ulcéreuse (rectocolite hémorragique), l'IL-33 corrélée à la sévérité de la maladie est exprimée par les cellules épithéliales intestinales, mais également par les cellules infiltrantes CD11b⁺ et CD19⁺ correspondant respectivement aux macrophages et lymphocytes B (Pastorelli et al., 2011; Rani et al., 2011).

L'IL-33 est donc exprimée au niveau de cellules et tissus exposés à l'environnement extérieur ainsi qu'au niveau des cellules immunitaires à l'interface entre immunité innée et adaptative, afin de réprimer l'inflammation en l'absence de danger et de déclencher rapidement une réponse inflammatoire adaptée en réponse aux agressions.

3. Fonctions nucléaires

D'après la littérature, les techniques d'immuno-histochimie, d'immuno-cytochimie ou d'immuno-fluorescence permettent classiquement l'observation d'un marquage nucléaire spécifique de l'IL-33 (Carriere et al., 2007; Moussion et al., 2008; Marvie et al., 2010; Arshad et al., 2011; Sedhom et al., 2012; Dong et al., 2013). Ceci indique une expression préférentielle de l'IL-33 par défaut dans le noyau des cellules qui l'expriment. A ce niveau, il a été démontré que l'IL-33 se lie à l'hétérochromatine ainsi qu'aux chromosomes mitotiques, via son domaine N-terminal hélice-tour-hélice (Carriere et al., 2007). Des homologies de sa séquence de liaison à la chromatine avec l'antigène nucléaire associé à la latence du Kaposi herpes virus (LANA) suggèrent que l'IL-33 interagit avec la chromatine au niveau des dimères H2A-H2B à la surface du nucléosome (Roussel et al., 2008).

Dans la mesure où l'hétérochromatine est associée à la répression de la transcription, une étude employant des protéines de fusion, constituées de l'IL-33 complète et du domaine Gal-4 de liaison à l'ADN, ont logiquement permis de démontrer la répression de la transcription d'un gène rapporteur répondant à Gal4 et codant la luciférase. Différentes constructions ont permis d'associer cette fonction à l'homéodomaine hélice tout-hélice de la région N-terminale de l'IL-33 (Carriere et al., 2007). Outre ces données sur la localisation et l'activité de répression transcriptionnelle de l'IL-33 nucléaire, peu d'informations sont disponibles sur ses gènes cibles et le rôle de cette répression génique sur les fonctions cellulaires. Néanmoins, une étude a démontré que l'IL-33 nucléaire est un facteur de transcription capable d'activer la transcription de la sous-unité p65 de NF- κ B dans les cellules endothéliales de façon basale, mais plus fortement après traitement avec du TNF- α . Ceci aboutit in fine à l'induction dépendante de NF- κ B des molécules d'adhérence intercellulaires et vasculaires ICAM-1 et VCAM-1 témoignant de l'activation des cellules endothéliales (Choi et al., 2012).

Peu de données concernent les éventuelles autres interactions et fonctions de l'IL-33 nucléaire, indépendamment de sa fonction de répression transcriptionnelle. Une étude récente démontre cependant que l'IL-33 est capable de se lier directement à NF- κ B, de façon constitutive, au niveau de la sous-unité p50 et de façon inductible au niveau de la sous-unité p65 en réponse à l'IL-1 β . Ceci aboutit à la séquestration de NF- κ B, et à la réduction de sa capacité de liaison l'ADN et de transactivation (Ali et al., 2011). Bien que ce mécanisme soit indépendant de la fonction de facteur de transcription précédemment décrite de l'IL-33, cette étude témoigne une nouvelle fois de la capacité de l'IL-33 à réprimer l'expression génique.

4. Processus de sécrétion

Si l'expression d'IL-33 est désormais admise au niveau de nombreux types cellulaires (Mirchandani et al., 2012), ses mécanismes de sécrétion font encore l'objet de controverses.

La localisation nucléaire de l'IL-33, son absence de signal d'export nucléaire et sa fonction d'alarmine ont conduit certains auteurs à proposer un mécanisme de sécrétion passif de l'IL-33 lorsque les cellules s'engagent dans une voie de mort cellulaire. Ainsi, dans un contexte nécrotique, l'IL-33 non clivée serait active et induirait une réponse pro-inflammatoire rapide. A l'inverse, contrairement à l'IL-1 et l'IL-18, lorsque l'IL-33 est sécrétée par des cellules apoptotiques, son clivage par les caspases aboutirait à son inactivation et empêcherait ainsi une réponse inflammatoire inopportune au cours d'un phénomène de mort programmée (Cayrol et Girard, 2009; Lamkanfi et Dixit, 2009; Luthi et al., 2009; Talabot-Ayer et al., 2009) (Figure 21).

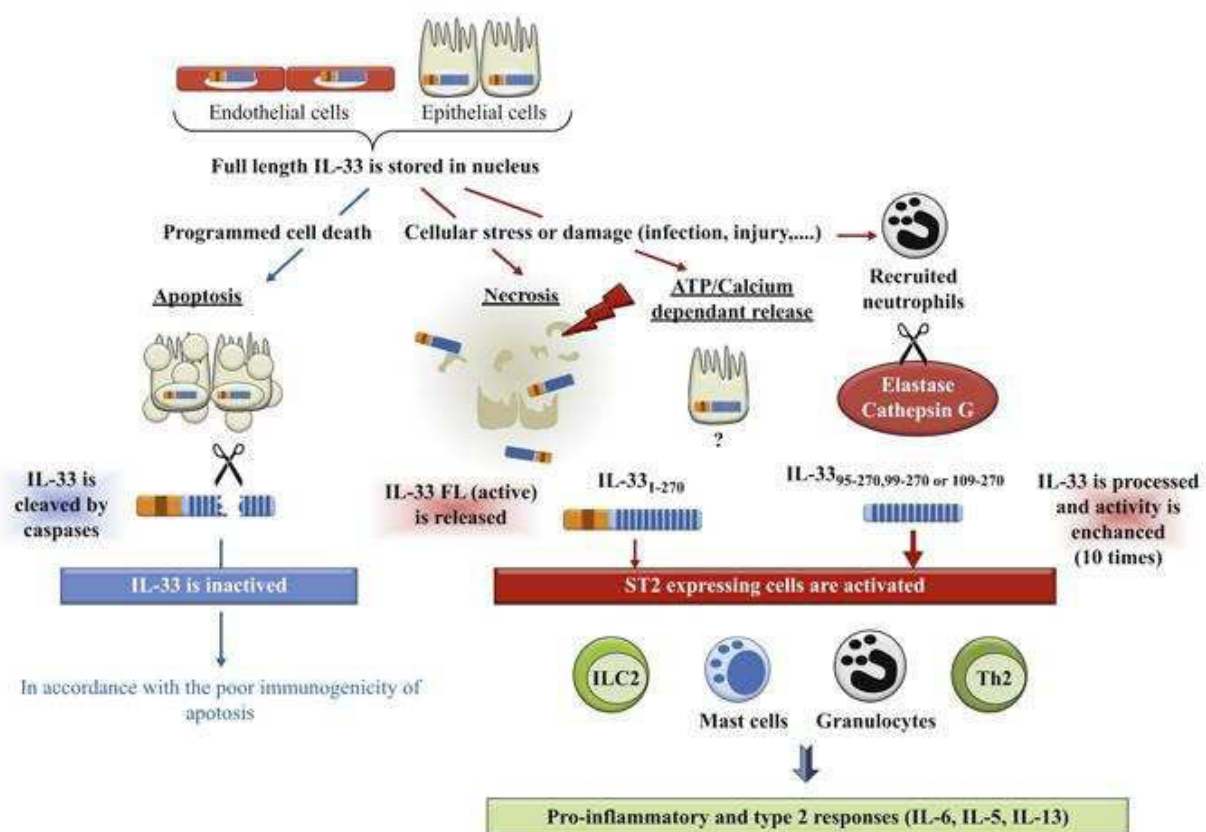


Figure 21: Représentation schématique des mécanismes de sécrétion et modification de l'IL-33. D'après Emma Lefrançais, European Cytokine Network, 2012.

Néanmoins, ces mécanismes de sécrétion passive ne sauraient expliquer la sécrétion d'IL-33 par des cellules non engagées dans une voie de mort cellulaire, ce qui sous-tend l'existence d'autres mécanismes (Figure 21). En 2008, une étude américaine a démontré que les astrocytes gliaux en culture primaire induisent l'expression d'IL-33 après exposition à différents PAMP (PAM3Cys, ARN double brin et LPS), et sécrètent de l'IL-33 active dans le milieu de culture après un traitement consécutif à l'ATP (Hudson et al., 2008). Par la suite, il a été démontré que les cellules étoilées hépatiques et pancréatiques vivantes sécrètent l'IL-33 *in vitro* en réponse à des cytokines pro-inflammatoires (Marvie et al., 2010; Nishida et al., 2010). *In vivo*, l'exposition de souris naïves à un allergène aérien courant, le champignon *Alternaria alternata*, induit une rapide sécrétion d'IL-33 à partir des cellules épithéliales pulmonaires vers la lumière des voies aérienne. *In vitro*, cette même étude a montré que l'exposition à *Alternaria alternata* induit l'accumulation d'ATP extracellulaire et la sécrétion d'IL-33 dépendante de l'activation par l'ATP du récepteur purinergique P2 (Kouzaki et al., 2011). Plus récemment, il a enfin été démontré que l'IL-33 exprimée par les cardiomyocytes vivants est adressée hors du noyau en transitant par les pores nucléaires jusqu'à des vésicules liées à la membrane et permettant la sécrétion active de l'IL-33 en réponse à un stress mécanique (Kakkar et al., 2012). Ces études pionnières réalisées sur des types cellulaires très différents indiquent qu'à l'instar de l'IL-1 α et HMGB1, l'IL-33 pourrait disposer de différents modes de sécrétion non conventionnels qui restent à caractériser (Lee et al., 1997; Gardella et al., 2002).

III. ST2 : Structure, sources, signalisation, régulation

Le récepteur ST2 également appelé IL-1R4, T1, DER4 ou Fit-1, est un membre de la famille des récepteurs TIR et plus particulièrement de la sous famille des récepteurs de l'IL-1.

1. Structure

Le gène *st2* a été identifié dans les fibroblastes 3T3 de souris stimulés par des oncogènes ou du sérum, puis rapproché de la famille des immunoglobulines de part les homologies de séquence observées (Klemenz et al., 1989; Tominaga, 1989). Il est étroitement lié aux gènes IL-1R1 sur le chromosome 1 murin et sur le chromosome 2 humain (Tominaga et al., 1991; Dale et Nicklin, 1999). Grâce à un système de double promoteur et à un épissage alternatif du gène, quatre ARN messagers sont générés : une forme longue transmembranaire (ST2L), une forme courte sécrétée (sST2), et deux variants ancrés à la membrane (ST2V et ST2VL) (Klemenz et al., 1989; Werenskiold et al., 1989; Werenskiold, 1992; Takagi et al., 1993; Yanagisawa et al., 1993;

Tominaga et al., 1999; Tago et al., 2001; Iwahana et al., 2004).

Le récepteur ST2L partage les caractéristiques structurales des récepteurs TIR. En effet, il dispose du motif TIR intracellulaire d'environ 200 acides aminés très conservés au cours de l'évolution et commun aux récepteurs de la famille de l'IL-1 (à l'exception du récepteur à l'IL-1 de type II) ainsi qu'aux TLR et à la sous-famille des molécules adaptatrices MyD88. Ce domaine TIR comprend 3 séquences conservées d'acides aminés, les boîtes 1, 2 et 3 (Slack et al., 2000) ainsi qu'une structure tertiaire conservée (Xu et al., 2000). Ce domaine est essentiel à la localisation membranaire du récepteur via des interactions avec le cytosquelette cellulaire, ainsi qu'à la transduction du signal induit par l'IL-33 via le domaine TIR du récepteur accessoire IL-1RAcP (Watters et al., 2007). La partie extracellulaire du récepteur ST2 est caractérisée par la présence de 3 domaines immunoglobulines extracellulaires riches en leucine permettant la liaison spécifique à l'IL-33 (Schmitz et al., 2005; Chackerian et al., 2007).

La forme soluble sST2 est produite grâce à un système de double promoteur (Bergers et al., 1994; Thomassen et al., 1995; Iwahana et al., 1999). Contrairement à ST2L, sST2 est dépourvu des domaines transmembranaire et intracellulaire, et possède une séquence C-terminale spécifique de 9 acides aminés (Gachter et al., 1996). Il s'agirait donc d'un récepteur leurre permettant de se lier à l'IL-33 libre et de l'empêcher ainsi de se lier à ST2L à la surface de ses cellules cibles. Les formes variantes ST2V et ST2LV sont produites par des mécanismes d'épissage alternatif. ST2V ne contient que deux domaines immunoglobulines extracellulaires et a une queue hydrophobique C-terminale particulière (Tominaga et al., 1999), tandis que ST2LV est une forme sécrétée dont le domaine transmembranaire a été épissé (Iwahana et al., 2004). Ces différentes isoformes de ST2 ont des profils d'expression différents, selon les tissus, les types cellulaires et les espèces, ce qui permettrait une régulation fine de la signalisation de l'IL-33 (Kumar et al., 1997; Oshikawa et al., 2002b; Oshikawa et al., 2002a). Par la suite, ST2 désignera la forme longue ST2L du récepteur dans ce manuscrit.

2. Sources cellulaires

Étant donné que l'IL-33 est principalement exprimée au niveau des cellules endothéliales et épithéliales, il n'est pas surprenant que ces cellules constituant la première ligne de défense contre les agressions puissent y répondre (Pastorelli et al., 2010; Yagami et al., 2010). L'IL-33 a été notamment décrite comme un activateur endothélial potentiel capable de promouvoir l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire *in vitro* et *in vivo*, en favorisant la prolifération, la migration et la différenciation morphologique des cellules endothéliales, en induisant la production d'oxyde nitrique par la NOS endothéliale, ainsi qu'en réduisant les jonctions cellulaires liées aux cadhérines

(Choi et al., 2009). Une autre étude a décrit l'expression de ST2 par les cellules endothéliales et épithéliales pulmonaires, avec une surexpression observée en présence d'IL-4. Un traitement à l'IL-33 induit la production d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 par ces cellules en culture primaire, témoignant d'un rôle pro-inflammatoire de l'IL-33 dans les poumons (Yagami et al., 2010). Les fibroblastes expriment également ST2 comme en témoignent les premières descriptions de ce récepteur en 1989 (Tominaga, 1989). Les fibroblastes murins sont donc capables de répondre à l'IL-33 par la production de facteurs chimiotactiques et de cytokines pro-inflammatoires (Funakoshi-Tago et al., 2008).

S'il est exprimé au niveau des fibroblastes et des cellules endothéliales et épithéliales, le récepteur ST2 est principalement exprimé au niveau des cellules immunitaires participant à l'immunité innée et/ou adaptative (Mirchandani et al., 2012).

Les basophiles et mastocytes sont tous capables de répondre à l'IL-33, ce qui induit une production accrue de cytokines et chimiokines (Moulin et al., 2007; Pecaric-Petkovic et al., 2009; Schneider et al., 2009). Cependant, l'IL-33 seule est insuffisante pour induire la dégranulation mastocytaire, mais elle induit la production d'IL-6, de TNF- α et de MCP-1 (Moulin et al., 2007) et agit en synergie avec les IgE pour induire une production cytokinique accrue (Silver et al., 2010; Andrade et al., 2011). Par ailleurs, l'IL-33 induit une profonde éosinophilie in vivo (Schmitz et al., 2005) via la stimulation de hauts niveaux d'IL-5 par différents types cellulaires. Cependant, l'IL-33 agit aussi directement sur les éosinophiles qui expriment de bas niveaux de ST2, mais en induisent fortement l'expression au niveau des voies aériennes en cas d'asthme. L'IL-33 induit alors la différenciation des éosinophiles à partir des cellules CD117⁺ de la moelle osseuse de façon dépendante de l'IL-5, et stimule la production de cytokines et l'activation alternative des macrophages induite par les éosinophiles de façon dépendante de l'IL-13 (Pecaric-Petkovic et al., 2009; Chow et al., 2010; Stolarski et al., 2010). Selon les études, l'IL-33 peut avoir des effets opposés sur le recrutement des neutrophiles en fonction des chimiokines qu'elle induit ou réprime (Le et al., 2012; Liew, 2012; Sakai et al., 2012). Elle peut en outre directement favoriser le recrutement des neutrophiles en limitant la répression du récepteur CXCR2 induite par l'activation du TCR, ce qui atténue in fine le choc septique chez la souris (Alves-Filho et al., 2010).

Les macrophages expriment également ST2. L'IL-33 est notamment capable d'accroître la polarisation des macrophages vers un phénotype activé alternatif, ce qui contribue à l'inflammation allergique des voies aériennes (Kurowska-Stolarska et al., 2009; Hazlett et al., 2010). Une pré-incubation courte avec l'IL-33 accroît également la production de cytokines induites par le LPS (Espinassous et al., 2009). Une autre étude confirme la capacité des macrophages à répondre à l'IL-33, pour promouvoir leur activation alternative ou classique (Joshi et al., 2010). De la même manière, les cellules dendritiques sont activées par l'IL-33 via le récepteur ST2 qu'elles expriment

(Rank et al., 2009), ce qui induit l'expression du CMH de classe II et de molécules de co-stimulation incluant CD80, CD86 et OX40L, ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires (Rank et al., 2009; Besnard et al., 2011). L'exposition des cellules dendritiques à l'IL-33 conduit à l'induction d'une réponse Th2 avec production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 par les lymphocytes en co-culture (Rank et al., 2009).

Parmi les lymphocytes précocement recrutés au niveau des sites inflammatoires, les lymphocytes NK et NKT répondent directement à l'IL-33 par une réponse immunitaire accrue. Néanmoins, si l'IL-33 est classiquement associée à une polarisation immunitaire préférentiellement Th2 dans de nombreuses études, les résultats obtenus sur les NK et NKT indiquent qu'elle peut accroître à la fois les réponses Th1 et Th2 en fonction de l'environnement cytokinique. Ainsi, en présence d'IL-12, l'IL-33 induirait l'expression d'IFN- γ , tandis qu'elle induirait plus volontiers l'induction de cytokines Th2 en présence d'IL-4 (Smithgall et al., 2008; Bourgeois et al., 2009). L'expression de ST2 a été démontrée également au niveau des cellules B1 présentant un BCR restreint et produisant des IgM au cours de la réponse immune innée. Ces cellules répondent fortement à un traitement à l'IL-33 *in vivo* par une production accrue de cytokines et d'IgM (Komai-Koma et al., 2011). Enfin, ST2 est également exprimé au niveau d'une population de cellules récemment caractérisée, les cellules lymphoïdes effectrices innées de type 2 ou nuocytes. Ces cellules issues de la lignée lymphoïde prolifèrent en réponse à l'IL-33 et l'IL-25 rapidement sécrétées et représentent une source précoce prédominante d'IL-13 dans les poumons et les intestins indépendamment de la réponse immune adaptative (Neill et al., 2010; Mjosberg et al., 2011; Kim et al., 2012a). Lors d'une infection intestinale par *Nippostrongylus brasiliensis*, les nuocytes prolifèrent en réponse à l'IL-33 et à l'IL-25, et constituent la source principale d'IL-13 propice à l'expulsion des vers (Neill et al., 2010). Au niveau des poumons, ces cellules lymphoïdes innées caractérisées par l'expression de ST2 participent au maintien de l'intégrité épithéliale après infection par le virus Influenza (Monticelli et al., 2011). En contrepartie, ces cellules pourraient être impliquées dans les mécanismes d'hyper-réactivité des voies aériennes, en réponse à l'IL-33 produite par les macrophages alvéolaires de façon NKT-dépendante (Kim et al., 2012a).

L'IL-33 régule également directement le système immunitaire adaptatif, indépendamment de son action sur les cellules présentatrices d'antigènes, granulocytes et NKT. A ce niveau, l'IL-33 est surtout décrite comme un régulateur fonctionnel de la différenciation des lymphocytes T auxiliaires qu'elle est capable de polariser vers un phénotype Th2 caractérisé par la production d'IL-5, d'IL-13 avec ou sans production d'IL-4 (Schmitz et al., 2005; Kurowska-Stolarska et al., 2008; Miller et al., 2008; Xu et al., 2008). L'IL-33 est aussi décrite comme un puissant agent chimiotactique sélectif pour les lymphocytes Th2 *in vitro* et *in vivo* permettant leur recrutement au niveau des sites inflammatoires (Komai-Koma et al., 2007). Par ailleurs, l'IL-33 agit en association avec le TGF- β

pour accroître la production d'IL-9 au niveau des lymphocytes T CD4⁺ (Uyttenhove et al., 2010; Blom et al., 2011). Enfin, une étude a démontré que l'IL-33 est capable d'induire la production cytokinique au niveau des cellules Th2, mais aussi au niveau des cellules Th1 et Th17, optimisant ainsi leur potentiel inflammatoire (Guo et al., 2009; Blom et Poulsen, 2012). L'IL-33 agit sur les cellules T auxiliaires mais aussi sur les cellules T cytotoxiques. En effet, il a été démontré que les lymphocytes T CD8⁺ surexpriment ST2 en réponse à l'IL-12 et à la stimulation du TCR (Yang et al., 2011), et dans un modèle viral de chorioméningite lymphocytaire, la sécrétion d'IL-33 par des cellules non hématopoïétiques induit une surexpression de ST2 et accroît les fonctions antivirales des lymphocytes cytotoxiques (Bonilla et al., 2012).

3. Signalisation de l'IL-33 via ST2

L'IL-33 partage de nombreuses caractéristiques de la superfamille de l'IL-1, incluant une voie de signalisation partagée (Figure 22). La fonction cytokinique classique de l'IL-33 requiert l'expression simultanée du récepteur spécifique ST2 et du récepteur accessoire de l'IL-1, IL-1RAcP. En effet, l'interaction d'IL-33 avec son récepteur spécifique ST2 permet la formation d'un complexe récepteur hétérodimérique membranaire ST2/IL-1RAcP (Ali et al., 2007; Chackerian et al., 2007; Palmer et al., 2008). L'association des domaines TIR des deux récepteurs permet un changement conformationnel des domaines cytoplasmiques autorisant une interaction avec la molécule adaptatrice MyD88 (Schmitz et al., 2005; Chackerian et al., 2007; Kroeger et al., 2009). Cette dernière possède un domaine d'interaction protéine-protéine appelé « domaine de mort » permettant le recrutement séquentiel des sérine/thréonine kinases associées au récepteur de l'IL-1 IRAK4 et IRAK1, et de l'ubiquitine ligase TRAF6 (Funakoshi-Tago et al., 2008). La formation de ce complexe induit la phosphorylation de diverses molécules de signalisation, telles que ERK1/2, p38 et l'inhibiteur I κ B ainsi adressé vers le protéasome, ce qui démasque le signal de localisation nucléaire de NF- κ B et permet son adressage au noyau. Cette voie de signalisation aboutit à la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes (Schmitz et al., 2005; Chackerian et al., 2007). En outre, la signalisation de ST2 pourrait réprimer la signalisation induite par les TLR (TLR2, TLR4, TLR9) ainsi que par le récepteur de l'IL-1 par une liaison compétitive avec MyD88, et pourrait jouer un rôle régulateur important prévenant les réactions inflammatoires exacerbées en réponses aux infections (Brint et al., 2004; Liew et al., 2005). Enfin, il est à noter qu'il existe des variations de la cascade de signalisation selon le type cellulaire, avec par exemple un rôle du récepteur à tyrosine kinase c-kit essentiel à la signalisation dans les mastocytes (Drube et al., 2010), mais une phosphorylation non nécessaire de TRAF6 au niveau des basophiles (Kroeger et al., 2009) alors qu'il s'agit d'une étape essentielle dans les fibroblastes (Funakoshi-Tago et al., 2008) et les cellules

endothéliales (Choi et al., 2009).

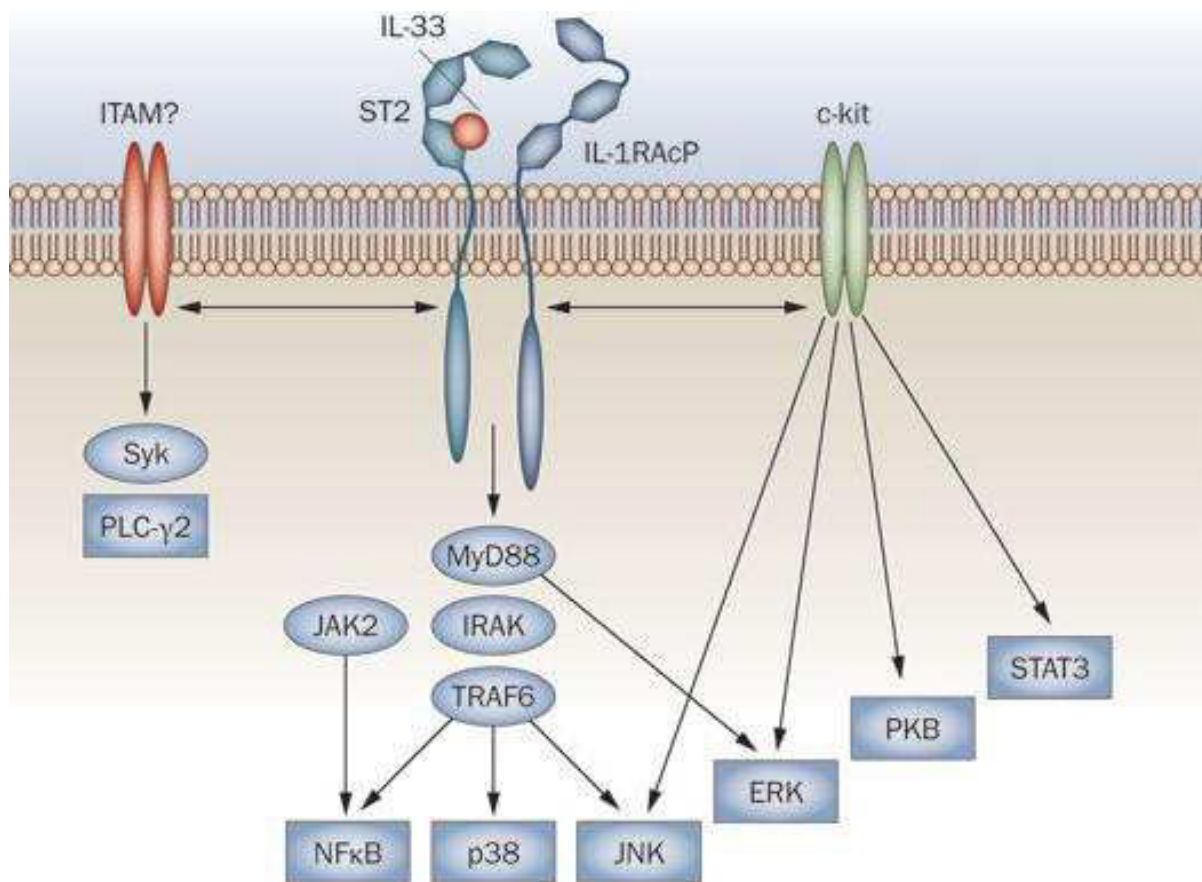


Figure 22 : Signalisation de l'IL-33 via ST2. La liaison d'IL-33 à ST2 induit le recrutement d'IL-1RAcP et l'activation de la voie de signalisation intracellulaire incluant MyD88 et l'activation de NF-κB, p38 et JNK dépendante de TRAF6, ainsi que l'activation d'ERK dépendante de Myd88. JAK2 est également démontré impliqué dans l'activation de NF-κB. Le croisement de l'axe IL-33/ST2 avec la signalisation de c-kit pourrait augmenter l'activation d'ERK, JNK, PKB et STAT3 dans les mastocytes. Dans les monocytes, l'IL-33 active Syk, GAB2 et PLC-g2, suggérant un croisement possible avec les récepteurs portant des ITAM. D'après Palmer et Gabay, 2011.

4. Modulation de la signalisation

Le récepteur leurre sST2 est détecté au niveau des fluides biologiques au cours de différentes maladies telles que les chocs septiques et traumatismes (Brunner et al., 2004), la fibrose pulmonaire idiopathique (Tajima et al., 2003), l'inflammation allergique des voies respiratoires et l'asthme (Oshikawa et al., 2001), la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux systémique (Kuroiwa

et al., 2001), l'insuffisance cardiaque chronique (Weinberg et al., 2003) et l'infarctus du myocarde (Shimpo et al., 2004). Dans la mesure où l'IL-33 joue un rôle cardio-protecteur, différents auteurs proposent le récepteur leurre sST2 comme un biomarqueur pour les maladies cardio-vasculaires (Weinberg et al., 2003; Sanada et al., 2007; Kakkar et Lee, 2008).

A l'instar de ST2, le récepteur accessoire de l'IL-1 dispose d'un récepteur soluble, sIL-1RAcP, produit d'un épissage d'alternatif détecté au niveau des fluides biologiques. sIL-1RAcP a été décrit comme capable de multiplier 4 fois l'affinité d'IL-33 pour sST2 consolidant ainsi l'inhibition de l'IL-33 induite par sST2 (Palmer et al., 2008).

SIGIRR (Single Ig IL-1R related molecule) est un récepteur membranaire de la famille des TIR caractérisé par un simple domaine immunoglobuline extracellulaire. Il a été décrit comme un régulateur négatif des TLR et de l'IL-1R s'opposant au recrutement de MyD88 au niveau des complexes de récepteurs (Wald et al., 2003), et plus récemment comme un régulateur négatif de l'axe IL-33/ST2 in vitro et in vivo (Bulek et al., 2009) (Figure 23).

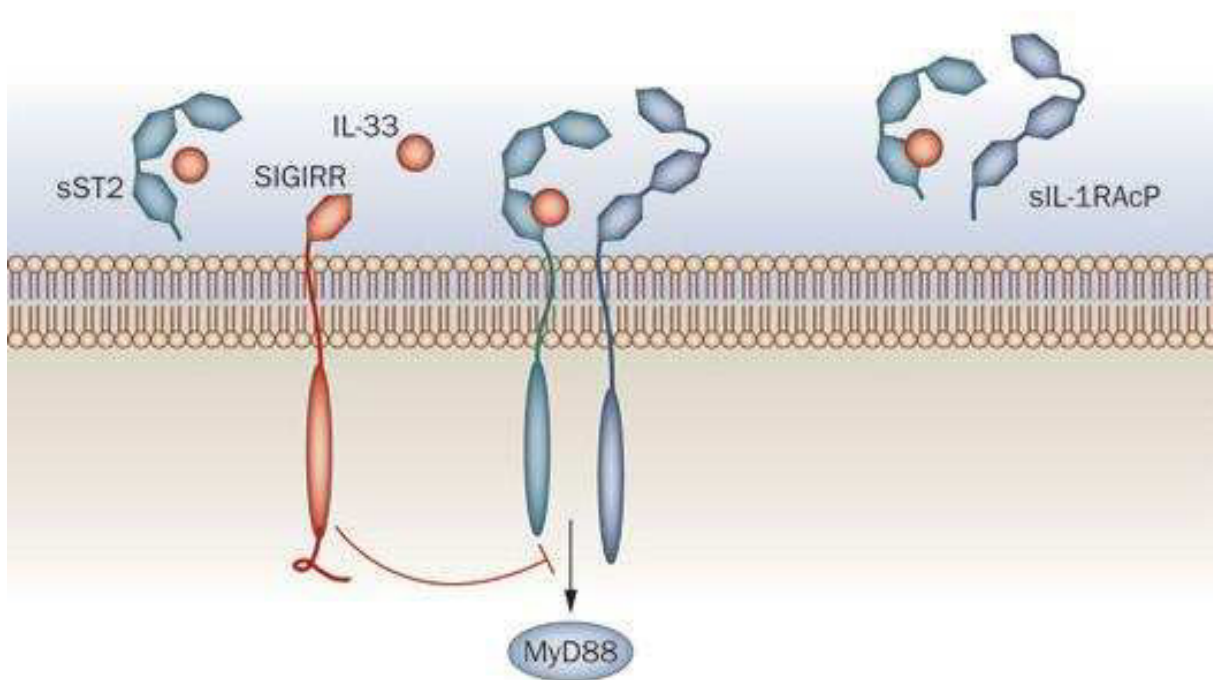


Figure 23 : Régulation de la signalisation de l'IL-33 via sST2, sIL-1RAcP et SIGIRR. D'après Palmer et Gabay, 2011.

IV. IL-33 et maladies infectieuses

Du fait de ses fonctions d'alarmine pro-inflammatoire d'une part et de cytokine préférentiellement Th2 d'autre part, l'IL-33 joue des rôles divers au cours des maladies humaines. Comme nous avons pu l'observer ci-dessus, l'IL-33 est notamment délétère dans le cas des maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde (Xu et al., 2008; Palmer et al., 2009), les maladies inflammatoires de l'intestin (Beltran et al., 2010) et les maladies allergiques (Kurowska-Stolarska et al., 2008; Kim et al., 2012b). A l'inverse, elle joue un rôle protecteur pour les maladies cardiaques (Sanada et al., 2007) et métaboliques (Miller et al., 2010), ainsi que pour de nombreuses maladies associées à une réponse Th1 exacerbée comme l'athérosclérose (Miller et al., 2008). L'IL-33 joue également différents rôles dans un grand nombre de maladies infectieuses.

1. Virus

Sachant que le contrôle des infections virales repose sur la mise en place d'une réponse immune de type Th1, l'IL-33 décrite comme une cytokine Th2 joue un rôle délétère dans diverses maladies virales (Tableau 4).

En effet, ST2 est exprimé par une sous-population de lymphocytes T CD4⁺ lors d'une maladie pulmonaire éosinophilique Th2-dépendante induite par les protéines d'attachement du virus syncytial respiratoire chez la souris. Un traitement avec un anticorps monoclonal bloquant l'activité de ST2 réduit l'inflammation et la sévérité de la pathologie et pourrait offrir des perspectives thérapeutiques contre les maladies pulmonaires virales à polarisation Th2 (Walzl et al., 2001).

Lors d'une infection par le virus de la grippe, l'IL-33 est fortement induite dans les poumons, au niveau des cellules endothéliales et des cellules épithéliales alvéolaires chez la souris. Cette induction d'IL-33 est corrélée à celle des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β et IL-6) et associée à une augmentation de l'expression d'IFN- β . In vitro, l'infection de cellules épithéliales humaines MLE-15 avec différentes souches de virus Influenza induit la surexpression d'IL-33, suggérant un rôle de l'IL-33 dans la réponse immune pulmonaire déclenchée par le virus chez l'Homme (Le Goffic et al., 2011). Outre les cellules endothéliales et épithéliales, les macrophages alvéolaires peuvent exprimer l'IL-33 en réponse à une infection par le virus Influenza. Ceci induit la production critique d'IL-13 par les cellules lymphoïdes auxiliaires innées non-T non-B ST2⁺ résidentes chez la souris, contribuant ainsi à l'hyper-réactivité des voies aériennes. Ce mécanisme pourrait partiellement expliquer les formes grippales asthmatiques sévères chez l'Homme (Chang et al., 2011). Une autre étude confirme l'existence de ces cellules résidentes nouvellement décrites dans les poumons, chez la souris et chez l'Homme. Cependant, la suppression

de ces cellules diminue la fonction pulmonaire et le remodelage des voies aériennes chez la souris, de même qu'un traitement avec un anticorps monoclonal bloquant l'IL-33. Ce résultat suggère un rôle critique IL-33-dépendant des cellules lymphoïdes innées dans la réparation de l'épithélium pulmonaire après infection par le virus Influenza, par un mécanisme impliquant la production d'amphiréguline et l'activation de la voie du récepteur de l'EGF. L'IL-33 serait donc protectrice dans ce cas, suggérant des fonctions différentielles selon le modèle d'infection employé et la pathologie induite. Un ciblage thérapeutique de l'IL-33 et des cellules lymphoïdes innées contre la grippe et autres infections des voies aériennes est donc à considérer avec circonspection (Monticelli et al., 2011; Monticelli et al., 2012). Toutefois, l'IL-33 pourrait être employée dans le cadre de développements vaccinaux. En effet, des souris ont été immunisées avec un vaccin muqueux constitué d'une hémagglutinine recombinante du virus Influenza et d'IL-33 adjuvante et administré par voie intra-nasale. Ces souris présentaient un taux significativement accru d'IgG spécifiques dans le plasma et d'IgA dans les sécrétions muqueuses, ainsi que de plus hauts niveaux de cytokines Th1 et Th2, aboutissant à une protection significative contre une infection létale par le virus Influenza, en comparaison avec les souris vaccinées avec le seul antigène. L'efficacité de cet effet adjuvant de l'IL-33 est significativement réduite chez des souris déficientes en mastocytes, témoignant du rôle important de cette population cellulaire dans l'induction d'une immunité muqueuse spécifique (Kayamuro et al., 2010).

Dans le cas d'une infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire, l'IL-33 libérée par les cellules nécrotiques est nécessaire à l'activation, à l'expansion clonale des lymphocytes T CD8⁺ ST2⁺, ainsi qu'aux réponses cytotoxiques induites par les ARN et ADN viraux chez la souris. En outre, l'injection d'IL-33 recombinante augmente la réponse des lymphocytes T cytotoxiques induite par un adénovirus non-répliquatif vaccinal, témoignant de son rôle protecteur dans ce modèle (Bonilla et al., 2012).

D'autres études plus cliniques ont été parallèlement engagées afin de déterminer les niveaux circulants d'IL-33 et sST2 dans le cadre de maladies virales. Il a notamment été démontré que les patients infectés par le virus de la dengue ont des taux sériques de sST2 élevés, en particulier dans le cas d'infections secondaires, en comparaison avec des patients atteints d'autres maladies fébriles. Ce niveau élevé de sST2 est négativement corrélé avec la numération leuco-plaquettaire et positivement corrélé avec la rapidité d'hémostase et l'activité des transaminases. Il diminue significativement avec la défervescence et pourrait donc constituer un marqueur potentiel de l'infection par le virus de la dengue, associé à la sévérité de la maladie (Becerra et al., 2008). Plus récemment, une étude similaire s'est intéressée à sST2 et à l'IL-33 au niveau des cas pédiatriques de dengue incluant des cas sévères de myocardites. Si l'IL-33 n'est pas modifiée chez les patients, des niveaux de sST2 importants ont été observés comme précédemment chez les patients comparés aux

sujets sains. Ils sont corrélés avec la sévérité de la maladie, avec la créatine-kinase MB, marqueur des dommages du muscle cardiaque, et avec des cytokines pro-inflammatoires circulantes telles que l'IL-6 et l'IL-8. A l'inverse, ces niveaux de sST2 sont inversement corrélés avec la numération plaquettaire. Ces résultats suggèrent de nouveau que sST2 pourrait être un marqueur prédictif de la sévérité de la dengue qui pourrait être employé en complément des algorithmes actuellement utilisés par les cliniciens (Guerrero et al., 2013). Des études complémentaires sont toutefois requises pour confirmer ces résultats sur des cohortes plus importantes, mais également pour déterminer les sources de sST2 et son rôle possible dans l'évolution de la dengue.

Des hauts niveaux de sST2 ont été détectés dans le sérum de patients infectés par le VIH comparés à des patients atteints de dermatite atopique et des sujets sains. A l'inverse, les niveaux d'IL-33 étaient plus bas chez les patients VIH que chez les contrôles, avec une tendance à la décroissance avec la sévérité de la maladie. Ainsi, une décroissance des cellules TCD4⁺ du fait de l'infection virale, de hauts niveaux de sST2 et de bas niveaux d'IL-33 pourraient contribuer à de hauts risques d'infections opportunistes, mais aussi à un risque accru d'athérosclérose chez les patients infectés par le VIH (Currier et al., 2008; Miller et al., 2008; Miyagaki et al., 2011).

Enfin, une équipe s'est intéressée aux hépatites. Chez les patients atteints d'hépatite B chronique, le niveau d'IL-33 sérique est significativement plus élevé que chez les sujets sains, et il décroît en parallèle à l'augmentation des concentrations cytokiniques sériques, en réponse à un traitement de 12 semaines par de l'adefovir dipivoxil (Wang et al., 2012a). Dans le cas de l'hépatite C, le niveau sérique d'IL-33, corrélé au niveau des transaminases, est significativement accru chez les patients avec hépatite chronique par rapport à des patients dont l'infection est spontanément résolue et à des sujets sains. Il décroît de la même manière après un traitement à l'interferon de 12 semaines (Wang et al., 2012b). L'IL-33 pourrait donc contribuer aux dommages hépatiques liés aux virus de l'hépatite B et de l'hépatite C. Ces résultats sont cohérents avec les travaux préalables de notre équipe indiquant une association entre la surexpression d'IL-33 et ST2 dans le foie d'une part et la fibrose hépatique d'autre part, l'étiologie de la fibrose incluant dans ce cas des hépatites B et C pour moitié (Marvie et al., 2010).

L'axe IL-33/ST2 semble donc impliqué dans différentes maladies virales et pourrait jouer un rôle favorable ou délétère selon les cas. Néanmoins, ces études ont été réalisées sur des modèles murins ou sur de petits effectifs de patients, et nécessitent donc de plus amples investigations afin de confirmer les effets observés et d'en comprendre les mécanismes.

Tableau 4 : Place de l'axe IL-33/ST2 au cours des maladies virales. D'après les données de la littérature.

Pathologies	Espèces	Résultats principaux	Références
Bronchiolite	Souris	Réduction de l'inflammation et de la sévérité de la maladie pulmonaire après blocage de ST2	Walzl, 2001
Grippe	Souris	Induction d'IL-33 dans les cellules endothéliales pulmonaires et dans les cellules épithéliales alvéolaires corrélée à l'induction de cytokines pro-inflammatoires et associée à l'induction d'IFN- β	Le Goffic, 2010
	Homme	Surexpression d'IL-33 par les cellules épithéliales MLE-15 en réponse à différentes souches virales	Le Goffic, 2010
	Souris	Production d'IL-13 par des cellules lymphoïdes auxiliaires ST2 ⁺ en réponse à l'IL-33 induite par les macrophages alvéolaires en réponse au virus	Chang, 2011
	Souris	Répression de la fonction pulmonaire et du remodelage des voies aériennes en cas de suppression des cellules lymphoïdes innées ST2 ⁺ ou blocage d'IL-33	Monticelli, 2011
Souris	Souris	Efficacité accrue d'un vaccin constitué d'une hémagglutinine virale en présence d'IL-33 adjuvante associée à une production accrue d'IgG et d'IgA et de cytokines Th1 et Th2	Kayamuro, 2010
	Souris	IL-33 endogène libérée par les cellules nécrotiques favorisant l'activation, l'expansion clonale et la cytotoxicité des lymphocytes T CD8 ⁺ ST2 ⁺	Bonnilla, 2012
Dengue	Homme	Niveau de sST2 sérique élevé chez les patients, inversement corrélé à la numération leuco-plaquettaire et positivement corrélé à l'hémostase et aux transaminases	Becerra, 2008
	Homme	Niveaux de sST2 sériques élevés (sans modification d'IL-33) dans les cas pédiatriques sévères, et corrélés à la sévérité de la maladie et à la production de cytokines pro-inflammatoires	Guerrero, 2013
SIDA	Homme	Augmentation du niveau de sST2 et diminution du niveau d'IL-33 dans le sérum des patients comparés à des sujets sains	Miyagaki, 2011
Hépatites virales	Homme	Augmentation du niveau sérique d'IL-33 chez les patients infectés par le virus de l'hépatite B, et réduction de ce niveau après traitement	Wang, 2012a
	Homme	Augmentation du niveau sérique d'IL-33 corrélé au niveau des transaminases chez les patients infectés par le virus de l'hépatite C, et réduction de ce niveau après traitement	Wang, 2012b
	Homme	Surexpression d'IL-33 dans les cellules endothéliales, sinusoidales et dans les cellules étoilées du foie associée à la fibrose hépatique	Marvie, 2010

2. Bactéries

La signalisation d'IL-33 via ST2 est décrite comme un régulateur négatif de la voie des TLR (Brint et al., 2004; Liew et al., 2005), et a de fait été associée à différentes pathologies impliquant une reconnaissance de motifs bactériens par ces récepteurs (Tableau 5).

En effet, du fait des voies de signalisation similaires des différents TLR, leur activation concomitante par un grand nombre de pathogènes aurait un effet synergique délétère dans le cas des chocs septiques induisant des lésions tissulaires importantes. Cependant, l'activation modérée des

TLR dans le cadre d'infections bactériennes diminuerait le seuil d'activation du système immunitaire, favorisant ainsi une meilleure tolérance aux endotoxines et une clairance bactérienne plus efficace contre les infections ultérieures (Sato et al., 2000). Un prétraitement avec des molécules agoniste des TLR favorise donc le contrôle d'infections ultérieures chez la souris dans un modèle de péritonite septique. Ce mécanisme protecteur est associé à une accumulation de neutrophiles effecteurs dans la cavité péritonéale ainsi qu'à une répression cytokinique en partie liée à un défaut d'activité de MyD88. ST2 a été décrit comme un répresseur de la voie du TLR2 et du TLR4 par la séquestration de la voie de MyD88 dans ce modèle. Il contribue ainsi à la tolérance au LPS, mais il ne semble pas indispensable à la tolérance induite par la lipoprotéine bactérienne (Brint et al., 2004; Feterowski et al., 2005; Liu et al., 2010). Des souris traitées avec de l'IL-33 présentent un influx de neutrophiles plus important que les souris non traitées, conduisant à une clairance bactérienne plus efficace. Comme l'activation des TLR réprime CXCR2, récepteur de l'IL-8 et CXCL2 essentiel au recrutement des neutrophiles, l'inhibition de la voie du TLR4 via ST2 prévient la répression du CXCR2 et favorise ainsi le chimiotactisme des neutrophiles humains et murins favorable au contrôle efficace de l'infection (Alves-Filho et al., 2010). L'axe IL-33/ST2 semble avoir des effets protecteurs contre le choc septique via d'autres mécanismes. L'IL-33 inhibe GRK2, une sérine thréonine kinase responsable de l'internalisation des récepteurs de chimiokines tel que CXCR2 au niveau des neutrophiles en réponse à l'activation du TLR4, ce qui favorise également le recrutement des neutrophiles (Alves-Filho et al., 2010). En outre, les souris déficientes en ST2 présentent une susceptibilité accrue au choc septique s'expliquant par un défaut d'activité bactéricide, du fait d'une maturation inefficace des phagosomes et d'une répression sévère de NOX2 limitant la production d'espèces réactives de l'oxygène (Buckley et al., 2011). Ces effets protecteurs de la signalisation de l'IL-33 via ST2 ont été confortés par des études cliniques. Le choc septique induit une concentration plasmatique accrue du récepteur leurre sST2, significativement corrélée à la sévérité de la maladie ainsi qu'à la mortalité des patients (Brunner et al., 2004; Hoogerwerf et al., 2010). Dans une autre étude, les individus qui se sont rétablis présentaient un niveau de sST2 significativement plus bas que ceux qui n'ont pas survécu au choc septique, confortant le rôle délétère de ce récepteur soluble et suggérant un emploi thérapeutique potentiel de l'IL-33 (Alves-Filho et al., 2010).

IL-33 et ST2 participent également à la résistance cornéenne contre *Pseudomonas aeruginosa*. Ils sont constitutivement exprimés dans la cornée normale chez des souris BALB/c résistantes et des souris C57BL/6 sensibles, mais leurs niveaux d'expression sont significativement plus élevés chez les souris BALB/c infectées que chez les souris C57BL/6 avant de diminuer à 5 jours post-infection (Huang et al., 2007; Hazlett et al., 2010). Un traitement inhibiteur par voie sub-conjonctive avec une protéine de fusion ST2-Fc chez des souris BALB/c conduit à un moindre contrôle de la charge

bactérienne, un infiltrat de neutrophiles accrus, des niveaux cornéens accrus de cytokines pro-inflammatoires et Th1 et une répression des cytokines Th2 (Huang et al., 2007). L'injection d'IL-33 recombinante chez des souris C57BL/6 traitées conduit à l'inverse à un meilleur contrôle de la charge bactérienne, un infiltrat de neutrophile réduit, des niveaux cornéens de cytokines pro-inflammatoires et Th1 réduit, mais une surexpression de protéines Th2. Cette réponse Th2 ainsi promue résulte de la polarisation préférentiellement M2 des macrophages en réponse à l'IL-33 in vitro et in vivo, avec un phénotype caractérisé par l'expression d'arginase, d'IL-5 et d'IL-10 plutôt que celle de NOS2, d'IL-12 et d'IFN- γ (Hazlett et al., 2010).

Tableau 5 : Place de l'axe IL-33/ST2 au cours des maladies bactériennes. D'après les données de la littérature.

Pathologies	Espèces	Résultats principaux	Références
Choc septique	Souris	Surexpression de ST2 en réponse à un prétraitement protecteur avec un agoniste du TLR2 dans un modèle de péritonite septique	Feterowski, 2005
	Souris	Tolérance au LPS bactérien liée à la répression de la voie du TLR4 et de l'IL-1R par séquestration de Myd88 par ST2	Brint, 2004
	Souris	Répression de la voie du TLR2 par ST2 au niveau des macrophages non indispensable à la tolérance induite par la lipoprotéine bactérienne	Liu, 2010
	Souris	Répression de CXCR2 par les TLR contrecarrée par un traitement à l'IL-33 facilitant l'influx de neutrophiles et prévenant le choc toxique induit par une ligature et ponction caecale	Alves-Filho, 2010
	Souris	Susceptibilité accrue au choc septique chez les souris ST2 ^{-/-} par maturation inefficace des phagosomes et répression de NOX2 limitant la production d'espèces réactives de l'oxygène	Buckley, 2011
	Homme	Concentration de sST2 plasmatique accrue dans le cas de chocs septiques, comparés à des sujets sains ou à des patients admis pour traumatismes ou chirurgies abdominales	Brunner, 2004
	Homme	Concentration élevée de sST2 significativement corrélée à la sévérité de la maladie ainsi qu'à la mortalité des patients après un choc septique	Hoogerwerf, 2010
Kératite	Souris	Charge bactérienne cornéenne accrue en réponse au blocage de ST2, via la surexpression de cytokines pro-inflammatoires et Th1 chez des souris infectées par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Huang, 2007
	Souris	Charge bactérienne cornéenne réduite en réponse à un traitement par de l'IL-33r chez des souris infectées par <i>P. aeruginosa</i> , via une polarisation M2 macrophagique associée à une réponse Th2	Hazlette, 2010
Leptospirose	Homme	Niveaux de sST2 circulants corrélés à l'hémorragie et à la mortalité chez les patients présentant une leptospirose sévère	Wagenaar, 2009
Tuberculose	Souris	Pas de différence de charge bactérienne pulmonaire entre souris sauvages et ST2 ^{-/-} malgré l'induction d'une polarisation Th1 modeste chez les souris ST2 ^{-/-}	Wieland, 2009

De la même manière que les niveaux circulants de sST2 sont corrélés à la sévérité de la dengue notamment dans les cas d'hémorragies et myocardites sévères, ils sont également associés à l'hémorragie et à la mortalité chez les patients présentant une leptospirose sévère. Une étude *in vitro* de cellules mononucléées du sang périphérique infectés par des leptospires suggère que les leucocytes sanguins ne sécrètent pas de sST2 dans ce modèle, de sorte que sa présence dans le sang résulterait des dommages tissulaires dont souffrent les patients dans les cas de leptospirose sévère (Wagenaar et al., 2009).

Ainsi, l'axe IL-33/ST2 semble jouer un rôle important en réprimant la réponse des TLR ainsi qu'en favorisant une immunité tolérogène Th2. Toutefois, dans le cas de tuberculose murine, le rôle de l'IL-33 dans la répression de la réponse Th1 serait limité puisque des souris ST2^{-/-} présentent des charges bactériennes pulmonaires similaires à celle des souris sauvages (Wieland et al., 2009).

3. Champignons

De par son action modulatrice de la voie des TLR, l'IL-33 joue également un rôle au cours des infections fongiques (Tableau 6). En effet, un pré-traitement à l'IL-33 avant infection par *Candida albicans* par voie intra-péritonéale chez la souris favorise la clairance fongique et diminue la mortalité associée à la péritonite fongique. Ceci s'explique par une sécrétion accrue de CXCL1 et CXCL2 par les macrophages péritonéaux et la réversion parallèle de la répression de CXCR2 induite par les TLR au niveau des polynucléaires neutrophiles, aboutissant à un infiltrat neutrophilique rapide et massif similaire à celui observé dans le cas de péritonites bactériennes (Feterowski et al., 2005; Alves-Filho et al., 2010; Le et al., 2012). Par ailleurs, le traitement par l'IL-33 active les voies de signalisation des TLR et de la Dectine-1, conduisant à la surexpression du récepteur du complément CR3 et à une production accrue de ROS, favorisant ainsi la phagocytose et la destruction des levures opsonisées (Le et al., 2012).

De par sa fonction de cytokine pro-Th2, l'IL-33 joue également un rôle délétère au cours des mycoses broncho-pulmonaires allergiques. Dans un modèle murin d'infection intra-nasale par *Cryptococcus neoformans*, la surexpression de ST2 est corrélée à l'activation de la réponse Th2. En effet, les lymphocytes T auxiliaires ST2⁺ co-expriment significativement plus d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 que les cellules T auxiliaires ST2⁻, et sont associés à un contrôle inefficace de l'infection fongique (Piehler et al., 2013)

L'IL-33 est classiquement décrite comme un facteur pro-Th2 prédisposant à l'asthme (Borish et Steinke, 2011). Dans le cas d'asthme fongique, il a été démontré que l'exposition des voies aériennes à *Alternaria alternata* augmente les niveaux d'IL-33 dans les lavages broncho-alvéolaires chez la souris. Ceci induit la production d'IL-5 et d'IL-13, ainsi que le recrutement d'éosinophiles via la

prolifération et l'activation nécessaires et suffisantes de cellules lymphoïdes naturelles auxiliaires résidentes exprimant les facteurs de transcription STAT-6, GATA-3 et ETS-1 (Bartemes et al., 2012; Doherty et al., 2012). Comme observé au cours de la grippe, ces cellules auxiliaires innées induisent l'expression de l'amphiréguline en réponse à l'infection par *Alternaria* et activent ainsi la voie du récepteur de l'EGF dans l'épithélium bronchique participant à la pathogenèse de l'asthme (Doherty et al., 2012). Ces cellules également observées dans les lavages broncho-alvéolaires de patients pourrait être un nouveau mécanisme favorisant l'immunité Th2 et l'induction de maladies allergiques telles que l'asthme fongique (Doherty et al., 2012). Le ciblage de la voie IL-33/ST2 pourrait donc offrir des perspectives thérapeutiques dans ce cas. Une étude a ainsi récemment démontré que le blocage de ST2 avec un anticorps monoclonal spécifique potentialise les effets du traitement par le oligodeoxynucleotides CpG induisant un décalage protecteur d'une réponse Th2 vers une réponse Th1 par stimulation du TLR9, dans un modèle de souris C57BL/6 sensibilisées avec *Aspergillus fumigatus* puis infectées par des conidies aspergillaires par instillation intra-trachéale (Ramaprakash et al., 2011).

Tableau 6 : Place de l'axe IL-33/ST2 au cours des maladies fongiques. D'après les données de la littérature.

Pathologies	Espèces	Résultats principaux	Références
Péritonite fongique	Souris	Clairance de <i>Candida albicans</i> et survie des souris améliorées après pré-traitement par de l'IL-33 induisant un infiltrat accru de neutrophiles et une phagocytose et lyse des levures améliorées	Le, 2012
Mycoses broncho-pulmonaires	Souris	Expression de cytokines Th2 par les lymphocytes T auxiliaires ST2 ⁺ associée à un contrôle inefficace de l'infection à <i>Cryptococcus neoformans</i>	Piebler, 2013
Asthme fongique	Souris	Sécrétion d'IL-33 en réponse à <i>Alternaria alternata</i> , induisant la production d'IL-5 et d'IL-13 au niveau de cellules lymphoïdes innées conduisant à une éosinophilie importante	Bartemes, 2012
	Souris	Prolifération des cellules auxiliaires naturelles et production d'amphiréguline dépendantes de STAT-6, activation de la voie du récepteur de l'EGF et induction d'une réponse Th2 dans l'épithélium bronchique en réponse à <i>A. alternata</i>	Doherty, 2012
	Souris	Potentialisation des effets d'un traitement par le CpG par le blocage de ST2 après sensibilisation avec <i>Aspergillus fumigatus</i> et infection avec des conidies aspergillaires	Ramaprakash, 2011

4. Helminthes

La réponse immunitaire permettant le contrôle de l'infection par des helminthes parasites requière la mise en place d'une réponse polarisée de type Th2 impliquant l'IL-33 (Tableau 7).

Dans un modèle murin de granulomes pulmonaires induit par les œufs de *Schistosoma mansoni*, la déficience en ST2 réprime la production de l'IL-4 et de l'IL-5, ainsi que la formation de granulomes efficaces caractérisée par l'infiltration de polynucléaires éosinophiles (Townsend et al., 2000). Ces données suggèrent un rôle pour l'IL-33 dans la mise en place d'une immunité Th2 propice au contrôle de l'infection. Ce résultat est conforté par des dosages sériques chez des patients atteints de bilharziose sino-japonaise aiguë, révélant un niveau d'IL-33 plus élevé que chez des sujets sains et corrélé au nombre d'éosinophiles ainsi qu'à la durée de la maladie (Chen et al., 2012b).

Suite à une invasion par *Nippostrongylus brasiliensis*, l'IL-33 est surexprimée chez la souris par l'épithélium pulmonaire, les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques inflammatoires, de façon dépendante du trefoil factor 2 (Wills-Karp et al., 2012). Cela induit la sécrétion d'IL-13 par les nuocytes, induisant ainsi une hyper-réactivité des voies aériennes. L'IL-33 joue donc un rôle délétère favorisant directement la mise en place d'une réponse allergique dans ce modèle (Barlow et al., 2012). Tout comme *N. brasiliensis*, *Strongyloides venezuelensis* (ou l'administration intra-nasale de chitine mimant l'invasion parasitaire) augmente le niveau d'IL-33 au niveau des cellules épithéliales alvéolaires. L'IL-33 induit alors l'accumulation dans les poumons de cellules naturelles auxiliaires et la production d'IL-5 et d'IL-13, aboutissant à une éosinophilie susceptible de participer aux défenses anti-parasitaires (Yasuda et al., 2012).

Au niveau du foie, de la rate, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques mésentériques, des cellules lymphoïdes innées Th2 prolifèrent en réponse à l'IL-25 et l'IL-33, dès l'invasion par *N. brasiliensis* in vivo. Elles constituent la source majoritaire d'IL-13, qui induit alors l'expression de la resistin-like beta (RELMβ) et le recrutement des éosinophiles participant à l'élimination des vers (Neill et al., 2010; Price et al., 2010; Hung et al., 2013). Le défaut d'IL-13 et la persistance des vers chez des souris déficientes en IL-33 confirme son rôle pivot dans l'induction d'une immunité protectrice dépendante des cellules lymphoïdes naturelles (Hung et al., 2013). Des cellules lymphoïdes innées ST2⁺ similaires ont très récemment été décrites dans un nouveau type de tissu lymphoïde secondaire associé au tissu adipeux dans la cavité péritonéale, les Fat-Associated Lymphoid Clusters, ou FALC. En réponse à l'invasion par *N. brasiliensis*, elles produisent de hauts niveaux d'IL-5, d'IL-6 et d'IL-13, qui favorisent l'auto-renouvellement des lymphocytes B1, augmentent la production d'IgA et favorisent l'hyperplasie des cellules caliciformes propice à l'expulsion des vers intestinaux (Moro et al., 2010). Au cours d'une invasion par *Heligmosomoides*

polygyrus bakeri ou *Trichuris muris*, les mastocytes ont été décrits comme des régulateurs de l'expression de l'IL-25 et de l'IL-33. Ces cellules pourraient donc jouer un rôle critique pour la mise en place d'une immunité muqueuse spécifique dépendante de l'IL-33, comme décrit dans le cas de la grippe (Kayamuro et al., 2010; Hepworth et al., 2012). L'IL-33 est aussi rapidement exprimée au niveau des intestins envahis par *Trichuris muris* et prévient une polarisation Th1 spécifique au profit d'une réponse Th2 partiellement dépendante des cellules T et caractérisée par la production d'IL-4, IL-9 et IL-13 chez la souris. L'IL-33 joue donc un rôle majeur dans l'initiation d'une immunité intestinale anti-parasitaire, comme en témoigne la capacité d'un traitement à l'IL-33 à favoriser l'expulsion de *T. muris* chez des souris sensibles (Humphreys et al., 2008). De la même manière, l'IL-33 est constitutivement exprimée dans le cytoplasme des cellules épithéliales intestinales et participe à la mise en place d'une immunité Th2 dépendante des mastocytes via l'activation de la voie ST2/Myd88 en réponse à une invasion par *Trichinella spiralis*. Par ailleurs, suite à l'invasion des cellules épithéliales, l'IL-33 se concentre au niveau du noyau des cellules épithéliales intestinales voisines non envahies, par un mécanisme inné indépendant de ST2 et MyD88, suggérant un rôle nucléaire de séquestration moléculaire ou de régulation de l'expression génique de l'IL-33 à ce niveau (Scalfone et al., 2013).

Au niveau des muscles squelettiques où *T. spiralis* achève son cycle, la charge parasitaire accrue chez les souris ST2^{-/-} suggère que l'IL-33 pourrait réprimer l'invasion extra-intestinale, notamment par la promotion d'une réponse immune Th2 au niveau des ganglions drainant les muscles (Scalfone et al., 2013).

Enfin, IL-33 et ST2 sont surexprimés au niveau du cerveau durant une invasion par *Angiostrongylus cantonensis* chez la souris. Dans ce modèle, les splénocytes et les cellules cérébrales mononucléées répondent à l'IL-33 par la production d'IL-5 et d'IL-13 susceptibles de contribuer à la méningite éosinophilique induite par *A. cantonensis* (Peng et al., 2013).

L'axe IL-33/ST2 semble donc induit dans un grand nombre de tissus où il orchestre la mise en place et le maintien d'une immunité de type Th2 facilitant l'expulsion bénéfique des helminthes ou contribuant à l'inverse au développement d'une immunité exacerbée inappropriée.

Tableau 7 : Place de l'axe IL-33/ST2 au cours des maladies dues aux helminthes. D'après les données de la littérature.

Pathogènes	Espèce	Résultats principaux	Références
Schistosoma	Souris	Répression de la production d'IL-4 et d'IL-5 et de la formation des granulomes pulmonaires chez des souris ST2 ^{-/-} exposées à des œufs de <i>S. mansoni</i>	Townsend, 2000
	Homme	Niveau d'IL-33 sérique élevé et corrélé au nombre d'éosinophiles et à la durée de la maladie chez des patients atteints de bilharziose sino-japonaise aiguë	Chen, 2012b
Nippostrongylus brasiliensis	Souris	IL-33 surexprimée de façon dépendante du trefoil factor 2 dans les poumons en présence de <i>N. brasiliensis</i>	Wills-Karp, 2012
	Souris	Induction de la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 dépendante de l'IL-33 au niveau des nuocytes en réponse à <i>N. brasiliensis</i>	Neill, 2010 Barlow, 2012
	Souris	Défaut de production d'IL-13 par les cellules lymphoïdes innées de type 2 chez les souris IL-33 ^{-/-} limitant ainsi l'élimination de <i>N. brasiliensis</i> , sans affecter les réponses dépendantes de l'IL-4	Hung, 2013
	Souris	Cellules lymphoïdes innées ST2 ⁺ présentes dans les Fat-Associated Lymphoid Clusters de la cavité péritonéale, et participant à l'expulsion de <i>N. brasiliensis</i> par la production d'IL-5, d'IL-6 et de l'IL-13.	Moro, 2010
Strongyloides venezuelensis	Souris	Induction de la production d'IL-5 et d'IL-13 par les cellules naturelles auxiliaires en réponse à l'IL-33 produite par les cellules épithéliales alvéolaires après invasion par <i>S. venezuelensis</i> , aboutissant à une éosinophilie	Yasuda, 2012
Angiostrongylus cantonensis	Souris	Surexpression d'IL-33 et de ST2 dans le cerveau en réponse à <i>A. cantonensis</i> , et production d'IL-5 et d'IL-13 par les splénocytes et cellules cérébrales mononuclées en réponse à l'IL-33	Peng, 2013
Trichuris muris	Souris	Régulation de l'expression d'IL-25 et d'IL-33 par les mastocytes au cours d'une invasion par <i>H. polygyrus bakeri</i> ou <i>Trichuris muris</i>	Hepworth, 2012
	Souris	Expression d'IL-33 au niveau des intestins envahis par <i>T. muris</i> et induction en conséquence de la production d'IL-4, d'IL-9 et d'IL-13 chez la souris	Humphreys, 2008
Trichinella spiralis	Souris	IL-33 présente dans le cytoplasme des cellules épithéliales intestinales après invasion par <i>T. spiralis</i> et induisant via ST2 une réponse Th2 dépendante des mastocytes, mais concentration de l'IL-33 dans le noyau des cellules non envahies indépendamment de ST2	Scalfone, 2013

5. Protozoaires

Peu d'études concernent le rôle de l'axe IL-33/ST2 au cours de maladies dues à des protozoaires parasites. Elles concernent le paludisme, la toxoplasmose et la leishmaniose cutanée (Tableau 8).

Au cours du paludisme, les niveaux d'IL-33 sont significativement plus élevés dans le plasma d'enfants atteints de paludisme sévère ou sans complication, comparés à des enfants non infectés par *Plasmodium falciparum*. Ils corrélaient positivement avec la charge parasitaire et diminuent fortement avec la clairance parasitaire. La séquestration des érythrocytes infectés ou la libération des mérozoïtes pourrait donc amplifier la production d'IL-33 au niveau des cellules endothéliales, contribuant ainsi potentiellement à la pathogenèse du paludisme (Ayimba et al., 2011).

La toxoplasmose est également une protozoose avec une régulation fine des équilibres cytokiniques et chimiokines, impliquant une balance délicate entre une réponse Th1 nécessaire au contrôle de la prolifération parasitaire et une réponse Th2 régulatrice prévenant la pathologie induite par une réponse Th1 exacerbée. ST2 a été décrit comme surexprimé dans le cerveau de souris infectées par *Toxoplasma gondii*. La déficience en ST2 induit une susceptibilité accrue à l'infection cérébrale caractérisée par une charge parasitaire accrue et une encéphalite plus marquée, associée à des niveaux accrus d'iNOS, de TNF- α et d'IFN- γ . L'IL-33 pourrait donc jouer un rôle régulateur de la balance Th1/Th2 dans ce modèle (Jones et al., 2010).

La résolution de l'infection cutanée par *Leishmania major* requiert la mise en place d'une réponse Th1 tandis qu'une réponse Th2 soutenue est responsable d'une sensibilité accrue. Chez des souris BALB/c, l'infection par *L. major* induit la différenciation des lymphocytes T auxiliaires en deux sous-populations de lymphocytes Th2 effecteurs dans les organes lymphoïdes distingués par l'expression de ST2. Les lymphocytes T CD4⁺ ST2⁺ secrètent l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-5 tandis que les lymphocytes T CD4⁺ ST2⁻ expriment l'IL-4, l'IL-10 mais sont dépourvus d'IL-5 (Kropf et al., 2002b). Les lymphocytes Th2 ST2⁺ sont peu fréquents dans les organes lymphoïdes mais sont enrichis au niveau des lésions ulcérales cutanées chroniques concentrant les parasites chez les souris BALB/c (Kropf et al., 2002a). Le blocage du récepteur ST2 par un anticorps bloquant ou une protéine de fusion ST2-Fc n'altère pas la production de cytokines Th2, mais améliore la capacité des lymphocytes T CD4⁺ à produire de l'IFN- γ en réponse à l'IL-12. L'IL-33 ne semble donc pas associée à l'induction des cytokines Th2 par les lymphocytes au cours de la leishmaniose cutanée, mais elle réprime la réponse Th1 essentielle à un contrôle efficace de l'infection (Kropf et al., 2003).

L'IL-33 semble donc participer la régulation de la balance Th1/Th2 au cours d'infections par des protozoaires parasites. Son rôle au cours de la réponse immunitaire hépatique ou splénique, au niveau de la régulation de la balance Th1/Th2 importante au cours de la leishmaniose viscérale et/ou en tant qu'alarmine, n'est pas documenté à ce jour.

Tableau 8 : Place de l'axe IL-33/ST2 au cours des maladies dues à des protozoaires. D'après les données de la littérature.

Pathogènes	Espèces	Résultats principaux	Références
Plasmodium	Homme	Niveaux d'IL-33 plus élevés dans le plasma d'enfants atteints de paludisme comparés à des enfants non infectés par <i>P. falciparum</i> et corrélés avec la charge parasitaire	Ayimba, 2011
Toxoplasma gondii	Souris	Susceptibilité accrue à l'infection cérébrale par <i>T. gondii</i> chez les souris ST2 ^{-/-} , associée à des niveaux accrus d'iNOS, de TNF- α et d'IFN- γ	Jones, 2010
Leishmania major	Souris	Lymphocytes Th2 ST2 ⁺ exprimant IL-4, IL-10 et IL-5 enrichis dans les lésions cutanées chroniques concentrant les parasites	Kropf, 2002a et 2002b
	Souris	Réponse Th1 accrue sans altération de la réponse Th2 suite au blocage de ST2 par un anticorps bloquant ou une protéine de fusion ST2-Fc	Kropf, 2003

Objectifs

Objectifs

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier le rôle de l'IL-33 dans la régulation de la réponse immune hépatique au cours de la leishmaniose viscérale. Ce travail a comporté plusieurs étapes successives en faisant varier les modèles d'étude employés, depuis l'Homme jusqu'à la souris, avec des approches expérimentales *in vitro* et *in vivo*.

Afin de valider dans un premier temps l'hypothèse d'un rôle de l'IL-33 dans la leishmaniose humaine, les taux circulants d'IL-33 ont été mesurés dans le sérum de patients atteints de leishmaniose viscérale et comparés à des sujets témoins. De plus, des marquages par immunohistochimie réalisés sur ponction-biopsie hépatique d'un patient hospitalisé au CHU de Rennes pour une leishmaniose viscérale ont permis d'objectiver la détection d'IL-33 dans le tissu hépatique.

L'expression d'IL-33 ayant été préalablement décrite dans l'équipe au niveau des cellules étoilées hépatiques activées responsables de la fibrose hépatique chez l'Homme et la souris, un modèle de cellules étoilées hépatiques humaines exposées à *L. donovani* en culture primaire a alors été développé. La permissivité potentielle de ces cellules à *L. donovani* a été étudiée, ainsi que leur niveau d'expression d'IL-33 après une exposition aux parasites. L'activation des cellules étoilées du foie et leur phénotype pro-fibrosant et pro-inflammatoire ont également été étudiés après exposition aux parasites, afin d'explorer la possibilité d'un rôle direct des leishmanies sur l'induction de la fibrose observée chez certains patients.

Afin de prendre en considération l'ensemble du micro-environnement hépatique plutôt qu'un type cellulaire isolé, différents modèles murins ont été développés après infection par *L. donovani*, sur des fonds génétiques C57BL/6 et BALB/c caractérisés par une susceptibilité différente à l'infection leishmanienne. L'expression d'IL-33 et de son récepteur ST2 a tout d'abord été caractérisée chez des souris C57BL/6 et BALB/c sauvages infectées par *L. donovani* *in vivo*, par la mesure des taux circulants d'IL-33 et l'étude de l'expression hépatique d'IL-33 et de ST2 par différents outils. La possibilité de disposer de souris BALB/c déficientes en ST2 a ensuite permis d'évaluer les différences d'expression de cytokines et chimiokines dans le foie entre les souris sauvages et déficientes infectées par *L. donovani*, ainsi que leurs conséquences sur le recrutement de cellules participant à la réponse granulomateuse. Un modèle de souris BALB/c sauvages traitées par de l'IL-33 recombinante murine a été développé en parallèle pour analyser l'effet d'un surdosage en IL-33. Enfin, des travaux ont été entrepris sur fond génétique C57BL/6, déficient en IL-33 ou traité par de l'IL-33 recombinante murine, afin d'évaluer un éventuel impact de l'environnement immunitaire inhérent au fond génétique sur l'expression d'IL-33 et son action au cours de la réponse immune hépatique contre *L. donovani*.

Résultats

Partie I : Étude de l'expression hépatique et de la sécrétion systémique d'IL-33 au cours de la leishmaniose viscérale humaine

I. Contexte

L'IL-33 joue un rôle régulateur de l'immunité innée et adaptative, associé à une polarisation de type Th2 (Miller et al., 2008). Le rôle de son récepteur ST2 a été documenté au cours de la leishmaniose cutanée à *L. major* (Kropf et al., 2003) et au cours de diverses pathologies du foie, incluant la fibrose hépatique toxique ou induite par les virus de l'hépatite B ou C (Marvie et al., 2010; Wang et al., 2012a; Wang et al., 2012b). Comme la fibrose hépatique est couramment observée chez les patients atteints de leishmaniose viscérale (Duarte et Corbett, 1987), l'objectif de ce travail était de valider l'hypothèse d'un rôle de l'IL-33 au cours de la leishmaniose viscérale humaine, par le dosage des niveaux circulants d'IL-33 et l'étude de son expression hépatique.

II. Matériel et méthodes

1. Sérums

Le sérum de 21 donneurs sains et de 6 patients atteints de leishmaniose viscérale a été collecté avant traitement anti-parasitaire. L'IL-33 a été quantifiée à l'aide d'un kit de détection spécifique (Duoset ELISA[®], R&D Systems, Minneapolis, USA).

2. Biopsie

Un marquage d'IL-33 a pu être réalisé par immuno-histochimie sur une biopsie de foie réalisée durant le diagnostic d'un cas de leishmaniose viscérale au CHU Pontchaillou. Il s'agit d'un patient âgé de 74 ans présentant une leishmaniose viscérale symptomatique, probablement acquise en Espagne (vacances régulières dans le sud de l'Espagne). Le marquage a été réalisé avec l'anticorps monoclonal de souris Nessler-1 (Enzo Life Sciences, Lausen, Suisse), révélé à l'aide du kit de détection Ventana DABMap (Ventana Medical Systems, Tucson, USA) et contre-coloré à l'hémalum.

III. Résultats

L'IL-33 a été détectée à des niveaux plus élevés dans le sérum des patients comparés aux sujets sains, avec une différence statistiquement significative ($p=0.0105$) (Figure 24A). Au niveau du foie, le marquage immuno-histochimique de la biopsie hépatique disponible a révélé une charge parasitaire très élevée, associée à un nombre important de cellules infiltrantes IL-33⁺, ainsi que des cellules endothéliales IL-33⁺ (Figure 24B-C).

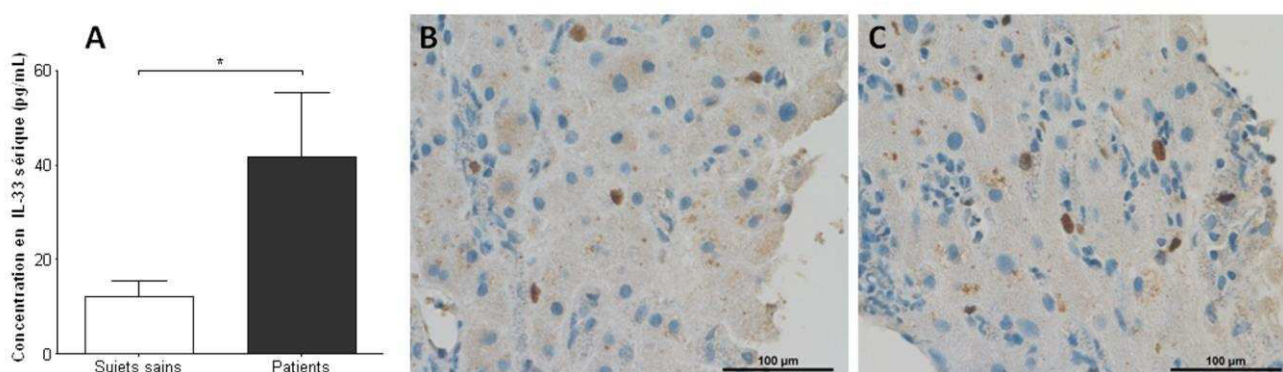


Figure 24 : Dosage d'IL-33 sérique et expression hépatique d'IL-33 au cours de la leishmaniose viscérale humaine. Dosage de l'IL-33 sérique par ELISA chez 6 patients et 21 sujets sains (A). Marquage de cellules IL-33⁺ par immuno-histochimie sur une biopsie hépatique (B-C). D'après Rostan et al., soumis.

IV. Discussion

L'IL-33 semble être un biomarqueur reflétant la sévérité de la maladie, ou un marqueur de la défense de l'hôte contre les leishmanies, suggérant un rôle pour cette cytokine dans la régulation de la réponse immunitaire au cours de la leishmaniose viscérale. La variabilité importante des niveaux sériques d'IL-33 chez les patients (SEM=13,50) comparés aux donneurs sains (SEM=3,227) suggère une sécrétion variable d'IL-33, possiblement dépendante de l'importance des dommages tissulaires induits par la maladie, du fond génétique des patients, de leur statut immunologique et d'éventuelles autres maladies associées. Des études complémentaires sont donc requises sur une cohorte plus importante de patients présentant différents facteurs de risques, présentant ou non une fibrose hépatique, avant et après traitement, afin d'étudier la place de l'IL-33 comme marqueur potentiel de la leishmaniose viscérale, comme proposé dans d'autres maladies (Ayimba et al., 2011;

Wang et al., 2012a; Wang et al., 2012b). Cependant, les difficultés à travailler chez l'Homme nous conduisent à proposer plusieurs modèles expérimentaux afin d'analyser plus finement la place de l'IL-33 au cours de la leishmaniose viscérale.

➔ **Article 1** : IL-33/ST2 axis is associated with human visceral leishmaniasis and suppresses Th1 responses in the liver of BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. Rostan et al., soumis.

Partie II : Etude de l'expression d'IL-33 dans les cellules étoilées hépatiques infectées par *Leishmania donovani*

I. Contexte

Des travaux antérieurs de l'équipe ont démontré que l'expression d'IL-33 est corrélée avec la sévérité de la fibrose chez des patients atteints d'hépatite chronique de différentes étiologies. Elle est induite au niveau des cellules étoilées du foie responsables du développement de la fibrose après leur activation dans un contexte inflammatoire en réponse à des agressions hépatiques (Marvie et al., 2010). L'objectif de notre travail était de modéliser l'infection par *Leishmania* de cellules étoilées humaines en culture primaire, afin d'étudier (1) leur permissivité à l'espèce viscérotrope *L. donovani* et (2) l'expression d'IL-33 par ces cellules en réponse à l'exposition au parasite, qu'il soit internalisé ou non. Ce travail a fait l'objet d'une publication internationale publiée dans la revue *Parasitology* jointe ci-après. Voici un rappel synthétique des matériels et méthodes, des résultats les plus marquants, et des principaux points de discussion.

II. Matériel et méthodes

Les cellules étoilées humaines ont été purifiées à partir de fragments de foie sains, transmis par le Centre de Ressources Biologiques de Rennes, provenant de résections hépatiques réalisées afin de détecter d'éventuelles métastases hépatiques chez des patients. La purification a été réalisée à l'aide d'un gradient de Nycodenz (Sigma-Aldrich®) grâce aux propriétés particulières des cellules étoilées quiescentes riches en vitamine A. La mise en culture des cellules étoilées et le contact avec le plastique conduit en quelques jours à leur activation spontanée, associée à l'acquisition d'un phénotype myofibroblastique pro-inflammatoire et pro-fibrosant, notamment caractérisé par l'expression d'actine- α des muscles lisses, dont le marquage a permis de contrôler la pureté des cultures. Le jour suivant leur purification ou leur repiquage, les cellules étoilées ont été exposées à des promastigotes de *L. donovani*. Les parasites libres ont été éliminés par des lavages du surnageant de culture après une nuit et les cellules ont été maintenues ensuite dans leurs conditions habituelles de culture (milieu DMEM 0,1g/L de glucose 10% SVF à 37°C et 5% CO₂). Des colorations au May-Grünwald Giemsa (MGG) observées en microscopie optique ont permis de dénombrer les leishmanies. Des marquages fluorescents observés en microscopie confocale dans un

plan focal de 200 μm ont été réalisées sur la plateforme IBSA MRic-Photonics (SFR Biosit UMS 3480 - U018), afin de confirmer la localisation intra-cellulaire des leishmanies. Des PCR quantitatives ont été réalisées à différents temps après exposition aux parasites afin d'étudier l'expression de l'IL-33, ainsi que d'autres gènes pro-fibrosants et pro-inflammatoires. Des tests de viabilité et de croissance cellulaire ont été réalisés. Après 40 jours de culture, les cellules étoilées exposées au parasite ont été centrifugées et transférées en milieu NNN afin d'évaluer la survie des parasites intracellulaires.

III. Résultats

1. Les cellules étoilées du foie sont permissives à *L. donovani*

Des colorations au MGG ont permis de révéler la présence de leishmanies dans les cellules étoilées activées dès le premier jour après exposition aux parasites (Figure 25A). La présence de parasites spécifiquement marqués par une pré-incubation au PKH-26 et co-marqués par le DRAQ5 nucléaire dans un plan focal de 200 μm a permis de confirmer la permissivité des cellules étoilées activées à *L. donovani* en microscopie confocale (Figure 25B). Le pourcentage d'infection proche de 5 % n'a pas évolué les jours suivant l'infection, de même que le nombre moyen de parasites par cellule (environ 2), suggérant que les leishmanies ne se multiplient pas au sein des cellules étoilées hépatiques en culture primaire. Les cellules étoilées fraîchement purifiées et présentant encore des caractéristiques de cellules quiescentes ont également été observées comme permissives à *L. donovani*. De plus, la présence de leishmanies intracellulaires n'altère pas leur capacité à s'activer et acquérir un phénotype myofibroblastique.

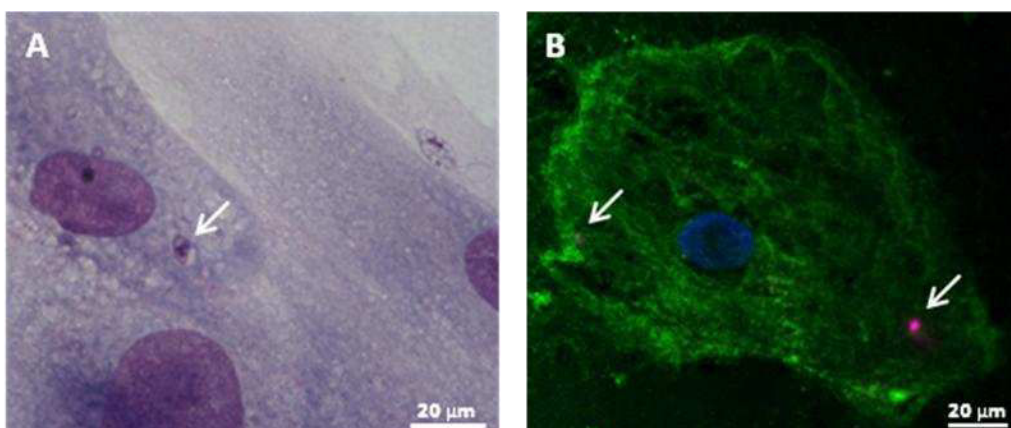


Figure 25 : Permissivité des cellules étoilées activées à *L. donovani*. Les parasites intracellulaires (pointés par des flèches) ont été détectés en microscopie optique après coloration au MGG (A) ou en microscopie confocale après marquage des parasites au PKH-26 (rouge), des noyaux au DRAQ5 (bleu) et des cellules au WGA-Alexa488 (vert) (B). D'après Rostan et al., 2013.

2. Les parasites intracellulaires n'affectent pas les propriétés fonctionnelles des cellules étoilées du foie

Les tests de viabilité au bleu de méthylène réalisés 7 jours après exposition à *L. donovani* avec 5, 10 ou 20 parasites par cellule n'ont pas mis de mortalité cellulaire en évidence (Figure 26A), de même qu'à des temps plus précoces (J1, J3). Les cellules étoilées du foie sont donc capables de survivre après des contacts cellulaires avec *L. donovani* voire une infection. Des cellules exposées durant une nuit aux promastigotes de *L. donovani* ont également été maintenues en culture pendant 40 jours et ont été dénombrées à chaque repiquage tous les dix jours. Aucune différence de croissance cellulaire n'a été observée entre les cultures exposées ou non aux parasites cultivées dans les mêmes conditions (Figure 26B).

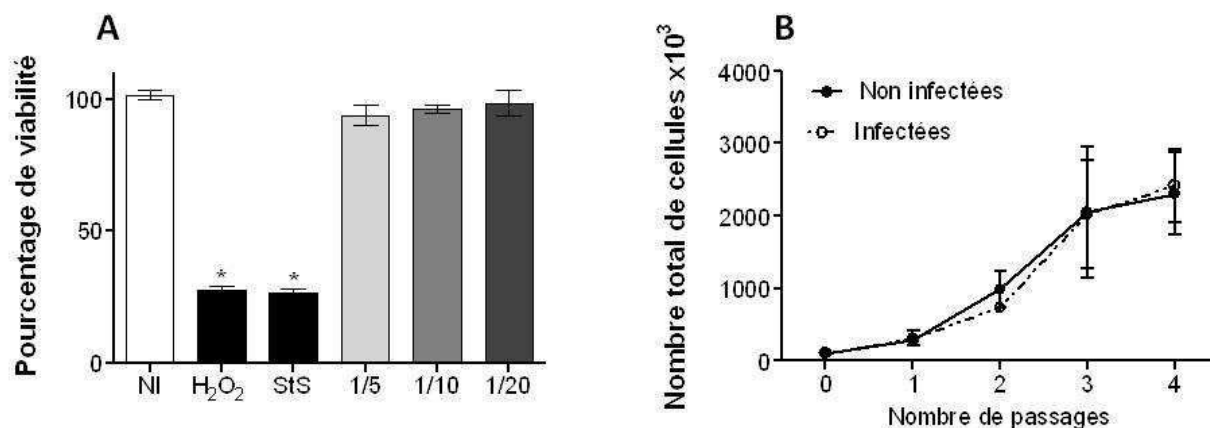


Figure 26 : Viabilité et croissance des cellules étoilées activées exposées à *L. donovani*. La viabilité des cellules étoilées exposées une nuit à différents ratios cellules/parasites (1/5, 1/10, 1/20) a été quantifiée par un test au bleu de méthylène en comparaison avec des cellules non infectées (NI) après 7 jours (A). Des cultures de cellules étoilées infectées ont été maintenues durant 40 jours en parallèle à des cultures non infectées, et dénombrées à chaque repiquage afin de tracer leur courbe de croissance (B). D'après Rostan et al., 2013.

Lorsqu'elles s'activent après leur mise en culture, les cellules étoilées du foie acquièrent un phénotype myofibroblastique et induisent l'expression de hauts niveaux d'IL-33 en comparaison avec des cellules quiescentes (Marvie et al., 2010). Dans nos travaux, les cellules étoilées activées myofibroblastiques présentaient un niveau d'expression d'IL-33 en PCR quantitative environ 400 fois plus élevé que les cellules quiescentes (non montré). Des PCR quantitatives ont permis de démontrer que l'exposition à *L. donovani* n'altère pas ce niveau d'IL-33 élevé dans les cellules étoilées activées (Figure 27).

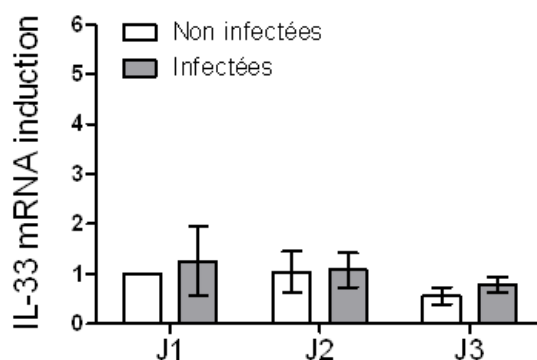


Figure 27 : Expression d'IL-33 par les cellules étoilées activées exposées à *L. donovani*. Les cultures cellulaires exposées ou non durant une nuit à *L. donovani* ont été arrêtées après 1, 2 ou 3 jours (J1, J2, J3). Détection du niveau d'IL-33 par PCR quantitative, normalisée par rapport à l'expression de l'ARN 18S et comparé aux cellules non infectées à J1.

Aucune influence de l'exposition aux parasites n'a été observée sur l'expression de gènes classiquement associés à l'activation des cellules étoilées et à la fibrose (IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β , MMP-2 et TIMP-1), suggérant que les contacts cellulaires, voire l'infection par *L. donovani* ne modifient pas les propriétés pro-inflammatoires et pro-fibrosantes des cellules étoilées activées.

3. Les cellules étoilées du foie n'affectent pas la survie et la capacité d'infection de *L. donovani*

Afin de déterminer l'impact des cellules étoilées sur les parasites qui les infectent, les cultures provenant de 3 patients différents exposées à *L. donovani* puis cultivées durant 40 jours ont été transférées en milieu NNN. Ceci a permis l'obtention de nouveaux promastigotes mobiles pour 2 cultures sur 3, après 2 semaines. Les cellules étoilées n'affectent donc pas la survie des leishmanies intracellulaires, ce qui peut s'expliquer par un niveau de iNOS deux fois plus bas en PCR quantitative dans ces cellules comparées à des cellules THP-1 (non montré). Les promastigotes collectés à partir des cellules étoilées infectées ont été amplifiés en milieu Schneider's *Drosophila* et utilisés pour infecter des cellules THP-1. Les pourcentages d'infection présentés dans la publication étaient similaires à ceux obtenus avec des promastigotes contrôles, indiquant que les cellules étoilées du foie n'affectent pas la capacité des leishmanies intracellulaires à infecter de nouvelles cellules naïves.

IV. Discussion

Les cellules étoilées du foie en culture primaire ont été observées pour la première fois comme permissives à *L. donovani*, avec un taux d'infection bas et un nombre moyen de parasites par cellule faible et stable dans les conditions de l'expérience. Des études antérieures ont démontré qu'elles sont capables d'exprimer des marqueurs membranaires caractéristiques des cellules présentatrices d'antigènes et qu'elles sont capables de phagocyter des billes de latex *in vitro* et de stimuler la prolifération lymphocytaire (Vinas et al., 2003; Muhanna et al., 2007). Elles pourraient donc agir comme des phagocytes pour les leishmanies de la même manière que des cellules phagocytaires spécialistes.

Lorsqu'elles s'activent, les cellules étoilées du foie induisent de nombreux gènes pro-fibrosants et pro-inflammatoires (Friedman, 2008), incluant l'IL-33 (Marvie et al., 2010). Comme attendu, la mise en culture des cellules étoilées et leur activation corollaire a induit l'expression d'IL-33. L'exposition à *L. donovani* n'a ni empêché ni favorisé son induction au cours de l'activation des

cellules fraîchement purifiées et n'a pas modifié l'expression d'IL-33 au niveau des cellules activées. Ainsi, *L. donovani* ne semble pas directement induire l'expression d'IL-33. En outre, l'exposition des cellules étoilées à *L. donovani* n'a pas modifié plusieurs de leurs fonctionnalités : leur capacité à s'activer, leur survie et leur prolifération, ainsi que leur niveau d'expression de gènes clés associés à l'inflammation chronique et la fibrose. *L. donovani* n'induit donc pas directement l'acquisition du phénotype fibrogénique des cellules étoilées et ne stimule pas non plus indirectement la production de matrice extracellulaire et la fibrose en favorisant leur prolifération. La fibrogénèse observée chez certains patients au cours de la leishmaniose viscérale (Duarte et Corbett, 1987) résulterait donc plus volontiers d'interactions cellulaires ou d'activations paracrines et/ou cytokiniques, notamment via le TGF- β produit par les cellules de Kupffer activées (Duarte et al., 2009).

La survie durable des cellules étoilées infectées sans éradication des parasites et sans perturbation de leurs propriétés fonctionnelles, suggère qu'elles pourraient être des cellules sanctuaires pour *L. donovani*. Les cellules sanctuaires correspondent en effet à des cellules cibles immuno-privilegiées et dépourvues de mécanismes leishmanicides pouvant expliquer la persistance des parasites dans l'organisme (Bogdan, 2008). Au cours de la leishmaniose cutanée, les fibroblastes cutanés et ganglionnaires ont été décrits comme des cellules sanctuaires associés à la persistance de *L. major* in vivo (Bogdan et al., 2000a). Les cellules étoilées hépatiques capables de phagocyter les leishmanies viscérotropes pourraient donc se comporter de la même manière dans le foie. Ceci pourrait correspondre à un mécanisme d'échappement pouvant contribuer au portage asymptomatique des leishmanies et à l'apparition de rechutes après un traitement anti-parasitaire efficace. L'hypertrophie des cellules étoilées associées à la fibrose chez certains patients atteints de leishmaniose viscérale (Duarte et al., 2009) pourrait amplifier ce phénomène.

Dans la mesure où l'IL-33 est fortement exprimée par les cellules étoilées activées, elle pourrait participer à la régulation de la réponse immunitaire hépatique, notamment dans les cas de leishmaniose viscérale sévère présentant des lésions fibreuses associées à une hypertrophie des cellules étoilées activées. L'IL-33 n'a pas pu être détectée dans le surnageant des cultures primaires infectées par *L. donovani* (non montré), suggérant que les leishmanies n'induisent pas directement la sécrétion d'IL-33 par les cellules étoilées l'exprimant. Cependant, sa sécrétion pourrait être indirectement induite par les cytokines pro-inflammatoires produites par d'autres types cellulaires dans le foie au cours de la leishmaniose viscérale, comme observé dans le cas des hépatites chroniques (Marvie et al., 2010).

➔ **Article 2 :** Human hepatic stellate cells in primary culture are safe targets for *Leishmania donovani*. Rostan et al., *Parasitology*, 2013.

Partie III : Étude de l'expression d'IL-33 au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale chez la souris C57BL/6

I. Contexte

Dans nos premiers résultats, nous avons observé que l'IL-33 était détectable dans le foie d'un patient atteint de leishmaniose viscérale présentant un infiltrat cellulaire important (Rostan et al., soumis). Afin de développer un modèle expérimental permettant d'appréhender son rôle au cours de la leishmaniose viscérale, son expression a été recherchée dans le foie sur un modèle de souris C57BL/6 infectées par *L. donovani*. Ces souris sont caractérisées par la mise en place d'une réponse granulomateuse hépatique associée à un infiltrat cellulaire important, permettant in fine le contrôle de l'infection (Kaye et al., 2004).

II. Matériel et méthodes

Des souris C57BL/6 ont été infectées avec 10^8 promastigotes de *L. donovani* en phase stationnaire par voie intra-péritonéale, puis sacrifiées après 15, 30 ou 60 jours. Le sang des souris a été prélevé par ponction rétro-orbitale en vue d'un dosage de l'IL-33 par ELISA (Duoset ELISA[®], R&D Systems, Minneapolis, USA). Le foie des souris a également été prélevé. Les charges parasitaires hépatiques ont été quantifiées sur des appositions de foie colorées au MGG et exprimées en Leishman Donovan Units (LDU), d'après la formule suivante : $LDU = \text{nombre d'amastigotes pour } 1000 \text{ noyaux cellulaires} \times \text{poids du foie en grammes}$. Le nombre de granulomes hépatiques a été dénombré sur des coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine-safran (HES). L'IL-33 a été marquée sur cryo-coupes hépatiques ou coupes histologiques, à l'aide d'un anticorps de chèvre spécifiquement dirigé contre l'IL-33 murine commercialisé par R&D Systems et révélé par un anticorps secondaire couplé au Cy5. Des co-marquages avec des anticorps ciblant différents marqueurs de différenciation cellulaire couplés au Cy3 ont été réalisés. Des PCR quantitatives ont été réalisées sur des lysats de foie et ont permis de quantifier l'expression d'IL-33, de son récepteur ST2 et de cytokines classiquement associées à la mise en place des granulomes, normalisée par rapport à l'expression de l'ARN 18S et évaluée par rapport à des souris non infectées (J0).

III. Résultats

1. L'infection des souris C57BL/6 par *L. donovani* induit des niveaux accrus d'IL-33 sérique et l'expression d'IL-33 et de son récepteur ST2 dans le foie

Un dosage par ELISA réalisé sur le sérum des souris C57BL/6 infectées par *L. donovani* a permis la détection de l'IL-33 à J15 et J30, bien que les valeurs ne diffèrent pas significativement du faible niveau détecté chez les souris non infectées. En revanche, une augmentation significative du niveau d'IL-33 est observée à J60 avec une concentration moyenne de $157,1 \pm 43,42$ pg/mL (Figure 28).

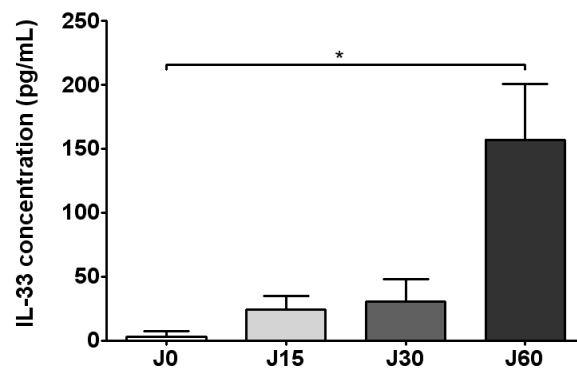


Figure 28 : Dosage d'IL-33 sérique au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale chez la souris C57BL/6. Dosage de l'IL-33 sérique par ELISA après sacrifice des souris 15, 30 ou 60 jours après infection.

Au niveau du foie, les PCR quantitatives réalisées sur les broyats hépatiques de souris C57BL/6 infectées ont permis de démontrer une induction d'environ 6 fois, de l'expression de l'IL-33 et de son récepteur ST2 à 60 jours post-infection ($p < 0,05$) (Figures 29A et B), avec une corrélation significative des niveaux d'expression hépatique d'IL-33 et ST2 au cours de la cinétique (Figure 29C).

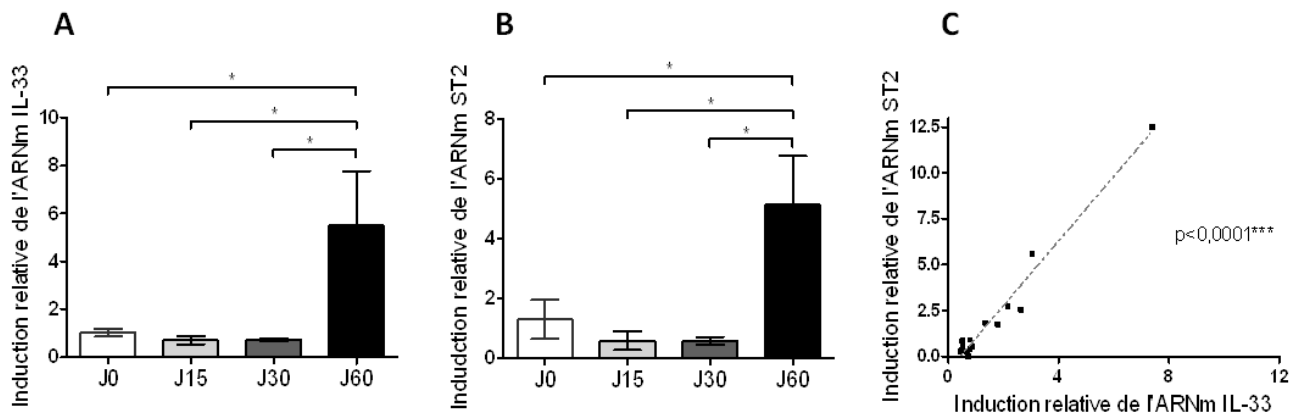


Figure 29 : Corrélation de l'expression d'IL-33 et ST2 dans le foie de souris C57BL/6 infectées par *L. donovani*. L'expression hépatique d'IL-33 (A) et ST2 (B) a été quantifiée par PCR quantitative sur les broyats des foies de 4-5 souris 15, 30 ou 60 jours post-infection. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; la significativité des inductions à J60 a été déterminée par un test de Mann et Whitney. La corrélation entre le niveau d'expression d'IL-33 et ST2 au cours de la cinétique a été confirmée par un test de Spearman (C)

Afin de déterminer la localisation tissulaire de l'IL-33 exprimée, des colorations HES ont été réalisées sur des cryocoupes hépatiques de ces souris pour un examen histopathologique. Les granulomes, caractérisés par l'accumulation de cellules immunitaires effectrices autour d'un macrophage infecté, ont été dénombrés sur ces coupes. Le croisement de ces données a montré une corrélation de Spearman très significative entre l'induction de l'IL-33 et le nombre de granulomes ($p=0,0011$), suggérant une localisation granulomateuse des cellules exprimant l'IL-33. Afin de tester cette hypothèse, des cryo-coupes hépatiques ont été réalisées pour détecter l'IL-33 par immunofluorescence. L'IL-33 a ainsi été observée dans le foie dès 15 jours post-infection et jusqu'à 60 jours, avec un nombre croissant de cellules présentant un marquage nucléaire spécifique et préférentiellement localisées dans les granulomes (Figure 30A-C).

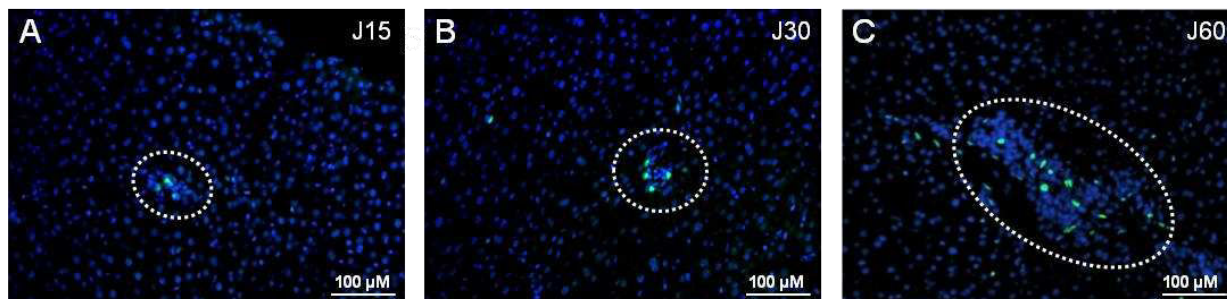


Figure 30 : Localisation préférentielle de l'IL-33 dans les granulomes hépatiques des souris C57BL/6 infectées par *L. donovani*. L'IL-33 a été marquée sur cryo-coupes hépatiques et révélée à l'aide d'un anticorps secondaire couplé au Cy5 (vert) tandis que les noyaux cellulaires ont été marqués au Hoëchst (bleu) après 15 (A), 30 (B) ou 60 jours (C).

Des co-marquages de l'IL-33 et de marqueurs de différenciations spécifiques de différents types cellulaires ont été entrepris afin de caractériser le type cellulaire exprimant l'IL-33 à 60 jours post-infection. Comme attendu, un grand nombre de cellules endothéliales, caractérisée par l'expression du marqueur CD31 révélé par le Cy3, expriment l'IL-33 (Figure 31A). Cependant, les cellules IL-33⁺ localisées dans les granulomes n'expriment ni le CD31 (Figure 31A) ni l' α -SMA (Figure 31B) et ne correspondraient donc ni à des cellules endothéliales classiques ni à des cellules étoilées hépatiques myofibroblastiques. Un marquage a été réalisé par Nathalie Ortega dans l'équipe de Jean-Philippe Girard spécialisée en IL-33 (Équipe « Biologie Vasculaire : Cellules Endothéliales, Inflammation et Cancer », Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse), avec un anticorps polyclonal MECA-79 marquant spécifiquement les cellules endothéliales cuboïdales. Ce marquage a révélé la présence d'un faible nombre de cellules cuboïdales uniquement à 60 jours post-infection, sans colocalisation avec le marquage IL-33 observé dans les granulomes (non montré).

Les cellules IL-33⁺, majoritairement localisées dans les granulomes, ne semblant pas correspondre à des cellules endothéliales, des anticorps marquant différentes populations de cellules immunitaires ont été employés en co-marquage avec l'IL-33. Aucune colocalisation n'a été observée avec le marqueur pan-leucocytaire CD45, suggérant que l'IL-33 est produite par une autre source que des leucocytes (Figure 31C). Ce résultat a été conforté par l'absence de colocalisation d'IL-33 avec des marquages de cellules décrites dans la littérature comme pouvant exprimer l'IL-33, tels que les macrophages (CD11b⁺ F4/80⁺), les cellules dendritiques (CD11c⁺) et les lymphocytes B (CD19⁺) (non montré). Une observation du marquage spécifique de l'IL-33 en microscopie confocale n'a pas permis de donner d'informations sur la structure des cellules IL-33⁺ permettant de les identifier, mais la taille, la forme et la densité du noyau de ces cellules diffère grandement de celles des hépatocytes.

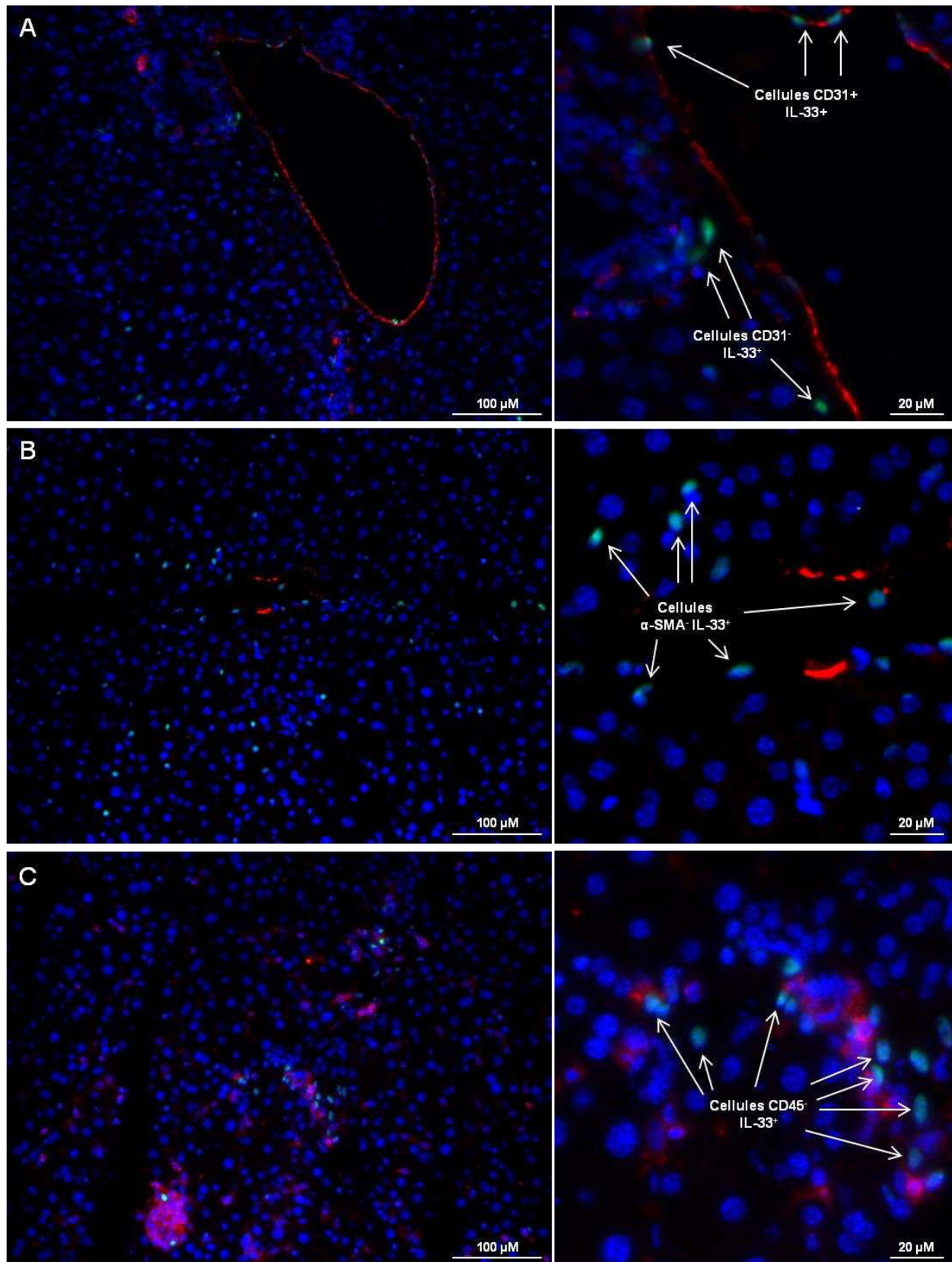


Figure 31 : Recherche des cellules exprimant l'IL-33 dans le foie des souris C57BL/6 60 jours après infection par *L. donovani*. L'IL-33 a été marquée sur cryo-coupes hépatiques et révélée à l'aide d'un anticorps secondaire couplé au Cy5 (vert), les noyaux cellulaires ont été marqués au Hoëchst (bleu) et un co-marquage a été réalisé avec des anticorps ciblant respectivement CD31 (A), l' α -SMA (B) ou CD45 (C) en rouge. Les photos ont été prises au grossissement $\times 400$; un agrandissement $\times 3$ annoté est proposé pour chaque photo.

2. L'expression hépatique d'IL-33 corrèle avec l'expression de cytokines associées à la réponse granulomateuse

Des PCR quantitatives ont permis de quantifier l'expression de cytokines Th1 et Th2 participant à la mise en place et la régulation de la réponse granulomateuse dirigée contre *L. donovani* dans le foie des souris C57BL/6. Les niveaux d'expression d'IL-12, d'IFN- γ , de TNF- α , d'IL-4 et d'IL-10 ont été montrés comme significativement corrélés aux niveaux d'expression d'IL-33 et de ST2 (Tableau 9)

Tableau 9 : Corrélations des niveaux d'expression hépatique d'IL-33 et ST2 avec les niveaux d'expression de différentes cytokines clé de la réponse granulomateuse. L'expression des différents ARNm a été quantifiée par PCR quantitative après normalisation avec le niveau de l'ARN 18S et comparaison avec les souris contrôles non infectées. Les valeurs de significativité des corrélations ont été calculées à l'aide du test de Spearman.

Induction des ARNm	IL-33		ST2	
	Valeur de p	Significativité	Valeur de p	Significativité
IFN- γ	0,0001	***	0,0008	***
IL-12	0,0014	**	0,0325	*
TNF- α	0,0001	***	0,002	**
IL-4	0,0001	***	0,0001	***
IL-10	0,0032	**	0,0039	**

IV. Discussion

Tout comme chez l'Homme, l'IL-33 est exprimée dans le foie au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale chez la souris C57BL/6, au niveau des cellules endothéliales, ainsi qu'au niveau de cellules participant à la constitution des granulomes. Son expression a été détectée en PCR quantitative à 60 jours post-infection, tandis qu'elle commence à être détectée au niveau protéique par des marquages immuno-fluorescents dès 15 jours. Ces résultats peuvent s'expliquer par une différence de sensibilité des techniques. En effet, le nombre de granulomes à J15 et J30 est faible, ce qui limite la détection des ARNm d'IL-33 dilués dans un broyat de foie total.

Le type cellulaire exprimant l'IL-33 au sein des granulomes reste inconnu après nos investigations. Il ne semble pas correspondre à des cellules endothéliales classiques ou cuboïdales, à des cellules étoilées myofibroblastiques, ni à des hépatocytes, ni à des leucocytes CD45⁺. Ce type cellulaire pourrait correspondre à des cellules immunitaires CD45⁻, à un type cellulaire plastique ayant perdu ses marqueurs classiques de différenciation, à des cellules souches indifférenciées, voire à des cellules engagées dans une voie de mort cellulaire dont les marqueurs membranaires ou cytoplasmiques pourraient être partiellement dégradés.

D'autres analyses sont donc requises afin de caractériser la source cellulaire d'IL-33 au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale. Ceci devrait permettre le développement d'études *in vitro* visant à étudier les mécanismes inducteurs de l'expression d'IL-33, ainsi que de sa sécrétion. En effet, la corrélation des niveaux d'expression hépatique d'IL-33 et de son récepteur ST2 suggère pour l'IL-33 un rôle cytokinique dépendant de la signalisation induite par ST2, ce qui implique sa sécrétion préalable par des mécanismes encore indéfinis. En outre, l'expression d'IL-33 corrélée à celle de cytokines participant à l'orchestration de la réponse granulomateuse suggère que cet axe IL-33/ST2 pourrait participer à la régulation de la réponse. En effet, cette réponse se met en place dans un environnement mixte Th1 et Th2 (Gangneux et al., 2006), de sorte que l'IL-33 pourrait, par son action cytokinique pro-Th2, induire des effets protecteurs ou délétères.

Enfin, si les souris C57BL/6 constituent un bon modèle de leishmaniose viscérale, aucune fibrose n'est détectable microscopiquement ou via des marqueurs moléculaires dans leur foie. Il serait donc intéressant de caractériser l'expression et la sécrétion de l'IL-33 chez des souris BALB/c, qui ne contrôlent pas l'infection et reflètent plus volontiers la physiopathologie de la leishmaniose viscérale chez l'Homme.

Partie IV : Etude du rôle de l'axe IL-33/ST2 au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale chez la souris BALB/c

I. Contexte

Dans nos travaux, l'expression d'IL-33 a été observée au cours de la leishmaniose viscérale humaine et a été corrélée au nombre de granulomes et à l'expression de cytokines clés de la réponse immune hépatique contre *L. donovani* chez la souris C57BL/6. L'IL-33 pourrait donc participer à la régulation de cette réponse immune. Après caractérisation de l'expression et de la sécrétion de l'IL-33 sur un fond génétique BALB/c, des souris BALB/c déficientes en ST2 obtenues auprès d'Andrew McKenzie de l'université de Cambridge, UK (Townsend et al., 2000) ainsi que des souris BALB/c traitées par de l'IL-33 recombinante ont été employées afin d'explorer cette hypothèse. Ce travail fait l'objet d'un manuscrit actuellement soumis.

II. Matériel et méthodes

Trois modèles murins ont été infectés avec 10^8 promastigotes de *L. donovani* par voie intrapéritonéale, puis sacrifiées après 15, 30 ou 60 jours (J15, J30, J60) en parallèle à des souris non infectées (J0) : des souris BALB/c sauvages (WT) non traitées (NT), des souris sauvages traitées 2 fois par semaine avec 0,5 μ g d'IL-33 recombinante (IL-33r) commerciale (Peprotech), et des souris déficientes en ST2 (ST2^{-/-}).

Chez les souris sauvages, un dosage d'IL-33 a été réalisé dans le sérum (DuoSet ELISA[®], R&D Systems, Minneapolis, USA). L'IL-33 et son récepteur ST2 ont été marqués sur coupes histologiques hépatiques, à l'aide d'un anti-IL-33 produit chez la chèvre (R&D Systems), révélé à l'aide du kit de détection Ventana DABMap (Ventana Medical Systems) et contre-coloré à l'hémalum. Les types cellulaires exprimant ST2 ont été caractérisés par cytométrie en flux dans le foie total chez les souris sauvages 60 jours après infection à l'aide d'anticorps couplés à différents fluorophores dont les données ont été acquises sur un cytomètre FACS Aria II[®] utilisant le logiciel FACS Diva (BD Bioscience), et analysées à l'aide du logiciel CXP (Beckman Coulter) (Figure 32).

Afin de comparer l'impact de la déficience en ST2 et du traitement à l'IL-33r, la réponse immune hépatique contre *L. donovani* a été analysée par différentes techniques sur des groupes de 4 à 13 souris. Les charges parasitaires hépatiques ont été quantifiées sur des appositions de foie colorées au MGG et exprimées en Leishman Donovan Units (LDU), d'après la formule suivante : LDU =

nombre d'amastigotes pour 1000 noyaux cellulaires x poids du foie en grammes. Des PCR quantitatives ont été réalisées sur des lysats de foie et ont permis de quantifier l'expression de cytokines et chimiokines classiquement associées à la mise en place des granulomes, normalisée par rapport à l'expression de l'ARN 18S et évaluée par rapport à des souris non infectées (J0) et non traitées (NT). L'infiltrat de polynucléaires neutrophiles et de monocytes a été quantifié à l'aide de marquages de coupes histologiques avec un anticorps ciblant la MPO et par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps ciblant le GR1 et le CD11b (Figure 32).

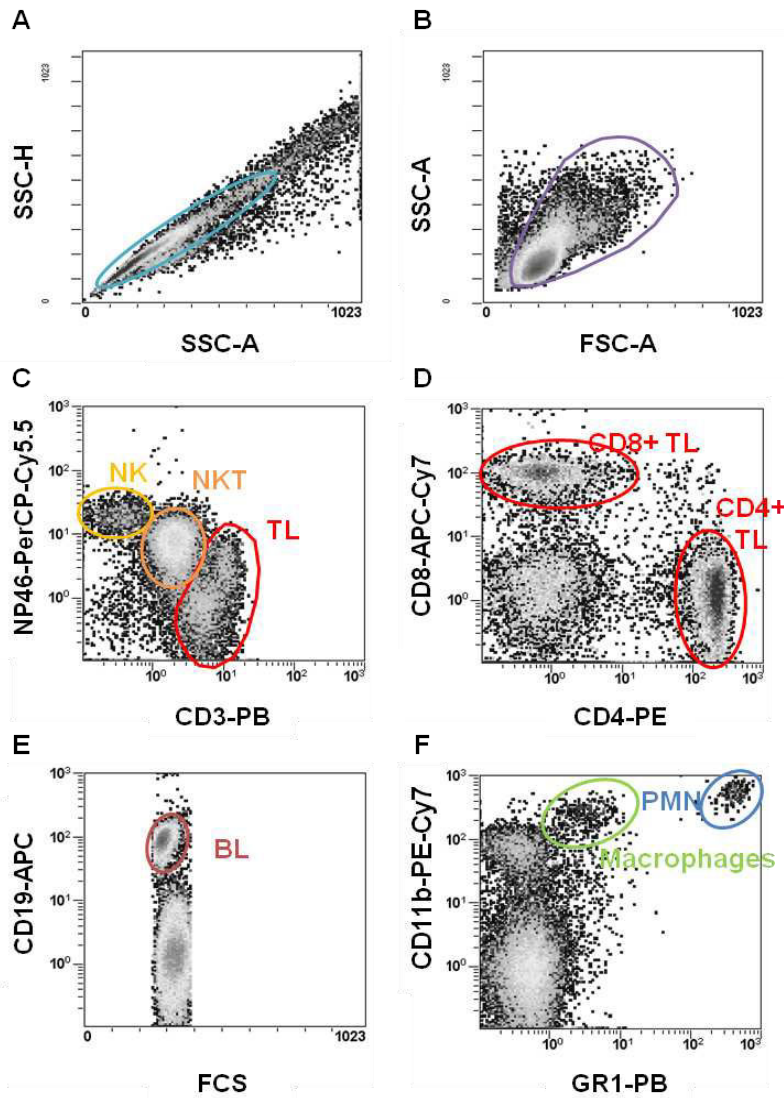


Figure 32 : Stratégie de caractérisation des populations cellulaires en cytométrie en flux. Les amas cellulaires et débris sont éliminés à l'aide de la représentation de l'aire du side scatter (SSC-A) en fonction de sa hauteur (SSC-H) (A), puis à l'aide de la représentation de l'aire du forward scatter (FSC-A) en fonction de SSC-A (B). Parmi les cellules ainsi fenêtrées, les NK sont définis comme étant NP46⁺ CD3⁻, les NKT NP46⁺ CD3⁺ et les lymphocytes T NP46⁻ CD3⁺ (C). Parmi les lymphocytes T, les CD4⁺ et CD8⁺ sont distingués (D). Les lymphocytes B sont définis comme étant CD19⁺ (E). Les polynucléaires neutrophiles (PMN) sont CD11b⁺ GR1^{high}, tandis que les macrophages sont CD11b⁺ GR1^{int} (F).

III. Résultats

1. L'infection des souris BALB/c par *L. donovani* induit des niveaux accrus d'IL-33 sérique, l'expression d'IL-33 et le recrutement de cellules exprimant ST2 dans le foie

Le dosage de l'IL-33 dans le sérum des souris BALB/c sauvages infectées par *L. donovani* montre à J15 et J30 un niveau similaire aux souris non infectées. En revanche, une augmentation significative du niveau d'IL-33 est observée à J60 avec une concentration moyenne de 89.7 ± 20.1 pg/mL (Figure 33A). A J60, des marquages immuno-histochimiques de coupes hépatiques ont également révélé la présence d'un marquage nucléaire spécifique de l'IL-33, préférentiellement localisé dans certaines cellules endothéliales, mais aussi au niveau de cellules localisées dans les granulomes et les infiltrats cellulaires bordant les vaisseaux (Figure 33B-D).

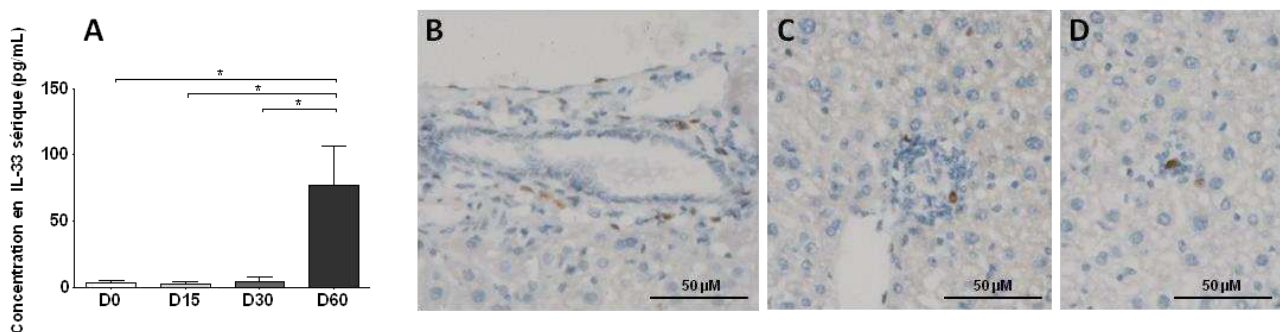


Figure 33 : Dosage d'IL-33 sérique et expression hépatique d'IL-33 au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale chez la souris BALB/c. L'IL-33 sérique a été dosée à l'aide d'un kit ELISA spécifique chez les souris BALB/c sauvages infectées par *L. donovani* après 15, 30 ou 60 jours (A). L'IL-33 hépatique a été détectée par immuno-histochimie sur coupe hépatique contre-colorée à l'hémalum (B-D) D'après Rostan et al., soumis.

Afin d'étudier l'impact de cette expression et sécrétion d'IL-33, la présence de cellules exprimant ST2 a été démontrée par immuno-histochimie dans le foie à J60 (Figure 34A). Une analyse en cytométrie en flux réalisée sur le foie total des souris BALB/c a révélé une expression spécifique de ST2 au niveau des macrophages ($CD11b^+ GR1^{int}$) et des lymphocytes B ($CD19^+$), avec un ratio de fluorescence spécifique par rapport à la fluorescence obtenue avec un isotype contrôle significativement supérieur à 1 (Figure 34B). Aucune augmentation du ratio des moyennes d'intensité de fluorescence de l'anticorps anti-ST2 par rapport à l'isotype contrôle n'a été observée 60 jours après infection (Figure 34C). Cependant, un infiltrat significatif de toutes les populations cellulaires analysées a été observé à J60 comparé aux souris non infectées, avec une multiplication

par 5,5 du nombre de cellules $CD11b^+ GR1^{int}$ dans le foie total, alors que le nombre de cellules n'était multiplié que par 2,5 à 3,8 pour les autres populations analysées (Figure 34D), témoignant d'un enrichissement en cellules $ST2^+$ après infection.

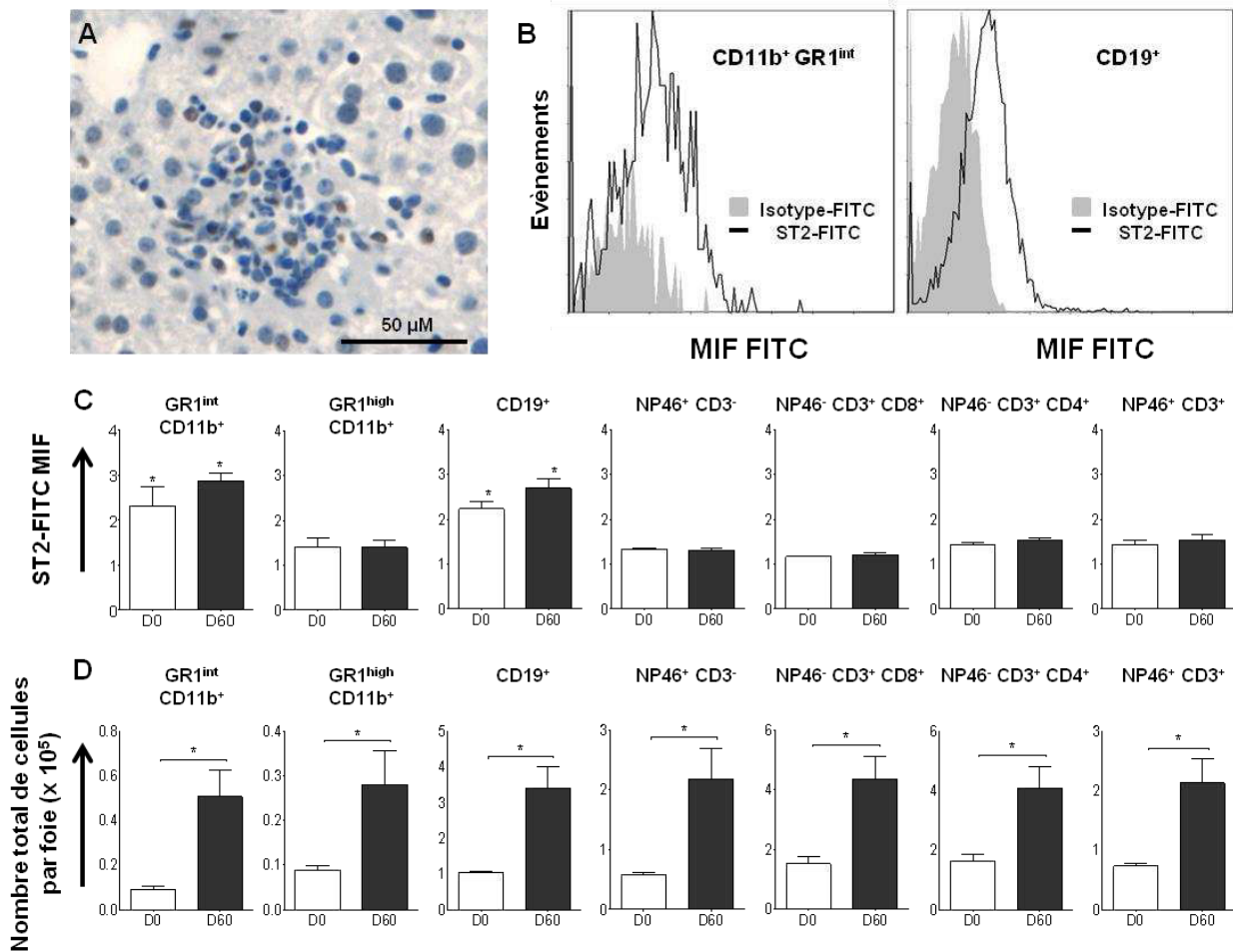


Figure 34 : Expression de ST2 dans le foie des souris BALB/c 60 jours post-infection après infection par *L. donovani*. ST2 a été marqué en immuno-histochimie sur coupe hépatique contre-colorée à l'hémalum (A). Un décalage de la moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) est observé avec l'anticorps anti-ST2 couplé au FITC par rapport à son isotype contrôle au niveau des macrophages ($CD11b^+ GR1^{int}$) et des lymphocytes B ($CD19^+$) (B). Les ratios des MIF obtenues avec l'anti-ST2-FITC et son isotype sont présentés à J0 et J60 sous la forme d'un histogramme pour chaque population cellulaire étudiée (C). L'infiltrat cellulaire a été quantifié par cytométrie en flux pour chaque population cellulaire et rapporté au nombre total de cellules infiltrantes dénombrées dans le foie des souris (D). D'après Rostan et al., soumis.

2. La déficience en ST2 est associée à un meilleur contrôle de la charge parasitaire

Pour caractériser le rôle des cellules infiltrantes ST2⁺, la réponse immune hépatique a été comparée entre des souris BALB/c WT et ST2^{-/-} après infection par *L. donovani*. Chez les souris WT, la charge parasitaire hépatique croît significativement à J60 par comparaison aux temps J15 et J30. Chez les souris ST2^{-/-}, les charges parasitaires sont similaires à celles des sauvages à J15 et J30, mais aucune augmentation n'est observée à J60 (Figure 35A). La charge parasitaire non contrôlée chez les souris WT s'accompagne à J60 d'une hépatomégalie importante, caractéristique classique de la leishmaniose viscérale qui n'est pas observée chez les souris ST2^{-/-} (Figure 35B).

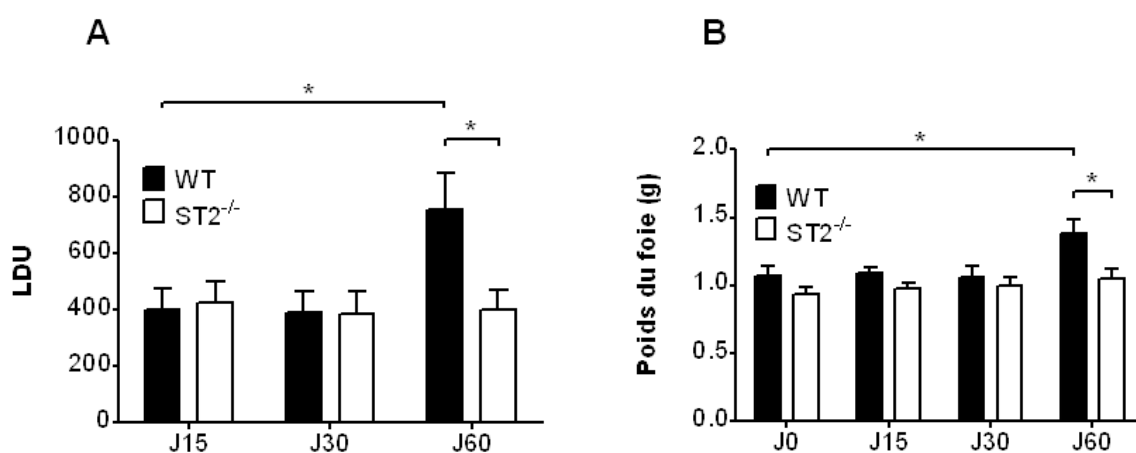


Figure 35 : Charge parasitaire hépatique et hépatomégalie chez les souris BALB/c WT ou ST2^{-/-} infectées par *L. donovani*. Charge parasitaire hépatique dénombrée par comptage microscopique d'appositions hépatiques colorées au MGG et exprimées en LDU 15, 30 ou 60 jours après infection (A). Poids du foie à chaque temps post-infection (B). D'après Rostan et al., soumis.

3. L'IL-33 réprime l'expression de cytokines Th1 sans modifier l'expression de cytokines Th2

Dans la mesure où l'efficacité de la réponse immune hépatique contre *L. donovani* est hautement dépendante des cytokines Th1 et Th2 produites, des PCR quantitatives ont été réalisées sur des lysats hépatiques de souris WT et ST2^{-/-}. Les résultats ont révélé une forte induction d'IL-12p35 et d'IFN- γ chez les souris ST2^{-/-} aux temps précoces et tardifs, tandis qu'aucune induction significative n'a été observée chez les souris WT (Figure 36A-B). L'IL-4, l'IL-13 et l'IL-10 ont été faiblement détectées et ne présentaient aucune différence notable entre les souris WT et ST2^{-/-} (non montré), suggérant une polarisation de la réponse immune hépatique préférentiellement Th1 chez les souris ST2^{-/-} comparées aux souris WT.

A l'inverse, nous avons évalué l'effet d'un traitement par l'IL-33r chez ces mêmes souris BALB/c. L'injection de 0,5 µg d'IL-33r deux fois par semaine a induit une répression significative de l'expression d'IFN-γ et d'IL-12p35 à J60, par rapport aux souris non traitées (Figure 36C-D), sans impact sur l'expression d'IL-4 et d'IL-13.

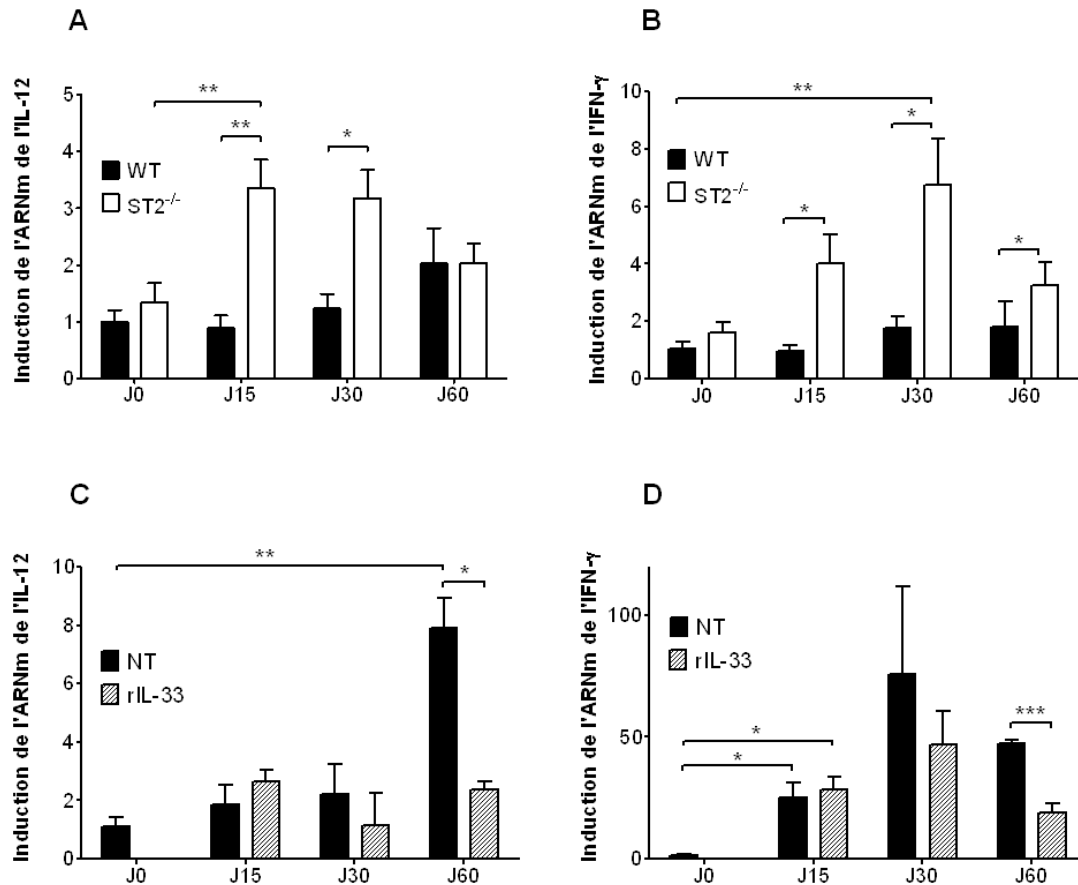


Figure 36 : Expression de cytokines Th1 chez les souris BALB/c déficientes en ST2 ou sauvages traitées avec de l'IL-33 recombinante après infection par *L. donovani*. L'expression d'IL-12p35 (A- C) et d'IFN-γ (B- D) a été évaluée par PCR quantitative sur lysats hépatiques après 15, 30 ou 60 jours post infection chez les souris ST2^{-/-} comparées à leurs homologues sauvages (WT) (A-C) et chez les souris sauvages traitées par l'IL-33r ou non traitées (NT) (B-D). D'après Rostan et al., soumis.

4. L'IL-33 réprime le recrutement des polynucléaires neutrophiles et des monocytes dans le foie des souris BALB/c infectées par *L. donovani*

Comme les monocytes et les polynucléaires neutrophiles sont des cellules clés précocement recrutées au cours d'une réponse immunitaire efficace contre *L. donovani*, l'expression de chimiokines impliquées dans leur attraction, CCL2 et CXCL2, a été quantifiée par PCR quantitative. Ces chimiokines sont induites plus fortement et/ou plus précocement chez les souris ST2^{-/-} comparées aux souris WT (Figure 37A-B), mais aucune différence n'a été observée au niveau de KC également impliqué dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles. L'expression des récepteurs spécifiques de ces chimiokines est également accrue chez les souris ST2^{-/-}, dans les lysats hépatiques à J15 et J30 pour CCR2 et J30 pour CXCR2 (Figure 37C-D). Chez les souris BALB/c traitées par l'IL-33r, aucune différence d'expression de CCL2 ou CXCL2 ni de CCR2 n'a été observée. En revanche, une répression significative du CXCR2, récepteur commun à CXCL2 et KC, a été démontrée en réponse à l'IL-33r (Figure 37E), et associée à une répression de l'expression de KC chez les souris traitées à J60 (Figure 37F).

Les cellules MPO⁺ attirées dans le foie par CCL2, CXCL2 et KC ont été dénombrées en immuno-histochimie sur coupes hépatiques. L'infiltrat de cellules MPO⁺ chez les souris ST2^{-/-} à J15 montre 2 fois plus de cellules par mm² de tissu que chez les souris sauvages (Figure 38A et C-D). Le dénombrement de cellules MPO⁺ (Figure 38B et E-F) sur coupes histologiques ainsi qu'une analyse en cytométrie en flux (Figure 38G-H) ont confirmé un infiltrat réduit de polynucléaires neutrophiles et monocytes chez les souris traitées à J60. Au total, l'IL-33 semble donc être associée à la répression de CCL2, CXCL2 et KC et réprime ainsi l'influx de polynucléaires neutrophiles et de monocytes au niveau du foie en réponse à une infection par *L. donovani* chez les souris BALB/c.

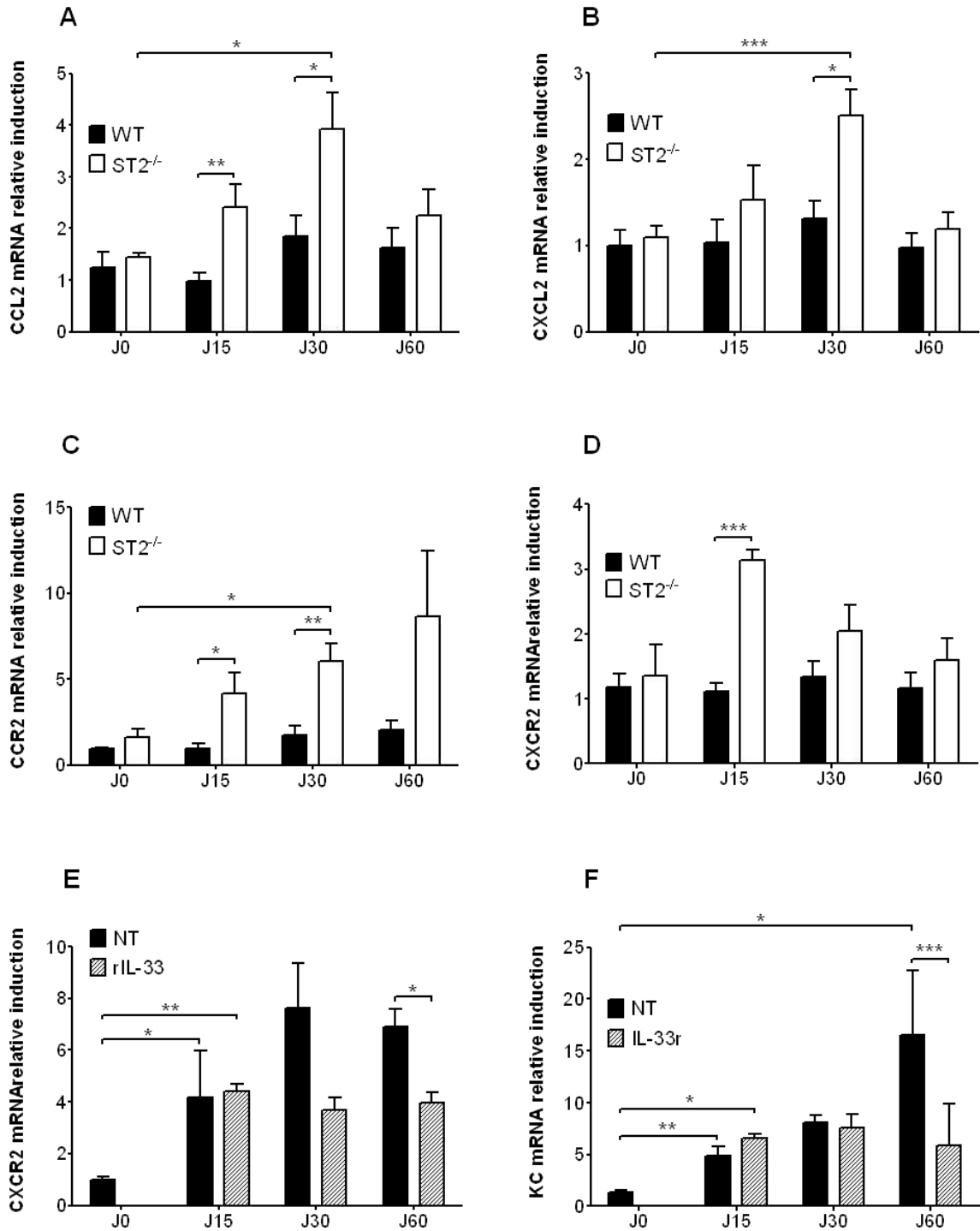


Figure 37 : Expression des ARNm des chimiokines CCL2, CXCL2 et KC, et des récepteurs CCR2 et CXCR2 dans le foie de souris BALB/c déficientes en ST2 ou sauvages traitées avec de l'IL-33 recombinant et infectées par *L. donovani*. Expression des ARNm de CCL2 (A), CXCL2 (B), CCR2 (C) et CXCR2 (D) quantifiée par PCR quantitative dans des lysats hépatiques de souris BALB/c sauvages (WT) ou ST2^{-/-} après 15, 30 ou 60 jours post infection. Expression de CXCR2 (E) et KC (F) quantifiée par PCR quantitative sur lysats hépatiques chez des souris BALB/c WT traitées par de l'IL-33r ou non traitées (NT) 15, 30 ou 60 jours après infection. D'après Rostan et al., soumis.

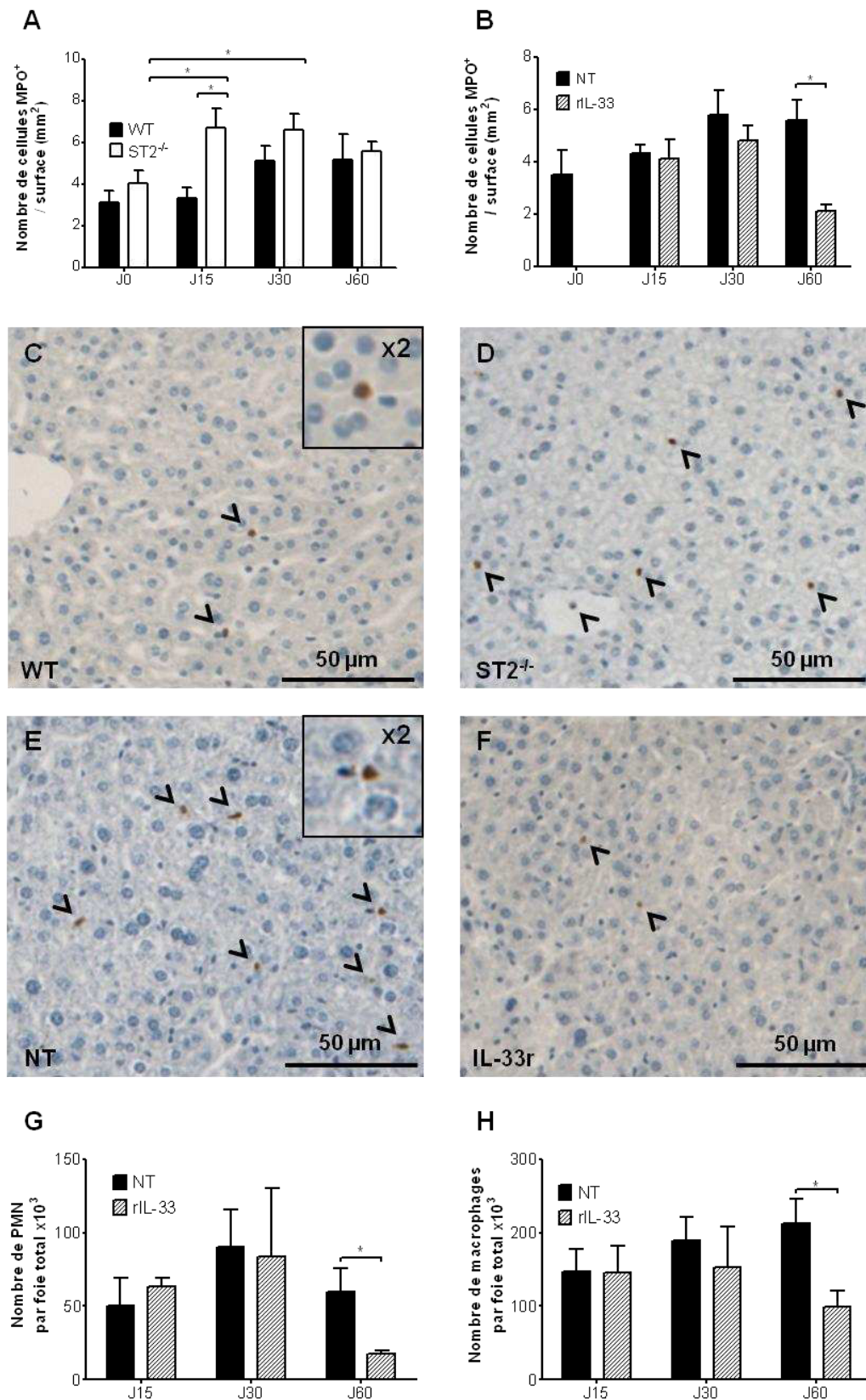


Figure 38 : Recrutement des polynucléaires neutrophiles et des monocytes chez les souris BALB/c déficientes en ST2 ou sauvages traitées par de l'IL-33r infectées par *L. donovani*. Dénombrement des cellules MPO⁺ après marquage en immuno-histochimie chez les souris sauvages (WT) et ST2^{-/-} (A) et sauvages non traitées (NT) ou traitées par l'IL-33r (B). Champs représentatifs des foies des souris WT et ST2^{-/-} à J15 (C-D), et des souris NT et traitées à l'IL-33 à J60 (E-F). Dénombrement des polynucléaires neutrophiles (PMN) (G) et des macrophages (H) dans le foie total par cytométrie en flux chez les souris NT et traitées à l'IL-33r après 15, 30 ou 60 jours. D'après Rostan et al., soumis.

5. L'IL-33 réprime l'expression de NF- κ B

Comme l'induction de cytokines Th1 et de chimiokines est notamment régulée par le facteur NF- κ B, l'expression de la sous-unité NF- κ Bp65 a été analysée par PCR quantitative dans les lysats de foie de souris infectées par *L. donovani*. Une surexpression significative a été observée à J30 et J60 chez les souris BALB/c ST2^{-/-} comparées aux souris WT (Figure 39A). A l'inverse, une répression significative a été observée chez les souris traitées par l'IL-33r comparées aux souris NT à J30 et J60 (Figure 39B).

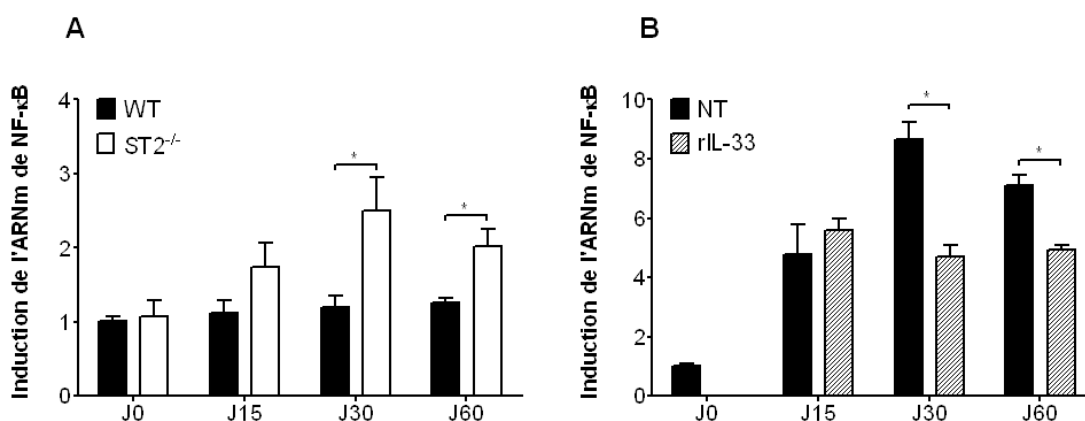


Figure 39 : Expression de NF- κ Bp35 chez les souris BALB/c ST2^{-/-} et BALB/c sauvages traitées par l'IL-33r après infection par *L. donovani*. L'expression de NF- κ Bp35 a été analysée par PCR quantitative sur lysats de foie chez les souris ST2^{-/-} (A) et traitées par l'IL-33r (B) après 15, 30 ou 60 jours post-infection. D'après Rostan et al., soumis.

IV. Discussion

Comme observé au cours de la leishmaniose viscérale humaine, l'IL-33 est sécrétée dans le sérum des souris BALB/c infectées par *L. donovani*, à 60 jours post-infection dans notre modèle expérimental. Chez ces souris, l'IL-33 est exprimée au niveau du foie dans certaines cellules endothéliales ainsi que dans des cellules infiltrantes participant à la constitution des granulomes, comme observé chez un patient atteint de leishmaniose viscérale, ainsi que chez les souris

C57BL/6. Afin d'étudier le rôle de l'IL-33 induite, ses cellules cibles potentielles exprimant le récepteur ST2 ont été recherchées. Une analyse en cytométrie en flux a permis de démontrer la présence de lymphocytes B et de macrophages ST2⁺ principalement localisée dans les granulomes après infection. L'infection par *L. donovani* n'a pas accru l'intensité de fluorescence moyenne associée au marquage de ST2 au niveau de ces cellules. Néanmoins, le recrutement important des monocytes/macrophages (x 5,5) et dans une moindre mesure des lymphocytes B (x 3,2) au niveau du foie en réponse à l'infection témoigne d'un enrichissement en cellules ST2⁺, dont la localisation préférentielle dans les granulomes a été démontrée par immuno-histochimie.

Afin d'explorer le rôle de l'axe IL-33/ST2, des souris BALB/c ST2^{-/-} ou BALB/c WT traitées avec de l'IL-33r ont été infectées par *L. donovani*. La déficience en ST2 est associée à la surexpression des cytokines Th1 (IL-12 et IFN- γ), tandis que le traitement par l'IL-33r réprime l'expression d'IL-12 et d'IFN- γ . L'expression d'IL-4 et l'IL-13 est faible et inchangée dans les deux modèles. L'IL-33 semble donc jouer le rôle d'un régulateur négatif de la réponse immune Th1 au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale chez la souris BALB/c.

L'influx de monocytes et de polynucléaires neutrophiles, conditionné par l'expression de chimiokines spécifiques, est nécessaire pour la formation de granulomes fonctionnels et la clairance parasitaire (Engwerda et Kaye, 2000; Murray, 2000; Smelt et al., 2000). Chez les souris ST2^{-/-}, une induction plus forte et plus précoce de CCL2 et CXCL2 a été observée au niveau du foie total par rapport aux souris sauvages, associée à une induction plus forte de leurs récepteurs respectifs CCR2 et CXCR2. Chez les souris BALB/c traitées par l'IL-33r, l'expression de KC ainsi que de son récepteur CXCR2 est significativement réduite à 60 jours post-infection. L'expression de ces trois chimiokines, CCL2, CXCL2 et KC, impliquées dans le recrutement des monocytes et des polynucléaires neutrophiles est donc réprimée par l'IL-33. En effet, le recrutement de cellules MPO⁺ dans le foie est plus précoce chez les souris ST2^{-/-}, tandis qu'il est significativement diminué à J60 chez les souris traitées à l'IL-33r. La différence de cinétique entre les deux modèles expérimentaux complémentaires pourrait s'expliquer par des effets précoces de la délétion du gène *st2* chez les souris ST2^{-/-}, mais des effets tardifs d'un traitement au long cours avec de faibles doses d'IL-33r. Il est probable également que la suppression d'une cytokine Th2 sur un fond génétique Th2 (BALB/c) ait plus de répercussions que l'ajout d'un facteur Th2 (IL-33r).

NF- κ B est un régulateur clé de l'expression de nombreuses cytokines, chimiokines et récepteurs, dont l'activation et l'expression peut être régulée par l'IL-33 (Sanada et al., 2007; Ali et al., 2011). La surexpression hépatique de NF- κ Bp65 chez les souris ST2^{-/-} et sa répression chez les souris traitées à l'IL-33r comparées aux souris sauvages non traitées suggère que l'IL-33 pourrait réprimer l'expression de NF- κ Bp65, pour contrebalancer son activation induite en réponse à l'infection par *Leishmania* (Singh et al., 2004; Gregory et al., 2008), conduisant ainsi à la répression de

chimiokines et de cytokines Th1.

La voie IL-33/ST2 semble donc associée à la répression de la réponse Th1 et de l'infiltrat myéloïde chez les souris BALB/c, notamment via la régulation de l'expression de NF- κ B, aboutissant ainsi à la progression délétère de la leishmaniose viscérale expérimentale. En effet, les souris BALB/c déficientes en ST2 ont montré un meilleur contrôle de la charge parasitaire hépatique que les souris WT. Le traitement par l'IL-33r a, à l'inverse, induit une tendance à des charges parasitaires plus élevées à J60, mais la différence observée n'était pas significative dans les conditions de l'expérience. Le protocole d'injection d'IL-33 recombinante a été déterminé à partir de données de la littérature sur des modèles murins proposant des cinétiques courtes ou étudiant des effets transitoires de l'IL-33, et non dans le cas d'injections répétées sur une cinétique de plusieurs mois (Schmitz et al., 2005; Chackerian et al., 2007; Komai-Koma et al., 2007; Humphreys et al., 2008; Miller et al., 2008; Yin et al., 2010; Bourgeois et al., 2011). Un traitement avec des doses d'IL-33r plus fortes et/ou plus fréquentes ou par une autre voie d'injection, pourrait permettre l'observation de charges parasitaires significativement accrues, et conforterait ainsi le rôle de l'IL-33 comme facteur de susceptibilité chez les souris BALB/c.

➔ **Article 1 :** IL-33/ST2 axis is associated with human visceral leishmaniasis and suppresses Th1 responses in the liver of BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. Rostan et al., soumis.

Principales publications

Article 1

IL-33/ST2 axis is associated with human visceral leishmaniasis and suppresses Th1 responses in the liver of BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*.

Rostan et al., soumis.

Article 2

Human hepatic stellate cells in primary culture are safe targets for *Leishmania donovan*.i

Rostan et al., Parasitology, 2013.

Discussion générale

Discussion générale

La leishmaniose viscérale est une maladie systémique classée comme la seconde maladie parasitaire la plus importante derrière le paludisme par l'Organisation Mondiale de la Santé, en raison de sa morbidité, de sa mortalité importante et de sa large distribution mondiale. Elle est due aux protozoaires du genre *Leishmania*, et plus précisément aux espèces *L. donovani* et *L. infantum/chagasi*, parasites du système des phagocytes mononucléés, capables d'envahir les organes lymphoïdes et le foie. La leishmaniose viscérale se caractérise par une physiopathologie différentielle selon les organes touchés. En effet, la rate et la moelle osseuse sont associées à une persistance parasitaire mal contrôlée et des lésions tissulaires importantes. A l'inverse, le foie est le site d'une infection aiguë résolutive associée à des dommages tissulaires minimales (Engwerda et Kaye, 2000; Stanley et Engwerda, 2007). La réponse efficace du foie contre les leishmanies viscérotropes repose sur le développement d'une réponse granulomateuse caractérisée par le recrutement séquentiel, autour des macrophages infectés, de différents types de cellules immunitaires incluant les cellules NKT, les polynucléaires neutrophiles, les monocytes puis les lymphocytes, aboutissant à l'activation macrophagique et à la leishmanicidie (Murray, 2001; Moore et al., 2013). Ce contrôle efficace de l'infection leishmanienne au niveau macrophagique repose sur le développement d'une réponse immune de type Th1 caractérisée par la sécrétion d'IL-12 et d'IFN- γ jouant un rôle important dans l'activation cellulaire et la résolution de l'infection. Toutefois, le foie est un organe particulier caractérisé par un micro-environnement tolérogène préférentiellement Th2 caractérisé par la production d'IL-4, d'IL-10 et de TGF- β , permettant de maîtriser la réponse immune et d'éviter ainsi les dommages liés à une réponse cellulaire exacerbée (Kemp et al., 1993c; Kurtzhals et al., 1994; Bahrenscheer et al., 1995; Stanley et Engwerda, 2007). La contribution des différents acteurs cellulaires et solubles de cette réponse mixte Th1/Th2, dans le déroulement de la réponse granulomateuse hépatique et la résolution finale de l'infection dans le foie n'est pas encore pleinement élucidée. Elle fait l'objet d'une partie des travaux de notre équipe "Agents infectieux hépatotropes et co-facteurs environnementaux", au sein de l'Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail (UMR IRSET U1085 – INSERM / Université Rennes 1).

L'IL-33 est une protéine décrite pour la première fois chez l'Homme en 2003, en tant que facteur cellulaire associé à la chromatine, et susceptible de participer au phénotype particulier des cellules endothéliales cuboïdales facilitant l'infiltrat cellulaire au sein des tissus (Baekkevold et al., 2003). En 2005, elle a été décrite comme une cytokine sécrétée, capable d'induire une réponse immune préférentiellement Th2 au niveau de ses cellules cibles exprimant son récepteur spécifique ST2 (Schmitz et al., 2005). Depuis lors, l'IL-33 a été étudiée dans de nombreuses pathologies. Elle est

notamment impliquée dans certaines maladies infectieuses au cours desquelles elle peut jouer un rôle protecteur ou délétère (Oboki et al., 2010; Liew, 2012; Mirchandani et al., 2012). Au cours de la leishmaniose cutanée, une sous-population de lymphocytes ST2⁺ enrichis au niveau des ulcérations chroniques est associée à la répression de l'immunité Th1 au profit d'une polarisation Th2 délétère au contrôle de l'infection par *L. major* (Kropf et al., 2002a; Kropf et al., 2002b; Kropf et al., 2003). Le rôle de l'axe IL-33/ST2 au cours de la leishmaniose viscérale n'est pas documenté dans la littérature. Au niveau du foie, l'expression d'IL-33 a été détectée au cours d'hépatites aiguës et chroniques et associée à la sévérité de la maladie (Marvie et al., 2010; Arshad et al., 2011; Arshad et al., 2012a; Chen et al., 2012a). L'objectif de ce travail de thèse a donc été la caractérisation du rôle de l'IL-33 et de son récepteur ST2 au cours de l'hépatite granulomateuse associée à la leishmaniose viscérale. Les principaux points de discussion à partir des résultats obtenus sont les suivants.

L'Interleukine-33 : un biomarqueur de la leishmaniose viscérale évolutive chez l'Homme ?

Dans un premier temps, l'IL-33 ayant été détectée dans le sérum humain au cours de différentes maladies (Ayimba et al., 2011; Chen et al., 2012b; Wang et al., 2012a; Wang et al., 2012b), une mesure de son taux circulant a été réalisée dans le sérum de patients atteints de leishmaniose viscérale. Le niveau d'IL-33 sérique a été démontré significativement accru dans le groupe de patients comparé au groupe contrôle, suggérant que l'IL-33 pourrait être un marqueur de la sévérité de la maladie, comme décrit au cours des hépatites virales (Wang et al., 2012a; Wang et al., 2012b). D'autres protéines ont été préalablement décrites comme des bio-marqueurs d'une leishmaniose viscérale active, incluant des cytokines telles que l'IL-10 (Khoshdel et al., 2009), mais aussi d'autres types de protéines telles que HLA-G ou l'Indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Donaghy et al., 2007; Gangneux et al., 2013). Des travaux réalisés au laboratoire ont en effet démontré qu'une activité accrue de l'IDO est observée chez des patients atteints de leishmaniose viscérale, comparés à des patients guéris après une chimiothérapie efficace ou à des sujets sains. Une décroissance de l'activité de l'IDO reflète dans cette étude la restauration d'une immunité efficace en réponse aux traitements anti-parasitaires (Gangneux et al., 2013). De la même manière, il serait particulièrement intéressant de suivre l'évolution des concentrations sériques en IL-33 au cours du temps, au moment du diagnostic, puis suite à des chimiothérapies efficaces, sur une cohorte de patients plus importante. L'étude du niveau d'IL-33 dans le cas de rechutes serait également un paramètre à étudier. Parmi les marqueurs de la leishmaniose viscérale, l'IL-10 est classiquement associée à l'immunosuppression observée dans le cas d'une maladie active et non observée chez les sujets asymptomatiques (Holaday et al., 1993). Afin de caractériser plus finement la place de l'IL-33

comme facteur de susceptibilité et éventuel marqueur de pronostic au cours de la leishmaniose viscérale évolutive humaine, il serait donc intéressant de comparer son niveau dans le sérum de sujets asymptomatiques comparés à des patients atteints d'une leishmaniose viscérale active et à des sujets non porteurs des leishmanies. De même, il serait intéressant d'étudier, au cours de la leishmaniose viscérale et du portage asymptomatique, les niveaux circulants du récepteur soluble sST2 capable de se lier à l'IL-33 sérique et d'en inhiber ainsi les effets, comme observé dans différentes maladies infectieuses (Becerra et al., 2008; Wagenaar et al., 2009; Hoogerwerf et al., 2010; Guerrero et al., 2013).

Dans la mesure où l'équipe s'intéresse particulièrement à la réponse du foie au cours de la leishmaniose viscérale, l'expression d'IL-33 a été recherchée dans le foie d'un patient admis au CHU de Rennes. Alors que des travaux antérieurs de l'équipe ont démontré une expression spécifique de l'IL-33 dans les noyaux des cellules endothéliales et sinusoidales dans le foie sain (Marvie et al., 2010), nous avons ici démontré la présence de cellules endothéliales, mais aussi d'un grand nombre d'autres cellules exprimant l'IL-33 dans le foie de notre patient. Afin d'approfondir ces résultats, il serait intéressant de réaliser de nouveaux marquages de l'IL-33 hépatique chez d'autres patients atteints de leishmaniose viscérale et de comparer le niveau d'expression d'IL-33 ou le nombre de cellules IL-33⁺ à la charge parasitaire hépatique. Cependant, les prélèvements hépatiques ne faisant pas partie des éléments diagnostiques habituels de la leishmaniose viscérale en France (Gangneux et al., 2006), il n'est pas aisé de disposer de biopsies afin de réaliser de telles études. Dans le cas de notre patient, la taille de la biopsie n'a malheureusement pas permis la réalisation de marquages supplémentaires permettant la caractérisation des cellules IL-33⁺.

Quel rôle pour les cellules étoilées du foie dans *la réponse à l'infection* par *Leishmania* et la synthèse d'IL-33 ?

L'IL-33 est largement décrite comme une cytokine participant au maintien de la polarisation Th2 au cours de différentes pathologies chroniques, comme observé dans différents modèles parasitaires dus à *Trichuris muris* ou *Schistosoma mansoni* par exemple (Townsend et al., 2000; Humphreys et al., 2008). Dans un modèle d'hépatite chronique induite par le tétrachlorure de carbone précédemment développé au laboratoire, l'IL-33 surexprimée au niveau des cellules étoilées du foie activées est associée à une inflammation chronique Th2 conduisant à une fibrose hépatique (Marvie et al., 2010). Au cours de la leishmaniose viscérale, l'hypertrophie de ces cellules, activées en réponse au TGF- β produit par les cellules de Kupffer, est responsable de la fibrose observée chez un grand nombre de patients (Duarte et Corbett, 1987; Duarte et al., 2009). Sachant que les fibroblastes sont l'une des sources principales d'IL-33 dans différents modèles (Sanada et al., 2007; Moussion

et al., 2008; Kobori et al., 2010; Marvie et al., 2010; Sponheim et al., 2010; Campo et al., 2012; Savinko et al., 2012; Talabot-Ayer et al., 2012), nous avons entrepris l'infection de cellules étoilées hépatiques humaines par *L. donovani* en culture primaire.

Nos travaux ont permis de démontrer pour la première fois la permissivité des cellules étoilées quiescentes et myofibroblastiques aux leishmanies, avec un pourcentage d'infection moyen n'excédant pas 6 % et un nombre moyen de parasites par cellule faible et stable. La survie durable des cellules étoilées infectées sans éradication des parasites intracellulaires et sans perturbation de leurs propriétés fonctionnelles dans nos conditions expérimentales nous a conduits à considérer les cellules étoilées du foie comme de possibles cellules sanctuaires pour *L. donovani*. Ces cellules sanctuaires pourraient contribuer à la persistance des parasites dans l'organisme, à l'instar des hépatocytes dans le foie (Gangneux et al., 2005) ou des fibroblastes cutanés et des fibroblastes réticulaires des ganglions lymphatiques au cours de la leishmaniose cutanée à *L. major* (Bogdan et al., 2000a). En outre, la permissivité des cellules étoilées du foie à *L. infantum* (donnée non montrée) conforte l'hypothèse d'un rôle de ces cellules dans la dissimulation des leishmanies quelle que soit l'espèce incriminée. Un tel mécanisme pourrait expliquer le portage asymptomatique largement répandu dans les zones endémiques (Michel et al., 2011) et les réactivations parasitaires responsables de rechutes (Dereure et al., 2003; Gorski et al., 2010; Kajaia et al., 2011) ou de leishmanioses viscérales d'apparition retardée chez certains patients ayant éventuellement quitté les zones endémiques (Badaro et al., 1986; Alvar et al., 1997; Guerin et al., 2002). La recherche de cellules étoilées infectées dans le foie de patients ou chez l'animal *in vivo* est nécessaire pour conforter cette hypothèse et établir sa pertinence physiologique au cours des leishmanioses viscérales spontanées et expérimentales. Par ailleurs, nos expériences ont été réalisées avec une unique souche leishmanienne pour chaque espèce étudiée. Or, des travaux récemment publiés suggèrent qu'il existe des différences génétiques entre les souches de *L. infantum* associées au portage asymptomatique et celles responsables de leishmanioses viscérales symptomatiques dans le sud de la France (Hide et al., 2013). Il serait donc particulièrement pertinent d'étudier la permissivité des cellules étoilées vis-à-vis d'isolats de différentes espèces, afin d'explorer l'impact du polymorphisme génétique des souches sur leur capacité à infecter les cellules étoilées, et de rechercher un possible lien avec leur latence dans l'organisme. En parallèle, la chimio-sensibilité des parasites internalisés par les macrophages ou sanctuarisés dans les cellules étoilées du foie mériterait d'être comparée.

Dans nos conditions expérimentales, l'exposition à *L. donovani* n'a ni empêché ni favorisé l'induction d'IL-33 au cours de l'activation des cellules étoilées fraîchement purifiées, et n'a pas modifié son niveau d'expression élevé après leur activation *in vitro*, comme préalablement décrit dans un autre modèle de l'équipe (Marvie et al., 2010). En outre, des dosages cytokiniques

effectués sur les surnageants de culture des cellules étoilées activées n'ont pas permis la détection d'IL-33 en réponse à l'infection dans nos conditions expérimentales. Dans la mesure où l'IL-33 est fortement exprimée par les cellules étoilées activées, elle pourrait être exprimée par ces cellules et participer à la régulation de la réponse immunitaire hépatique, dans les cas de leishmaniose viscérale sévère présentant une fibrose, comme observé dans le cas des hépatites chroniques virales ou toxiques (Marvie et al., 2010). Cependant, la biopsie du patient rennais présentait un grand nombre de cellules IL-33⁺ associées à une charge parasitaire élevée, alors qu'aucune fibrose n'était observée. L'ensemble de ces travaux suggère donc que les cellules étoilées hépatiques n'apparaissent pas comme la source principale d'IL-33 dans le foie au cours de la leishmaniose viscérale. Afin de pallier les limites des études chez l'Homme et des cultures in vitro, des modèles murins ont ainsi été développés pour explorer la place de l'IL-33 au cours de la leishmaniose viscérale.

Sources et cibles de l'interleukine-33 dans le foie au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale chez la souris.

Chez la souris C57BL/6, l'infection par *L. donovani* induit la sécrétion tardive d'IL-33 dans le sérum, comme observé au cours de la leishmaniose viscérale humaine. Au niveau du foie, outre les cellules endothéliales, un grand nombre de cellules exprimant l'IL-33 a été observé par immunohistochimie et immuno-fluorescence, et préférentiellement localisé au niveau des granulomes et autour des vaisseaux sanguins. Les cellules IL-33⁺ n'expriment pas l' α -SMA, l'un des marqueurs d'activation des cellules étoilées du foie, ce qui est cohérent avec les résultats précédents, ainsi qu'avec le fond génétique des souris C57BL/6, peu sujettes à développer une fibrose hépatique (Shi et al., 1997). Outre les cellules étoilées activées au cours des hépatites chroniques (Marvie et al., 2010), les hépatocytes engagés vers la mort cellulaire ont également été décrits dans notre équipe comme une source d'IL-33 dans le cas d'hépatites aiguës (Arshad et al., 2011; Arshad et al., 2012a). Dans notre travail, la taille et la densité des noyaux des cellules IL-33⁺ chez les souris C57BL/6 infectées par *L. donovani* réfute l'hypothèse de leur possible nature hépatocytaire. Afin de caractériser les cellules IL-33⁺, de nombreux co-marquages ont été réalisés, avec des anticorps ciblant des marqueurs de différentes populations leucocytaires (F4/80, CD11b, CD11c, MPO, CD19, B220, CD3), mais sont restés négatifs. Les cellules IL-33⁺ semblent en particulier dépourvues du marqueur pan-leucocytaire CD45. Ce type cellulaire pourrait toutefois correspondre à des leucocytes n'exprimant pas ou faiblement le marqueur CD45, ou réprimant directement ou indirectement son expression en réponse à *L. donovani* dans le foie. Il est enfin plausible que les cellules IL-33⁺ soient, comme suggéré dans la littérature, des cellules engagées dans une voie de

mort cellulaire (Moussion et al., 2008; Cayrol et Girard, 2009; Lamkanfi et Dixit, 2009; Arshad et al., 2012b), dont les marquages membranaires et cytoplasmiques seraient compromis. Il conviendrait donc de valider de nouveaux anticorps, afin de finaliser la caractérisation de la source cellulaire d'IL-33 dans le foie au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale.

Chez les souris C57BL/6, l'IL-33 observée en immuno-fluorescence est clairement localisée dans le noyau des cellules. Un rôle de l'IL-33 en tant que facteur nucléaire est donc envisageable. Cependant, l'augmentation concomitante du niveau d'IL-33 sérique, ainsi que la corrélation significative des niveaux d'expression hépatiques d'IL-33 et de son récepteur ST2, tous deux corrélés à l'expression de cytokines clés de la réponse anti-parasitaire, suggèrent un rôle cytokinique de l'IL-33 dépendant de ST2. Afin d'explorer ce rôle, des modèles d'infection de souris déficientes en ST2, ou sauvages traitées ou non avec de l'IL-33 recombinante, ont été développés. Les souris ST2^{-/-}, obtenues par collaboration avec le Pr. Andrew N. McKenzie de l'université de Cambridge (Royaume Uni), ayant été générées sur un fond génétique BALB/c, l'expression d'IL-33 et de ST2 a été préalablement étudiée sur des souris BALB/c sauvages. De nouveau, l'IL-33 est détectée dans le sérum 60 jours après infection, et est exprimée dans un nombre croissant de cellules infiltrantes dans le foie entre l'infection et J60, au niveau des granulomes et autour des vaisseaux. Afin de rechercher les cellules capables de répondre à l'IL-33, des marquages immuno-histochimiques ont été réalisés et ont confirmé la présence de cellules exprimant ST2 au niveau des granulomes. Une analyse par cytométrie en flux a été réalisée sur les cellules infiltrantes isolées à partir du foie total des souris, et a montré que l'expression de ST2 est majoritairement observée dans les lymphocytes B et les macrophages, deux populations fortement enrichies dans le foie en réponse à l'infection. Une expression de ST2 sur d'autres populations n'est pas exclue. Au cours de la leishmaniose cutanée, il existe en particulier une population de lymphocytes Th2 ST2⁺ faiblement représentée (Kropf et al., 2002b), dont l'existence dans le foie au cours de la leishmaniose viscérale n'est pas impossible, bien que nos outils en limitent la détection.

L'interleukine-33 agit comme un répresseur de l'immunité Th1 et un régulateur de l'infiltrat myéloïde au cours de la leishmaniose viscérale.

Comme la balance entre immunité Th1 et Th2 est cruciale pour la susceptibilité à la leishmaniose viscérale (Saha et al., 2006; Mansueto et al., 2007), un modèle de souris BALB/c ST2^{-/-} ou sauvages traitées à l'IL-33 recombinante a permis d'étudier le rôle de l'IL-33 comme éventuel facteur de susceptibilité associé à une réponse Th2 au cours de la leishmaniose viscérale. Dans nos travaux, l'IL-33 s'apparente à un régulateur négatif de la réponse immune Th1 dépendant de ST2 chez la souris BALB/c, induisant la répression d'IFN- γ et d'IL-12 sans modification du niveau

d'expression d'IL-4 et d'IL-13. Ces résultats sont cohérents avec certaines études présentant l'axe IL-33/ST2 comme un répresseur de l'immunité Th1 plutôt qu'un inducteur de la réponse Th2, comme observé dans le cas de la leishmaniose cutanée (Kropf et al., 2003; Jiang et al., 2012). L'IL-10 est une cytokine immunosuppressive classiquement associée à la réponse Th2 et exprimée à la fois par les lymphocytes T auxiliaires et régulateurs ainsi que par les macrophages au cours de la leishmaniose viscérale. De récents travaux ont démontré un rôle protecteur de l'IL-33 dans la maladie de Crohn et l'athérosclérose, via la promotion des lymphocytes régulateurs présentant des niveaux d'expression accrus de FoxP3, d'IDO, d'IL-5, d'IL-13 et d'IL-10 (Duan et al., 2012; Wasserman et al., 2012). Il serait donc intéressant de caractériser le recrutement des lymphocytes T régulateurs FoxP3⁺, leur niveau d'expression de ST2 dans le foie après infection par *L. donovani* et, le cas échéant, l'effet d'un traitement à l'IL-33 sur l'expression de molécules immunosuppressives. Un marquage de FoxP3, compatible avec nos habituels marquages en cytométrie en flux, a été récemment mis au point au laboratoire, et permettra d'affiner la caractérisation des différentes populations lymphocytaires dans les expériences à venir.

Parmi les premiers types cellulaires recrutés dans le foie, les monocytes et les neutrophiles sont nécessaires à la formation de granulomes fonctionnels et à la clairance parasitaire (Murray, 2000; Smelt et al., 2000). Dans nos travaux, l'axe IL-33/ST2 réprime le recrutement des monocytes et polynucléaires neutrophiles. Si l'IL-33 est associée à l'attraction de ces cellules dans différentes maladies (Alves-Filho et al., 2010; Le et al., 2012), nos résultats concordent avec une étude récente démontrant l'effet répresseur de l'IL-33 sur l'infiltrat neutrophilique dans le foie, limitant ainsi les dommages hépatiques et la sévérité de la maladie sur un modèle expérimental d'ischémie et reperfusion (Sakai et al., 2012). Nous avons également identifié les lymphocytes B comme des cellules potentiellement capables de répondre à l'IL-33. Dans la leishmaniose viscérale expérimentale à *L. donovani*, la délétion des lymphocytes B induit une destruction hépatique importante associée à un infiltrat neutrophilique exacerbé, par un mécanisme partiellement dépendant des complexes immuns formés (Smelt et al., 2000). Les lymphocytes B pourraient donc contribuer à cette répression neutrophilique par un mécanisme dépendant de l'axe IL-33/ST2. Cependant, dans nos travaux, l'IL-33 réprime les trois principales chimiokines associées au recrutement des monocytes et polynucléaires neutrophiles, CCL2, CXCL2 et KC. Or, l'expression de ces chimiokines n'est pas décrite au niveau des lymphocytes B, mais au niveau des cellules endothéliales, des fibroblastes, des monocytes et des macrophages (Rollins, 1997; Eberlein et al., 2010). Comme les monocytes/macrophages expriment ST2 dans le foie en réponse à l'infection par *L. donovani* chez les souris BALB/c dans nos travaux, l'action de l'IL-33 sur le recrutement cellulaire semble donc préférentiellement liée aux macrophages ST2⁺.

NF- κ B est un régulateur clé de l'expression de nombreuses cytokines, chimiokines et récepteurs

incluant l'IL-12, l'IFN- γ , CCL2, CXCL2, KC et CXCR2 (Goodbourn, 1990; Widmer et al., 1993; Ueda et al., 1994; Murphy et al., 1995; Ohmori et al., 1995; Homma et al., 2007; Maxwell et al., 2007). L'action notamment intracrine de l'IL-33 sur l'activation de ce facteur nucléaire et la régulation de son expression est de plus en plus documentée (Schmitz et al., 2005; Sanada et al., 2007; Ali et al., 2011; Choi et al., 2012; Su et al., 2013). Chez la souris BALB/c infectée par *L. donovani*, l'IL-33 réprime l'expression de la sous-unité NF- κ Bp65, ce qui pourrait expliquer au moins partiellement la répression des chimiokines et cytokines Th1 étudiées. Toutefois, dans la mesure où la signalisation de l'IL-33 via ST2 implique notamment l'activation de la voie NF- κ B (Schmitz et al., 2005), il convient de caractériser les niveaux d'expression des autres sous-unités de NF- κ B et de son inhibiteur I κ B, mais aussi d'étudier l'état d'activation de la voie NF- κ B en réponse à l'IL-33 dans le contexte d'une infection par *L. donovani*. L'étude des autres voies de signalisation induite en aval de ST2/IL-1RAcP et Myd88 serait également à envisager. Cependant, de telles études sont difficilement envisageables *in vivo*, à moins de trier préalablement les cellules infiltrantes du foie par cytométrie en flux. Un modèle cellulaire simple serait une perspective intéressante pour confirmer les résultats obtenus chez la souris et appréhender quelques aspects mécanistiques.

Les macrophages péritonéaux de souris : un modèle cellulaire *simple pour l'étude de l'IL-33 en réponse à l'infection par Leishmania in vitro*.

Les macrophages sont les cibles préférentielles des leishmanies et sont capables de participer à l'orchestration de la réponse granulomateuse et à la résolution de l'infection (Bogdan et al., 2000b; Basu et Ray, 2005). Ils correspondent à l'une des populations les plus enrichies dans le foie, et constituent la source principale de ST2 dans le foie des souris BALB/c en réponse à *L. donovani*. Ils sont aussi décrits dans la littérature comme une source possible d'IL-33 (Schmitz et al., 2005; Ohno et al., 2009; Chang et al., 2011; Rani et al., 2011; Talabot-Ayer et al., 2012). Ils constituent donc un modèle de choix pour l'étude de l'axe IL-33/ST2 en réponse à une infection par *L. donovani*. Au sein de l'IRD UMR 152 à Toulouse, l'équipe « Macrophages et Récepteurs Nucléaires dans l'inflammation et l'infection » a développé un intéressant modèle d'étude du phénotype des macrophages péritonéaux murins après un traitement par des cytokines telles que l'IL-13, dans le cas d'infections par des parasites ou des levures (Coste et al., 2008; Gales et al., 2010; Lefevre et al., 2010; Olganier et al., 2011). L'extrapolation de ce modèle à l'étude du rôle de l'IL-33 a permis d'obtenir le résultat préliminaire suivant : l'infection par *L. donovani* induit une sécrétion significative d'IL-33, dosée par ELISA dans le surnageant de culture. Les macrophages sont donc une source possible d'IL-33 au cours de la leishmaniose viscérale. De plus, le traitement de

macrophages péritonéaux avec de l'IL-33 recombinante a induit une répression significative de NF- κ B, confortant les résultats obtenus chez la souris. L'IL-33 endogène sécrétée par les macrophages en réponse à l'infection par *L. donovani* pourrait donc agir via ST2, comme un répresseur autocrine de l'expression de NF- κ B, induisant potentiellement la répression de cytokines Th1 et de chimiokines en conséquence.

Par ailleurs, les macrophages sont caractérisés par une plasticité remarquable se traduisant par l'apparition de différentes sous-populations macrophagiques présentant des phénotypes et des fonctions différentes en réponse aux signaux environnementaux. Les macrophages de type M1 activés dans un environnement Th1 sont classiquement associés à une réponse pro-inflammatoire et au contrôle des infections par les pathogènes intracellulaires. A l'inverse, les macrophages alternatifs M2 activés dans un environnement Th2 sont plus volontiers associés à une réponse régulatrice limitant les dommages tissulaires, mais propice au contrôle de pathogènes extracellulaires tels que les helminthes et les champignons (Mosser et Edwards, 2008). Sur la lignée cellulaire RAW264.7, l'IL-33 induit un phénotype macrophagique alternatif associé à la production de médiateurs anti-inflammatoires dans un environnement Th2 (Hazlett et al., 2010). A l'inverse, les réponses primaires à l'IL-33 des macrophages humains naïfs dérivés de la moelle osseuse exprimant constitutivement ST2 favorisent la production de chimiokines M1. Néanmoins, l'ajout d'IL-33 à des macrophages M2 préalablement polarisés amplifie l'expression de chimiokines M2, suggérant donc que l'IL-33 est capable d'amplifier à la fois les réponses M1 et M2 (Joshi et al., 2010). Il serait donc intéressant de caractériser le rôle de l'IL-33 sur la polarisation des macrophages péritonéaux des souris BALB/c et C57BL/6, et leur profil d'expression cytokinique et chimiokinique après infection par *L. donovani*.

Enfin, le foie est caractérisé par un micro-environnement particulier susceptible d'influencer la réponse immune anti-leishmanienne (Sheth et Bankey, 2001; Cabillic et al., 2006; Donaghy et al., 2010). Afin de se rapprocher des conditions physiologiques de la réponse hépatique au cours de la leishmaniose viscérale, il serait donc intéressant de développer un modèle de macrophages péritonéaux traités par de l'IL-33 recombinante et infectés ou non par *L. donovani* en milieu conditionné hépatique, en employant le modèle précédemment établi au laboratoire pour l'étude des cellules dendritiques hépatiques (Cabillic et al., 2006; Donaghy et al., 2010). Ainsi, ces travaux préliminaires sur les macrophages péritonéaux murins offrent de nombreuses perspectives pour l'étude fine des mécanismes induits par l'IL-33 dans le contexte d'une infection par *Leishmania*, en intégrant l'importance du micro-environnement tissulaire.

L'interleukine 33 modifie la réponse de manière différentielle selon le fond génétique résistant ou sensible à Leishmania

L'ensemble de nos travaux suggère que la voie IL-33/ST2 est associée à la répression de la réponse Th1 et de l'infiltrat myéloïde probablement induite par les macrophages ST2⁺ recrutés dans le foie des souris BALB/c infectées par *L. donovani*. Or, la production d'IL-12 et d'IFN- γ ainsi que l'infiltrat de monocytes et polynucléaires neutrophiles sont essentiels au contrôle de la charge parasitaire hépatique. Ainsi, chez les souris BALB/c sauvages, la charge parasitaire hépatique est significativement plus élevée que chez les souris ST2^{-/-} à 60 jours post-infection. La déficience en ST2 semble donc restaurer les capacités de contrôle de l'infection chez la souris BALB/c, suggérant un rôle délétère de l'IL-33 au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale chez la souris BALB/c. Dans le cas d'un traitement avec de l'IL-33 recombinante, une tendance à des charges parasitaires plus hautes est observée chez les souris traitées dans les conditions de notre expérience et seront prochainement analysées par biologie moléculaire. Ainsi, l'injection d'IL-33 recombinante conforte les résultats sur le rôle possible de l'IL-33 comme facteur de susceptibilité à la leishmaniose viscérale chez les souris BALB/c. La présence d'un grand nombre de cellule IL-33⁺ dans la rate incapable de contrôler l'infection leishmanienne (donnée non montrée) va dans le même sens.

Chez des souris C57BL/6 déficientes en IL-33 ou traitées avec de l'IL-33 recombinante, un rôle positif quoique modeste de l'IL-33 dans le recrutement cellulaire précoce des cellules lymphoïdes et myéloïdes est observé. Les différences obtenues avec les multiples modèles déployés au cours de ce travail peuvent être attribuées aux fonds génétiques des souris utilisées. L'axe IL-33/ST2 chez les souris BALB/c limite la mise en place d'une réponse Th1 nécessaire au contrôle de la charge parasitaire au profit d'une réponse Th2 exacerbée. A l'inverse, chez des souris C57Bl/6 capables de contrôler efficacement l'infection leishmanienne par la mise en place d'une réponse Th1, l'axe IL-33/ST2 pourrait avoir un rôle précoce modeste, mais néanmoins favorable à une réponse hépatique efficace. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. Tout d'abord, l'IL-33 pourrait jouer un rôle favorable via une action pro-Th2 limitant le développement de l'immuno-pathologie liée à une réponse Th1 et un infiltrat neutrophilique exacerbés et potentiellement délétères. Néanmoins, si l'IL-33 est classiquement décrite comme une cytokine Th2 (Schmitz et al., 2005; Liew et al., 2010; Seidelin et al., 2011), quelques études l'associent volontiers à l'immunité Th1. L'action favorable de l'IL-33 au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale chez les souris C57BL/6 pourrait donc résulter du renforcement de l'immunité efficace Th1. En effet, l'IL-33 est

capable d'amplifier à la fois les réponses Th1 et Th2 au niveau des basophiles, iNKT et NK purifiés à partir de sang humain, ainsi qu'au niveau des lymphocytes Th2 réactifs provenant de sujets allergiques (Smithgall et al., 2008). Une autre étude a également décrit l'IL-33 comme induisant, au niveau des lymphocytes NK et NKT, la production d'IL-4 et d'IL-13 en présence d'IL-4, mais comme induisant la production d'IFN- γ dans un environnement Th1 caractérisé par la présence d'IL-12 (Bourgeois et al., 2009). L'action pro-Th1 de l'IL-33 semble donc préférentiellement inféodée aux cellules de l'immunité innée. Il serait intéressant d'étudier les effets précoces de l'IL-33 sur une cinétique d'infection courte permettant d'envisager une éventuelle fonction d'alarmine, comme décrit dans d'autres pathologies telle que l'hépatite aiguë (Arshad et al., 2011; Arshad et al., 2012a). Les lymphocytes iNKT, rapidement recrutés dans le foie en réponse à l'infection par *L. donovani* chez la souris C57BL/6, jouent un rôle important dans la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines participant à l'organisation harmonieuse des granulomes et la clairance parasitaire résultante (Robert-Gangneux et al., 2012). Un éventuel dialogue précoce entre l'IL-33 et les lymphocytes iNKT durant les premiers jours suivant l'infection par *L. donovani* chez les souris C57BL/6 et BALB/c mérite donc d'être examiné.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux indique que l'axe IL-33/ST2 joue un rôle dans le foie au cours de la leishmaniose viscérale humaine et expérimentale. Chez la souris BALB/c, l'IL-33 est associée à la répression de l'immunité Th1 et des chimiokines assurant le recrutement de cellules myéloïdes essentielles au contrôle efficace de l'infection. La place de l'IL-33 comme un bio-marqueur pertinent de l'infection chez les sujets susceptibles est donc à explorer sur de plus larges séries. Toutefois, un rôle possiblement différent de l'IL-33 chez des hôtes plus résistants est envisageable, au regard de travaux préliminaires réalisés chez la souris C57BL/6. Ces données peuvent préfigurer les différences de réponse chez l'Homme entre un hôte susceptible de présenter une infection évolutive et un hôte résistant qui pourra rester asymptomatique après infection. L'ensemble des modèles employés dans ce travail, in vitro et in vivo chez l'Homme et la souris, ouvre de nombreuses perspectives pour l'étude fine du rôle l'IL-33 au cours de la leishmaniose humaine et expérimentale, dans les stades précoces de la maladie comme aux stades tardifs éventuellement associés à une fibrose hépatique. Des modèles cellulaires tels que les macrophages péritonéaux murins infectés par *L. donovani* devraient permettre d'approfondir davantage les résultats obtenus et à venir par une approche plus mécanistique.

Contribution à d'autres projets de l'équipe

Partie I : Etude du rôle des lymphocytes NKT invariants au cours de la leishmaniose viscérale expérimentale chez la souris C57BL/6

I. Contexte

Le développement des granulomes inflammatoires autour des cellules de Kupffer infectées est nécessaire à la clairance parasitaire au cours de la leishmaniose viscérale. Les lymphocytes NKT invariants (iNKT) sont des cellules T prédominantes dans le foie de souris et peuvent synthétiser de grandes quantités d'IL-4 et d'IFN- γ , deux cytokines impliqués dans la formation granulomateuse.

II. Matériel et méthodes

Dans cette étude, nous avons analysé le rôle des lymphocytes iNKT dans la réponse immune hépatique au cours de l'infection par *L. donovani*, sur un modèle de souris C57BL/6 sauvages ou déficientes en iNKT (*J α 18^{-/-}*) sacrifiées 15, 30 ou 60 jours après infection. La charge parasitaire hépatique a été quantifiée par calcul des Leishman Donovan Unit (LDU), l'expression cytokinique a été étudiée par PCR quantitative et ELISA, l'infiltrat cellulaire a été caractérisé par cytométrie en flux et la formation granulomateuse a été analysée par immuno-histochimie.

III. Résultats

Alors que les animaux sauvages ont rapidement contrôlé l'infection et développé une réponse inflammatoire associée à un influx massif de lymphocytes iNKT observés par cytométrie en flux, les souris *J α 18^{-/-}* ont présenté des charges parasitaires significativement plus élevées à chaque point de la cinétique, associées à un retard de maturation des granulomes. L'analyse du transcriptome cytokinique a montré que les ARNm de 90 gènes codant des chimiokines, cytokines et leurs récepteurs étaient réprimés chez les souris *J α 18^{-/-}* sur 101 gènes étudiés. La quantité d'IL-4 et TNF- α détectée par ELISA dans des extraits hépatiques était également significativement réduite chez les souris *J α 18^{-/-}*. En accord avec l'analyse par cytométrie en flux, le profil du cytokinome des souris sauvages présentait un biais d'expression vers des chimiokines attirant les lymphocytes T à J15, et

un changement vers l'expression de granulocytes et/ou monocytes à J60. Chez les souris $J\alpha 18^{-/-}$. L'expression significativement réprimée des ARNm CXCL5, CCL2 et CXCL2 a été corrélée avec un défaut d'attraction de cellules exprimant la myéloperoxydase observé par immuno-histochimie et avec un infiltrat de granulocytes et monocytes dans le foie comme démontré par cytométrie en flux.

IV. Conclusion

Ces données indiquent que les lymphocytes iNKT jouent un rôle précoce et soutenu dans la réponse cytokinique pro-inflammatoire, contribuant à l'organisation de granulomes hépatiques efficaces et ainsi à la clairance parasitaire.

➔ **Article 3** : Invariant NKT cells drive hepatic cytokinic microenvironment favoring efficient granuloma formation and early control of *Leishmania donovani* infection. Robert-Gangeux, Drogoul, Rostan et al., PLoS One, 2012.

Article 3

Invariant NKT cells drive hepatic cytokinic microenvironment favoring efficient granuloma formation and early control of *Leishmania donovani* infection.

Robert-Gangeux, Drogoul, Rostan et al., PLoS One, 2012.

Partie II : Etude des propriétés immunostimulatrices des cellules dendritiques humaines infectées par *Leishmania donovani* dans un modèle de micro-environnement hépatique in vitro

I. Contexte

Les cellules dendritiques hépatiques favorisent une réponse suppressive susceptible de contribuer à la tolérance hépatique. L'objectif de ce travail était l'étude de l'impact du micro-environnement hépatique sur les propriétés immunes des cellules dendritiques infectées par *L. donovani*, et de rechercher un impact potentiel des propriétés tolérogènes des cellules dendritiques hépatiques dans la réponse anti-leishmanienne.

II. Matériel et méthodes

Un modèle approprié de cellules dendritiques différenciées à partir de monocytes a été développé, avec des milieux conditionnés provenant de cellules épithéliales biliaires de rat ou de cellules non parenchymateuses de foie humain. Ces cellules ont ensuite été infectées, dans le but d'étudier leurs propriétés fonctionnelles par cytométrie en flux, ELISA et réaction mixte lymphocytaire.

III. Résultats

Les cellules dendritiques différenciées en milieu conditionné hépatique présentaient un phénotype CD14⁺ CD16⁺ CD123⁺, soit un phénotype semi-mature intermédiaire entre monocytes et cellules dendritiques. Elles sécrétaient peu d'IL-12p70 et beaucoup d'IL-10, et avaient une capacité altérée à stimuler la prolifération des lymphocytes T allogéniques et la sécrétion d'IFN- γ . L'infection de ces cellules dendritiques hépatiques par *L. donovani* a restauré leur capacité de stimulation de la prolifération des lymphocytes T allogéniques, et induit la sécrétion d'IFN- γ .

IV. Conclusion

Les propriétés immunostimulatrices spécifiques des cellules dendritiques hépatiques infectées pourraient amplifier la maturation des granulomes hépatiques dépendante de l'IFN- γ , assurant ainsi le contrôle de l'infection hépatique au cours de la leishmaniose viscérale.

➔ **Article 4** : Immunostimulatory properties of dendritic cells after *Leishmania donovani* using an in vitro model of liver microenvironment. Donaghy, Cabillic, Corlu, Rostan et al., PLoS Neglected Tropical Diseases, 2012.

Article 4

**Immunostimulatory properties of dendritic cells after *Leishmania donovani*
using an in vitro model of liver microenvironment.**

Donaghy, Cabillic, Corlu, Rostan et al., PLoS Neglected Tropical Diseases, 2012.

Bibliographie

- Adak S, Datta AK. 2005. *Leishmania major* encodes an unusual peroxidase that is a close homologue of plant ascorbate peroxidase: a novel role of the transmembrane domain. *Biochem J* 390:465-474.
- Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, Solbach W, Laskay T. 2002. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol* 169:898-905.
- Akuffo H, Maasho K, Howe R. 1993. Natural and acquired resistance to *Leishmania*: cellular activation by *Leishmania aethiopica* of mononuclear cells from unexposed individuals is through the stimulation of natural killer (NK) cells. *Clin Exp Immunol* 94:516-521.
- Alexander J, Brombacher F, McGachy HA, McKenzie AN, Walker W, Carter KC. 2002. An essential role for IL-13 in maintaining a non-healing response following *Leishmania mexicana* infection. *Eur J Immunol* 32:2923-2933.
- Alexander J, Carter KC, Al-Fasi N, Satoskar A, Brombacher F. 2000. Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol* 30:2935-2943.
- Ali S, Huber M, Kollewe C, Bischoff SC, Falk W, Martin MU. 2007. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18660-18665.
- Ali S, Mohs A, Thomas M, Klare J, Ross R, Schmitz ML, Martin MU. 2011. The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF-kappaB to dampen NF-kappaB-stimulated gene transcription. *J Immunol* 187:1609-1616.
- Almeida-Campos FR, Horta MF. 2000. Proteolytic activation of leishporin: evidence that *Leishmania amazonensis* and *Leishmania guyanensis* have distinct inactive forms. *Mol Biochem Parasitol* 111:363-375.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, Lopez-Velez R, Moreno J. 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 21:334-359, table of contents.
- Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, Molina R, Moreno J. 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 10:298-319.
- Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7:e35671.
- Alvar J, Yactayo S, Bern C. 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 22:552-557.
- Alves-Filho JC, Sonogo F, Souto FO, Freitas A, Verri WA, Jr., Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, McKenzie AN, Xu D, Cunha FQ, Liew FY. 2010. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med* 16:708-712.
- Amprey JL, Spath GF, Porcelli SA. 2004. Inhibition of CD1 expression in human dendritic cells during intracellular infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 72:589-592.
- Andrade BB, de Oliveira CI, Brodskyn CI, Barral A, Barral-Netto M. 2007. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Scand J Immunol* 66:122-127.
- Andrade MV, Iwaki S, Ropert C, Gazzinelli RT, Cunha-Melo JR, Beaven MA. 2011. Amplification of cytokine production through synergistic activation of NFAT and AP-1 following stimulation of mast cells with antigen and IL-33. *Eur J Immunol* 41:760-772.
- Angarano G, Maggi P, Rollo MA, Larocca AM, Quarto M, Scalone A, Gradoni L. 1998. Diffuse necrotic hepatic lesions due to visceral leishmaniasis in AIDS. *J Infect* 36:167-169.
- Antoine J, Lang T, Prina E. 1999. Biologie cellulaire des *Leishmania*. Dans : *Les leishmanioses*, Dedet, JP., Ellipses ed.
- Antoine JC, Prina E, Courret N, Lang T. 2004. *Leishmania* spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. *Adv Parasitol* 58:1-68.
- Arshad MI, Piquet-Pellorce C, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Patrat-Delon S, Ezan F, Lucas-Clerc C, Nabti S, Lehuen A, Cubero FJ, Girard JP, Trautwein C, Samson M. 2012a. TRAIL but not FasL and TNFalpha, regulates IL-33 expression in murine hepatocytes during acute hepatitis. *Hepatology* 56:2353-2362.

- Arshad MI, Piquet-Pellorce C, Samson M. 2012b. IL-33 and HMGB1 alarmins: sensors of cellular death and their involvement in liver pathology. *Liver Int* 32:1200-1210.
- Arshad MI, Rauch M, L'Helgoualc'h A, Julia V, Leite-de-Moraes MC, Lucas-Clerc C, Piquet-Pellorce C, Samson M. 2011. NKT cells are required to induce high IL-33 expression in hepatocytes during ConA-induced acute hepatitis. *Eur J Immunol* 41:2341-2348.
- Ayimba E, Hegewald J, Segbena AY, Gantin RG, Lechner CJ, Agossou A, Banla M, Soboslay PT. 2011. Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol* 166:218-226.
- Babaloo Z, Kaye PM, Eslami MB. 2001. Interleukin-13 in Iranian patients with visceral leishmaniasis: relationship to other Th2 and Th1 cytokines. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95:85-88.
- Bacellar O, Barral-Netto M, Badaro R, Carvalho EM. 1991. Gamma interferon production by lymphocytes from children infected with *L. chagasi*. *Braz J Med Biol Res* 24:791-795.
- Bacellar O, Brodskyn C, Guerreiro J, Barral-Netto M, Costa CH, Coffman RL, Johnson WD, Carvalho EM. 1996. Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 173:1515-1518.
- Bacellar O, D'Oliveira A, Jr., Jeronimo S, Carvalho EM. 2000. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine* 12:1228-1231.
- Badaro R, Falcoff E, Badaro FS, Carvalho EM, Pedral-Sampaio D, Barral A, Carvalho JS, Barral-Netto M, Brandely M, Silva L, et al. 1990. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. *N Engl J Med* 322:16-21.
- Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson WD, Jr. 1986. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 154:1003-1011.
- Baekkevold ES, Roussigne M, Yamanaka T, Johansen FE, Jahnsen FL, Amalric F, Brandtzaeg P, Erard M, Haraldsen G, Girard JP. 2003. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol* 163:69-79.
- Bahrenscheer J, Kemp M, Kurtzhals JA, Gachihi GS, Kharazmi A, Theander TG. 1995. Interferon-gamma and interleukin-4 production by human T cells recognizing *Leishmania donovani* antigens separated by SDS-PAGE. *APMIS* 103:131-139.
- Balato A, Lembo S, Mattii M, Schiattarella M, Marino R, De Paulis A, Balato N, Ayala F. 2012. IL-33 is secreted by psoriatic keratinocytes and induces pro-inflammatory cytokines via keratinocyte and mast cell activation. *Exp Dermatol* 21:892-894.
- Balkhair A, Ben Abid F. 2008. Gastric and cutaneous dissemination of visceral leishmaniasis in a patient with advanced HIV. *Int J Infect Dis* 12:111-113.
- Barlow JL, Bellosi A, Hardman CS, Drynan LF, Wong SH, Cruickshank JP, McKenzie AN. 2012. Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 129:191-198 e191-194.
- Barr SD, Gedamu L. 2003. Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. *J Biol Chem* 278:10816-10823.
- Barral-Netto M, Barral A. 1994. Transforming growth factor-beta in tegumentary leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 27:1-9.
- Bartemes KR, Iijima K, Kobayashi T, Kephart GM, McKenzie AN, Kita H. 2012. IL-33-responsive lineage- CD25+ CD44(hi) lymphoid cells mediate innate type 2 immunity and allergic inflammation in the lungs. *J Immunol* 188:1503-1513.
- Basset D, Faraut F, Marty P, Dereure J, Rosenthal E, Mary C, Pratlong F, Lachaud L, Bastien P, Dedet JP. 2005. Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. *Microbes Infect* 7:1370-1375.
- Basu MK, Ray M. 2005. Macrophage and *Leishmania*: an unacceptable coexistence. *Crit Rev Microbiol* 31:145-154.
- Bates PA. 2008. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol* 11:340-344.

- Bates PA, Rogers ME. 2004. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med* 4:601-609.
- Bautista G, Ramos A, Gil S. 2012. Visceral leishmaniasis in hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Int* 25:e83-85.
- Beattie L, Peltan A, Maroof A, Kirby A, Brown N, Coles M, Smith DF, Kaye PM. 2010a. Dynamic imaging of experimental *Leishmania donovani*-induced hepatic granulomas detects Kupffer cell-restricted antigen presentation to antigen-specific CD8 T cells. *PLoS Pathog* 6:e1000805.
- Beattie L, Svensson M, Bune A, Brown N, Maroof A, Zubairi S, Smith KR, Kaye PM. 2010b. *Leishmania donovani*-induced expression of signal regulatory protein alpha on Kupffer cells enhances hepatic invariant NKT-cell activation. *Eur J Immunol* 40:117-123.
- Becerra A, Warke RV, de Bosch N, Rothman AL, Bosch I. 2008. Elevated levels of soluble ST2 protein in dengue virus infected patients. *Cytokine* 41:114-120.
- Bedossa P, Paradis V. 1995. Transforming growth factor-beta (TGF-beta): a key-role in liver fibrogenesis. *J Hepatol* 22:37-42.
- Belkaid Y, Butcher B, Sacks DL. 1998. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur J Immunol* 28:1389-1400.
- Beltran CJ, Nunez LE, Diaz-Jimenez D, Farfan N, Candia E, Heine C, Lopez F, Gonzalez MJ, Quera R, Hermoso MA. 2010. Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 16:1097-1107.
- Bergers G, Reikerstorfer A, Braselmann S, Graninger P, Busslinger M. 1994. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene *Fit-1* generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *EMBO J* 13:1176-1188.
- Besnard AG, Togbe D, Guillou N, Erard F, Quesniaux V, Ryffel B. 2011. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur J Immunol* 41:1675-1686.
- Bhattarai NR, Van der Auwera G, Khanal B, De Doncker S, Rijal S, Das ML, Uranw S, Ostyn B, Praet N, Speybroeck N, Picado A, Davies C, Boelaert M, Dujardin JC. 2009. PCR and direct agglutination as *Leishmania* infection markers among healthy Nepalese subjects living in areas endemic for Kala-Azar. *Trop Med Int Health* 14:404-411.
- Blackwell JM, Barton CH, White JK, Roach TI, Shaw MA, Whitehead SH, Mock BA, Searle S, Williams H, Baker AM. 1994. Genetic regulation of leishmanial and mycobacterial infections: the *Lsh/Ity/Bcg* gene story continues. *Immunol Lett* 43:99-107.
- Blank C, Fuchs H, Rappersberger K, Rollinghoff M, Moll H. 1993. Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J Infect Dis* 167:418-425.
- Blom L, Poulsen BC, Jensen BM, Hansen A, Poulsen LK. 2011. IL-33 induces IL-9 production in human CD4+ T cells and basophils. *PLoS One* 6:e21695.
- Blom L, Poulsen LK. 2012. IL-1 family members IL-18 and IL-33 upregulate the inflammatory potential of differentiated human Th1 and Th2 cultures. *J Immunol* 189:4331-4337.
- Blos M, Schleicher U, Soares Rocha FJ, Meissner U, Rollinghoff M, Bogdan C. 2003. Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. *Eur J Immunol* 33:1224-1234.
- Boelaert M, Meheus F, Sanchez A, Singh SP, Vanlerberghe V, Picado A, Meessen B, Sundar S. 2009. The poorest of the poor: a poverty appraisal of households affected by visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Trop Med Int Health* 14:639-644.
- Bogdan C. 2008. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol* 10:1221-1234.
- Bogdan C, Donhauser N, Doring R, Rollinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG. 2000a. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med* 191:2121-2130.
- Bogdan C, Rollinghoff M. 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 28:121-134.

- Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. 2000b. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 12:64-76.
- Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. 2000c. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 173:17-26.
- Bonilla WV, Frohlich A, Senn K, Kallert S, Fernandez M, Johnson S, Kreutzfeldt M, Hegazy AN, Schrick C, Fallon PG, Klemenz R, Nakae S, Adler H, Merkler D, Lohning M, Pinschewer DD. 2012. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8(+) T cell responses. *Science* 335:984-989.
- Borish L, Steinke JW. 2011. Interleukin-33 in asthma: how big of a role does it play? *Curr Allergy Asthma Rep* 11:7-11.
- Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, Gombert JM, Schneider E, Dy M, Gourdy P, Girard JP, Herbelin A. 2009. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur J Immunol* 39:1046-1055.
- Bourgeois EA, Levescot A, Diem S, Chauvineau A, Berges H, Milpied P, Lehuen A, Damotte D, Gombert JM, Schneider E, Girard JP, Gourdy P, Herbelin A. 2011. A natural protective function of invariant NKT cells in a mouse model of innate-cell-driven lung inflammation. *Eur J Immunol* 41:299-305.
- Bourgeois N, Bastien P, Reynes J, Makinson A, Rouanet I, Lachaud L. 2010. 'Active chronic visceral leishmaniasis' in HIV-1-infected patients demonstrated by biological and clinical long-term follow-up of 10 patients. *HIV Med* 11:670-673.
- Bourgeois N, Lachaud L, Reynes J, Rouanet I, Mahamat A, Bastien P. 2008. Long-term monitoring of visceral leishmaniasis in patients with AIDS: relapse risk factors, value of polymerase chain reaction, and potential impact on secondary prophylaxis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 48:13-19.
- Brewig N, Kissenpfennig A, Malissen B, Veit A, Bickert T, Fleischer B, Mostbock S, Ritter U. 2009. Priming of CD8+ and CD4+ T cells in experimental leishmaniasis is initiated by different dendritic cell subtypes. *J Immunol* 182:774-783.
- Brint EK, Xu D, Liu H, Dunne A, McKenzie AN, O'Neill LA, Liew FY. 2004. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol* 5:373-379.
- Brittingham A, Chen G, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. 1999. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infect Immun* 67:4477-4484.
- Brunner M, Krenn C, Roth G, Moser B, Dworschak M, Jensen-Jarolim E, Spittler A, Sautner T, Bonaros N, Wolner E, Boltz-Nitulescu G, Ankersmit HJ. 2004. Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma. *Intensive Care Med* 30:1468-1473.
- Buckley JM, Liu JH, Li CH, Blankson S, Wu QD, Jiang Y, Redmond HP, Wang JH. 2011. Increased susceptibility of ST2-deficient mice to polymicrobial sepsis is associated with an impaired bactericidal function. *J Immunol* 187:4293-4299.
- Bulek K, Swaidani S, Qin J, Lu Y, Gulen MF, Herjan T, Min B, Kastelein RA, Aronica M, Kosz-Vnenchak M, Li X. 2009. The essential role of single Ig IL-1 receptor-related molecule/Toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response. *J Immunol* 182:2601-2609.
- Cabillic F, Rougier N, Basset C, Lecouillard I, Quelvennec E, Toujas L, Guguen-Guillouzo C, Corlu A. 2006. Hepatic environment elicits monocyte differentiation into a dendritic cell subset directing Th2 response. *J Hepatol* 44:552-559.
- Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, van Weyenbergh J, Brodskyn C, Costa J, Barral-Netto M, Barral A. 2005. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis* 5:113.
- Campo GM, Avenoso A, D'Ascola A, Scuruchi M, Prestipino V, Calatroni A, Campo S. 2012. 6-Mer hyaluronan oligosaccharides increase IL-18 and IL-33 production in mouse synovial fibroblasts subjected to collagen-induced arthritis. *Innate Immun* 18:675-684.

- Carambia A, Frenzel C, Bruns OT, Schwinge D, Reimer R, Hohenberg H, Huber S, Tiegs G, Schramm C, Lohse AW, Herkel J. 2013. Inhibition of inflammatory CD4 T cell activity by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* 58:112-118.
- Carrera L, Gazzinelli RT, Badolato R, Hieny S, Muller W, Kuhn R, Sacks DL. 1996. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med* 183:515-526.
- Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, Bouche G, Girard JP. 2007. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:282-287.
- Carvalho EM, Bacellar O, Barral A, Badaro R, Johnson WD, Jr. 1989. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *J Clin Invest* 83:860-864.
- Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG. 1994. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol* 152:5949-5956.
- Carvalho EM, Bacellar OA, Reed S, Barral A, Rocha H. 1988. Visceral leishmaniasis: a disease associated with inability of lymphocytes to activate macrophages to kill leishmania. *Braz J Med Biol Res* 21:85-92.
- Carvalho EM, Badaro R, Reed SG, Jones TC, Johnson WD, Jr. 1985. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest* 76:2066-2069.
- Castilho TM, Goldsmith-Pestana K, Lozano C, Valderrama L, Saravia NG, McMahon-Pratt D. 2010. Murine model of chronic *L. (Viannia) panamensis* infection: role of IL-13 in disease. *Eur J Immunol* 40:2816-2829.
- Cayrol C, Girard JP. 2009. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9021-9026.
- Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184:747-752.
- Cervia JS, Rosen H, Murray HW. 1993. Effector role of blood monocytes in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 61:1330-1333.
- Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE, Schmitz J, Pflanz S, Kastelein RA. 2007. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol* 179:2551-2555.
- Chakraborty D, Banerjee S, Sen A, Banerjee KK, Das P, Roy S. 2005. *Leishmania donovani* affects antigen presentation of macrophage by disrupting lipid rafts. *J Immunol* 175:3214-3224.
- Chan J, Fujiwara T, Brennan P, McNeil M, Turco SJ, Sibille JC, Snapper M, Aisen P, Bloom BR. 1989. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2453-2457.
- Chan SH, Kobayashi M, Santoli D, Perussia B, Trinchieri G. 1992. Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J Immunol* 148:92-98.
- Chang KP. 1981. Antibody-mediated inhibition of phagocytosis in *Leishmania donovani*-human phagocyte interactions in vitro. *Am J Trop Med Hyg* 30:334-339.
- Chang YJ, Kim HY, Albacker LA, Baumgarth N, McKenzie AN, Smith DE, Dekruyff RH, Umetsu DT. 2011. Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. *Nat Immunol* 12:631-638.
- Chen J, Duan L, Xiong A, Zhang H, Zheng F, Tan Z, Gong F, Fang M. 2012a. Blockade of IL-33 ameliorates Con A-induced hepatic injury by reducing NKT cell activation and IFN-gamma production in mice. *J Mol Med (Berl)* 90:1505-1515.
- Chen RQ, Zhou YB, Jiang LF, Song XX, Zhang ZJ, Ju LW, Jiang QW. 2012b. [Correlation between acute schistosomiasis japonica and serum interleukin-33 levels]. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi* 24:32-34, 39.

- Choi YS, Choi HJ, Min JK, Pyun BJ, Maeng YS, Park H, Kim J, Kim YM, Kwon YG. 2009. Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production. *Blood* 114:3117-3126.
- Choi YS, Park JA, Kim J, Rho SS, Park H, Kim YM, Kwon YG. 2012. Nuclear IL-33 is a transcriptional regulator of NF-kappaB p65 and induces endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 421:305-311.
- Chow JY, Wong CK, Cheung PF, Lam CW. 2010. Intracellular signaling mechanisms regulating the activation of human eosinophils by the novel Th2 cytokine IL-33: implications for allergic inflammation. *Cell Mol Immunol* 7:26-34.
- Chowdhury KD, Sen G, Sarkar A, Biswas T. 2011. Role of endothelial dysfunction in modulating the plasma redox homeostasis in visceral leishmaniasis. *Biochim Biophys Acta* 1810:652-665.
- Cillari E, Liew FY, Lo Campo P, Milano S, Mansueto S, Salerno A. 1988. Suppression of IL-2 production by cryopreserved peripheral blood mononuclear cells from patients with active visceral leishmaniasis in Sicily. *J Immunol* 140:2721-2726.
- Clauvel JP, Couderc LJ, Belmin J, Daniel MT, Rabian C, Seligmann M. 1986. Visceral leishmaniasis complicating acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80:1010-1011.
- Colebunders R, Depraetere K, Verstraeten T, Lambert J, Hauben E, Van Marck E, Maurer T, Banuls AL, Dujardin JC. 1999. Unusual cutaneous lesions in two patients with visceral leishmaniasis and HIV infection. *J Am Acad Dermatol* 41:847-850.
- Colomba C, Saporito L, Vitale F, Reale S, Vitale G, Casuccio A, Tolomeo M, Maranto D, Rubino R, Di Carlo P, Titone L. 2009. Cryptic *Leishmania infantum* infection in Italian HIV infected patients. *BMC Infect Dis* 9:199.
- Colomba C, Scarlata F, Salsa L, Frasca Polara V, Titone L. 2004. [Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. Report of two cases relapsed after specific therapy]. *Infez Med* 12:139-143.
- Conceicao-Silva F, Hahne M, Schroter M, Louis J, Tschopp J. 1998. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. *Eur J Immunol* 28:237-245.
- Corbett CE, Duarte MI, Bustamante SE. 1993. Regression of diffuse intralobular liver fibrosis associated with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 49:616-624.
- Coste A, Lagane C, Filipe C, Authier H, Gales A, Bernad J, Douin-Echinard V, Lepert JC, Balard P, Linas MD, Arnal JF, Auwerx J, Pipy B. 2008. IL-13 attenuates gastrointestinal candidiasis in normal and immunodeficient RAG-2(-/-) mice via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *J Immunol* 180:4939-4947.
- Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. 1999. *Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner. *Eur J Immunol* 29:203-214.
- Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. 2000. *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha. *Blood* 95:1642-1651.
- Courret N, Frehel C, Prina E, Lang T, Antoine JC. 2001. Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. *Parasitology* 122:263-279.
- Crocker PR, Blackwell JM, Bradley DJ. 1984. Transfer of innate resistance and susceptibility to *Leishmania donovani* infection in mouse radiation bone marrow chimaeras. *Immunology* 52:417-422.
- Cunningham D. 1885. *Scient Mem med Offrs Army India* 1:21.
- Currier JS, Lundgren JD, Carr A, Klein D, Sabin CA, Sax PE, Schouten JT, Smieja M. 2008. Epidemiological evidence for cardiovascular disease in HIV-infected patients and relationship to highly active antiretroviral therapy. *Circulation* 118:e29-35.

- Czaja MJ, Weiner FR, Flanders KC, Giambone MA, Wind R, Biempica L, Zern MA. 1989. In vitro and in vivo association of transforming growth factor-beta 1 with hepatic fibrosis. *J Cell Biol* 108:2477-2482.
- D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. 1993. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 178:1041-1048.
- D'Oliveira Junior A, Costa SR, Barbosa AB, Orge MdlG, Carvalho EM. 1997. Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92:15-20.
- Dale M, Nicklin MJ. 1999. Interleukin-1 receptor cluster: gene organization of IL1R2, IL1R1, IL1RL2 (IL-1Rrp2), IL1RL1 (T1/ST2), and IL18R1 (IL-1Rrp) on human chromosome 2q. *Genomics* 57:177-179.
- Dalton JE, Kaye PM. 2010. Immunomodulators: use in combined therapy against leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8:739-742.
- Das VN, Siddiqui NA, Verma RB, Topno RK, Singh D, Das S, Ranjan A, Pandey K, Kumar N, Das P. 2011. Asymptomatic infection of visceral leishmaniasis in hyperendemic areas of Vaishali district, Bihar, India: a challenge to kala-azar elimination programmes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105:661-666.
- de La Llave E, Lecoecur H, Besse A, Milon G, Prina E, Lang T. 2011. A combined luciferase imaging and reverse transcription polymerase chain reaction assay for the study of *Leishmania amastigote* burden and correlated mouse tissue transcript fluctuations. *Cell Microbiol* 13:81-91.
- de la Loma A, Alvar J, Martinez Galiano E, Blazquez J, Alcala Munoz A, Najera R. 1985. Leishmaniasis or AIDS? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79:421-422.
- de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. 1991. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174:1209-1220.
- Deak E, Jayakumar A, Cho KW, Goldsmith-Pestana K, Dondji B, Lambris JD, McMahon-Pratt D. 2010. Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. *Eur J Immunol* 40:1355-1368.
- Deniau M, Houin R. 1999. Manifestations cliniques et biologie des leishmanioses viscérales. Dans : *Les leishmanioses*, Dedet, JP., Ellipses ed.
- Dereure J, Duong Thanh H, Lavabre-Bertrand T, Cartron G, Bastides F, Richard-Lenoble D, Dedet JP. 2003. Visceral leishmaniasis. Persistence of parasites in lymph nodes after clinical cure. *J Infect* 47:77-81.
- Dermine JF, Goyette G, Houde M, Turco SJ, Desjardins M. 2005. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cell Microbiol* 7:1263-1270.
- Dermine JF, Scianimanico S, Prive C, Descoteaux A, Desjardins M. 2000. *Leishmania promastigotes* require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol* 2:115-126.
- Desjardins M, Descoteaux A. 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med* 185:2061-2068.
- Desjeux P, Alvar J. 2003. *Leishmania/HIV* co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 97 Suppl 1:3-15.
- Dinarello CA, Savage N. 1989. Interleukin-1 and its receptor. *Crit Rev Immunol* 9:1-20.
- Doherty TA, Khorram N, Chang JE, Kim HK, Rosenthal P, Croft M, Broide DH. 2012. STAT6 regulates natural helper cell proliferation during lung inflammation initiated by *Alternaria*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303:L577-588.
- Donaghy L, Cabillic F, Corlu A, Rostan O, Toutirais O, Guguen-Guillouzo C, Guiguen C, Gangneux JP. 2010. Immunostimulatory properties of dendritic cells after *Leishmania donovani* infection using an in vitro model of liver microenvironment. *PLoS Negl Trop Dis*

4:e703.

- Donaghy L, Gros F, Amiot L, Mary C, Maillard A, Guiguen C, Gangneux JP. 2007. Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 147:236-240.
- Dong R, Dong K, Wang X, Chen G, Shen C, Zheng S. 2013. Interleukin-33 overexpression is associated with gamma-glutamyl transferase in biliary atresia. *Cytokine* 61:433-437.
- Donovan C. 1903. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Br. Med. J.* ii:79.
- Dooley S, ten Dijke P. 2012. TGF-beta in progression of liver disease. *Cell Tissue Res* 347:245-256.
- Downing T, Imamura H, Decuypere S, Clark TG, Coombs GH, Cotton JA, Hilley JD, de Doncker S, Maes I, Mottram JC, Quail MA, Rijal S, Sanders M, Schonian G, Stark O, Sundar S, Vanaerschot M, Hertz-Fowler C, Dujardin JC, Berriman M. 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.
- Downing T, Stark O, Vanaerschot M, Imamura H, Sanders M, Decuypere S, de Doncker S, Maes I, Rijal S, Sundar S, Dujardin JC, Berriman M, Schonian G. 2012. Genome-wide SNP and microsatellite variation illuminate population-level epidemiology in the *Leishmania donovani* species complex. *Infect Genet Evol* 12:149-159.
- Drube S, Heink S, Walter S, Lohn T, Grusser M, Gerbault A, Berod L, Schons J, Dudeck A, Freitag J, Grotha S, Reich D, Rudeschko O, Norgauer J, Hartmann K, Roers A, Kamradt T. 2010. The receptor tyrosine kinase c-Kit controls IL-33 receptor signaling in mast cells. *Blood* 115:3899-3906.
- Duan L, Chen J, Zhang H, Yang H, Zhu P, Xiong A, Xia Q, Zheng F, Tan Z, Gong F, Fang M. 2012. Interleukin-33 ameliorates experimental colitis through promoting Th2/Foxp3(+) regulatory T-cell responses in mice. *Mol Med* 18:753-761.
- Duarte MI, Corbett CE. 1987. Histopathological patterns of the liver involvement in visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 29:131-136.
- Duarte MI, de Andrade HF, Jr., Takamura CF, Sesso A, Tuon FF. 2009. TGF-beta and mesenchymal hepatic involvement after visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 104:1129-1136.
- Dujardin JC, Campino L, Canavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, Mazeris A, Ozbel Y, Boelaert M. 2008. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis* 14:1013-1018.
- Dureau R, Robert-Gangneux F, Gangneux JP, Nugier-Chauvin C, Legentil L, Daniellou R, Ferrieres V. 2010. Synthetic UDP-furanoses inhibit the growth of the parasite *Leishmania*. *Carbohydr Res* 345:1299-1305.
- Dye C, Wolpert DM. 1988. Earthquakes, influenza and cycles of Indian kala-azar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82:843-850.
- Eberlein J, Nguyen TT, Victorino F, Golden-Mason L, Rosen HR, Homann D. 2010. Comprehensive assessment of chemokine expression profiles by flow cytometry. *J Clin Invest* 120:907-923.
- Ehrchen JM, Roebrock K, Foell D, Nippe N, von Stebut E, Weiss JM, Munck NA, Viemann D, Varga G, Muller-Tidow C, Schuberth HJ, Roth J, Sunderkotter C. 2010. Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. *PLoS Pathog* 6:e1000871.
- el Hag IA, Hashim FA, el Toum IA, Homeida M, el Kalifa M, el Hassan AM. 1994. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). *J Clin Pathol* 47:547-551.
- Elshafie AI, Hlin E, Hakansson LD, Elghazali G, Safi SH, Ronnelid J, Venge P. 2011. Activity and turnover of eosinophil and neutrophil granulocytes are altered in visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol* 41:463-469.
- Eltayeb A, Ibrahim K. 2012. Potential antileishmanial effect of three medicinal plants. *Indian J Pharm Sci* 74:171-174.

- England NWJ. 1986. Historical perspectives. *Journal of the Royal Army Medical Corps* 132:127-128.
- Engwerda CR, Ato M, Cotterell SE, Mynott TL, Tschannerl A, Gorak-Stolinska PM, Kaye PM. 2002. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. *Am J Pathol* 161:429-437.
- Engwerda CR, Ato M, Kaye PM. 2004a. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol* 20:524-530.
- Engwerda CR, Ato M, Stager S, Alexander CE, Stanley AC, Kaye PM. 2004b. Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in the control of *Leishmania donovani* infection. *Am J Pathol* 165:2123-2133.
- Engwerda CR, Kaye PM. 2000. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol Today* 21:73-78.
- Engwerda CR, Murphy ML, Cotterell SE, Smelt SC, Kaye PM. 1998. Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of *Leishmania donovani*. *Eur J Immunol* 28:669-680.
- Espinassous Q, Garcia-de-Paco E, Garcia-Verdugo I, Synguelakis M, von Aulock S, Sallenave JM, McKenzie AN, Kanellopoulos J. 2009. IL-33 enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse macrophages by regulating lipopolysaccharide receptor complex. *J Immunol* 183:1446-1455.
- Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson PM. 1992. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 149:4029-4035.
- Favali C, Tavares N, Clarencio J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn C. 2007. *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. *J Leukoc Biol* 82:1401-1406.
- Feterowski C, Novotny A, Kaiser-Moore S, Muhlradt PF, Rossmann-Bloeck T, Rump M, Holzmann B, Weighardt H. 2005. Attenuated pathogenesis of polymicrobial peritonitis in mice after TLR2 agonist pre-treatment involves ST2 up-regulation. *Int Immunol* 17:1035-1046.
- Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A. 2006. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med* 12:99-106.
- Fischer D, Moeller P, Thomas SM, Naucke TJ, Beierkuhnlein C. 2011. Combining climatic projections and dispersal ability: a method for estimating the responses of sandfly vector species to climate change. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1407.
- Friedman SL. 2008. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88:125-172.
- Funakoshi-Tago M, Tago K, Hayakawa M, Tominaga S, Ohshio T, Sonoda Y, Kasahara T. 2008. TRAF6 is a critical signal transducer in IL-33 signaling pathway. *Cell Signal* 20:1679-1686.
- Gaafar A, Kharazmi A, Ismail A, Kemp M, Hey A, Christensen CB, Dafalla M, el Kadaro AY, el Hassan AM, Theander TG. 1995. Dichotomy of the T cell response to *Leishmania* antigens in patients suffering from cutaneous leishmaniasis; absence or scarcity of Th1 activity is associated with severe infections. *Clin Exp Immunol* 100:239-245.
- Gabriel C, McMaster WR, Girard D, Descoteaux A. 2010. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *J Immunol* 185:4319-4327.
- Gachter T, Werenskiold AK, Klemenz R. 1996. Transcription of the interleukin-1 receptor-related T1 gene is initiated at different promoters in mast cells and fibroblasts. *J Biol Chem* 271:124-129.
- Gales A, Conduche A, Bernad J, Lefevre L, Olganier D, Beraud M, Martin-Blondel G, Linas MD, Auwerx J, Coste A, Pipy B. 2010. PPARgamma controls dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 6:e1000714.
- Gangneux JP. 1999. [Treatment of visceral leishmaniasis: recent modalities]. *Presse Med* 28:2057-

2066.

- Gangneux JP, Donaghy L, Marty P. 2006. [Liver involvement during visceral leishmaniasis]. *Gastroenterol Clin Biol* 30:1027-1032.
- Gangneux JP, Lemenand O, Reinhard Y, Guiguen C, Guguen-Guillouzo C, Gripon P. 2005. In vitro and ex vivo permissivity of hepatocytes for *Leishmania donovani*. *J Eukaryot Microbiol* 52:489-491.
- Gangneux JP, Poinsignon Y, Donaghy L, Amiot L, Tarte K, Mary C, Robert-Gangneux F. 2013. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity as a potential biomarker of immune suppression during visceral leishmaniasis. *Innate Immun.*
- Gangneux JP, Sulahian A, Garin YJ, Derouin F. 1996a. Lipid formulations of amphotericin b in the treatment of experimental visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90:574-577.
- Gangneux JP, Sulahian A, Garin YJ, Farinotti R, Derouin F. 1996b. Therapy of visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: experimental assessment of efficacy of AmBisome. *Antimicrob Agents Chemother* 40:1214-1218.
- Gantt KR, Schultz-Cherry S, Rodriguez N, Jeronimo SM, Nascimento ET, Goldman TL, Recker TJ, Miller MA, Wilson ME. 2003. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *J Immunol* 170:2613-2620.
- Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, Rubartelli A. 2002. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* 3:995-1001.
- Gasim S, Elhassan AM, Khalil EA, Ismail A, Kadaru AM, Kharazmi A, Theander TG. 1998. High levels of plasma IL-10 and expression of IL-10 by keratinocytes during visceral leishmaniasis predict subsequent development of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 111:64-69.
- Ghalib HW, Piuvezam MR, Skeiky YA, Siddig M, Hashim FA, el-Hassan AM, Russo DM, Reed SG. 1993. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J Clin Invest* 92:324-329.
- Ghalib HW, Whittle JA, Kubin M, Hashim FA, el-Hassan AM, Grabstein KH, Trinchieri G, Reed SG. 1995. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. *J Immunol* 154:4623-4629.
- Ghosh S, Goswami S, Adhya S. 2003. Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. *Biochem J* 369:447-452.
- Gibson ME. 1983. The identification of kala-azar and the discovery of *Leishmania donovani*. *Medical History* 27:203-213.
- Girard JP, Moussion C, Forster R. 2012. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 12:762-773.
- Girard JP, Springer TA. 1995. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* 16:449-457.
- Giudice A, Camada I, Leopoldo PT, Pereira JM, Riley LW, Wilson ME, Ho JL, de Jesus AR, Carvalho EM, Almeida RP. 2007. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 7:7.
- Goddard S, Youster J, Morgan E, Adams DH. 2004. Interleukin-10 secretion differentiates dendritic cells from human liver and skin. *Am J Pathol* 164:511-519.
- Goodbourn S. 1990. The regulation of beta-interferon gene expression. *Semin Cancer Biol* 1:89-95.
- Gorak PM, Engwerda CR, Kaye PM. 1998. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol* 28:687-695.
- Gorski S, Collin SM, Ritmeijer K, Keus K, Gatluak F, Mueller M, Davidson RN. 2010. Visceral leishmaniasis relapse in Southern Sudan (1999-2007): a retrospective study of risk factors and trends. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e705.
- Gregory DJ, Godbout M, Contreras I, Forget G, Olivier M. 2008. A novel form of NF-kappaB is

- induced by *Leishmania* infection: involvement in macrophage gene expression. *Eur J Immunol* 38:1071-1081.
- Gressner AM. 1992. Hepatic fibrogenesis: the puzzle of interacting cells, fibrogenic cytokines, regulatory loops, and extracellular matrix molecules. *Z Gastroenterol* 30 Suppl 1:5-16.
- Gueirard P, Laplante A, Rondeau C, Milon G, Desjardins M. 2008. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cell Microbiol* 10:100-111.
- Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, Wasunna MK, Bryceson AD. 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2:494-501.
- Guermopez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20:621-667.
- Guerrero CD, Arrieta AF, Ramirez ND, Rodriguez LS, Vega R, Bosch I, Rodriguez JA, Narvaez CF, Salgado DM. 2013. High plasma levels of soluble ST2 but not its ligand IL-33 is associated with severe forms of pediatric dengue. *Cytokine* 61:766-771.
- Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceicao-Silva F, Saraiva EM. 2009. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6748-6753.
- Guizani-Tabbane L, Ben-Aissa K, Belghith M, Sassi A, Dellagi K. 2004. *Leishmania major* amastigotes induce p50/c-Rel NF-kappa B transcription factor in human macrophages: involvement in cytokine synthesis. *Infect Immun* 72:2582-2589.
- Guo L, Wei G, Zhu J, Liao W, Leonard WJ, Zhao K, Paul W. 2009. IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13463-13468.
- Gutierrez Y, Maksem JA, Reiner NE. 1984. Pathologic changes in murine leishmaniasis (*Leishmania donovani*) with special reference to the dynamics of granuloma formation in the liver. *Am J Pathol* 114:222-230.
- Hailu A, Menon JN, Berhe N, Gedamu L, Hassard TH, Kager PA, Olobo J, Bretscher PA. 2001. Distinct immunity in patients with visceral leishmaniasis from that in subclinically infected and drug-cured people: implications for the mechanism underlying drug cure. *J Infect Dis* 184:112-115.
- Haldar JP, Ghose S, Saha KC, Ghose AC. 1983. Cell-mediated immune response in Indian kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Infect Immun* 42:702-707.
- Harder S, Bente M, Isermann K, Bruchhaus I. 2006. Expression of a mitochondrial peroxiredoxin prevents programmed cell death in *Leishmania donovani*. *Eukaryot Cell* 5:861-870.
- Harms G, Zwingenberger K, Sandkamp B, Omena S, Pedrosa C, Richter J, Rosenkaimer F, Feldmeier H, Bienzle U. 1993. Immunochemotherapy of visceral leishmaniasis: a pilot trial of sequential treatment with recombinant interferon-gamma and pentavalent antimony. *J Interferon Res* 13:39-41.
- Hasker E, Kansal S, Malaviya P, Gidwani K, Picado A, Singh RP, Chourasia A, Singh AK, Shankar R, Menten J, Wilson ME, Boelaert M, Sundar S. 2013. Latent infection with *Leishmania donovani* in highly endemic villages in Bihar, India. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2053.
- Hazlett LD, McClellan SA, Barrett RP, Huang X, Zhang Y, Wu M, van Rooijen N, Szliter E. 2010. IL-33 shifts macrophage polarization, promoting resistance against *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:1524-1532.
- Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 169:59-72.
- Heinzel FP, Schoenhaut DS, Rerko RM, Rosser LE, Gately MK. 1993. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 177:1505-1509.
- Henseleit U, Steinbrink K, Sunderkotter C, Goebeler M, Roth J, Sorg C. 1995. Expression of

- murine VCAM-1 in vitro and in different models of inflammation in vivo: correlation with immigration of monocytes. *Exp Dermatol* 4:249-256.
- Hepworth MR, Maurer M, Hartmann S. 2012. Regulation of type 2 immunity to helminths by mast cells. *Gut Microbes* 3:476-481.
- Hermoso T, Fishelson Z, Becker SI, Hirschberg K, Jaffe CL. 1991. Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. *EMBO J* 10:4061-4067.
- Heudier P, Taillan B, Garnier G, Marty P, Fuzibet JG, Dujardin P. 1993. [Pulmonary site of visceral leishmaniasis in HIV infection]. *Presse Med* 22:1060.
- Hide M, Marion E, Pomares C, Fisa R, Marty P, Banuls AL. 2013. Parasitic genotypes appear to differ in leishmaniasis patients compared with asymptomatic related carriers. *Int J Parasitol* 43:389-397.
- Holaday BJ. 1999. Immunotherapy for visceral leishmaniasis: ability of factors produced during anti-leishmania responses of skin test positive adults to inhibit peripheral blood mononuclear cell activities associated with visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:55-66.
- Holaday BJ. 2000. Role of CD8+ T cells in endogenous interleukin-10 secretion associated with visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:217-220.
- Holaday BJ, Pompeu MM, Jeronimo S, Texeira MJ, Sousa Ade A, Vasconcelos AW, Pearson RD, Abrams JS, Locksley RM. 1993. Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala azar. *J Clin Invest* 92:2626-2632.
- Holzmuller P, Hide M, Sereno D, Lemesre JL. 2006. *Leishmania infantum* amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. *Infect Genet Evol* 6:187-197.
- Holzmuller P, Sereno D, Lemesre JL. 2005. Lower nitric oxide susceptibility of trivalent antimony-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4406-4409.
- Homma Y, Cao S, Shi X, Ma X. 2007. The Th2 transcription factor c-Maf inhibits IL-12p35 gene expression in activated macrophages by targeting NF-kappaB nuclear translocation. *J Interferon Cytokine Res* 27:799-808.
- Honore S, Garin YJ, Sulahian A, Gangneux JP, Derouin F. 1998. Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 21:231-239.
- Hoogerwerf JJ, Tanck MW, van Zoelen MA, Wittebole X, Laterre PF, van der Poll T. 2010. Soluble ST2 plasma concentrations predict mortality in severe sepsis. *Intensive Care Med* 36:630-637.
- Hoover DL, Nacy CA, Meltzer MS. 1985. Human monocyte activation for cytotoxicity against intracellular *Leishmania donovani* amastigotes: induction of microbicidal activity by interferon-gamma. *Cell Immunol* 94:500-511.
- Horta MF, Mendes BP, Roma EH, Noronha FS, Macedo JP, Oliveira LS, Duarte MM, Vieira LQ. 2012. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol Res* 2012:203818.
- Hsu CL, Neilsen CV, Bryce PJ. 2010. IL-33 is produced by mast cells and regulates IgE-dependent inflammation. *PLoS One* 5:e11944.
- Huang X, Du W, Barrett RP, Hazlett LD. 2007. ST2 is essential for Th2 responsiveness and resistance to *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:4626-4633.
- Hudson CA, Christophi GP, Gruber RC, Wilmore JR, Lawrence DA, Massa PT. 2008. Induction of IL-33 expression and activity in central nervous system glia. *J Leukoc Biol* 84:631-643.
- Humphreys NE, Xu D, Hepworth MR, Liew FY, Grecis RK. 2008. IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *J Immunol* 180:2443-2449.
- Hung LY, Lewkowich IP, Dawson LA, Downey J, Yang Y, Smith DE, Herbert DR. 2013. IL-33 drives biphasic IL-13 production for noncanonical Type 2 immunity against hookworms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:282-287.
- Iizasa H, Yoneyama H, Mukaida N, Katakoka Y, Naito M, Yoshida N, Nakashima E, Matsushima K.

2005. Exacerbation of granuloma formation in IL-1 receptor antagonist-deficient mice with impaired dendritic cell maturation associated with Th2 cytokine production. *J Immunol* 174:3273-3280.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarlioni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J, Dobson DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasc AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Muller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'Neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schafer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309:436-442.
- Iwahana H, Hayakawa M, Kuroiwa K, Tago K, Yanagisawa K, Noji S, Tominaga S. 2004. Molecular cloning of the chicken ST2 gene and a novel variant form of the ST2 gene product, ST2LV. *Biochim Biophys Acta* 1681:1-14.
- Iwahana H, Yanagisawa K, Ito-Kosaka A, Kuroiwa K, Tago K, Komatsu N, Katashima R, Itakura M, Tominaga S. 1999. Different promoter usage and multiple transcription initiation sites of the interleukin-1 receptor-related human ST2 gene in UT-7 and TM12 cells. *Eur J Biochem* 264:397-406.
- Jarry D. 1999. Historiques des leishmanioses et de leurs complexes pathogènes. Dans : *Les leishmanioses*, Dedet, JP., Ellipses ed.
- Jiang HR, Milovanovic M, Allan D, Niedbala W, Besnard AG, Fukada SY, Alves-Filho JC, Togbe D, Goodyear CS, Lington C, Xu D, Lukic ML, Liew FY. 2012. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN-gamma production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol* 42:1804-1814.
- Jones LA, Roberts F, Nickdel MB, Brombacher F, McKenzie AN, Henriquez FL, Alexander J, Roberts CW. 2010. IL-33 receptor (T1/ST2) signalling is necessary to prevent the development of encephalitis in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Eur J Immunol* 40:426-436.
- Joshi AD, Oak SR, Hartigan AJ, Finn WG, Kunkel SL, Duffy KE, Das A, Hogaboam CM. 2010. Interleukin-33 contributes to both M1 and M2 chemokine marker expression in human macrophages. *BMC Immunol* 11:52.
- Joshi PB, Kelly BL, Kamhawi S, Sacks DL, McMaster WR. 2002. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol Biochem Parasitol* 120:33-40.
- Julia V, Rassoulzadegan M, Glaichenhaus N. 1996. Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science* 274:421-423.
- Kajaia M, Morse DL, Kamkamidze G, Butsashvili M, Chubabria G, Zenaishvili O, Kokaia N, McNutt LA. 2011. Risk factors for relapse of visceral leishmaniasis in Georgia. *Trop Med Int Health* 16:186-192.
- Kakkar R, Hei H, Dobner S, Lee RT. 2012. Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells. *J Biol Chem* 287:6941-6948.
- Kakkar R, Lee RT. 2008. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov* 7:827-840.
- Karmakar S, Bhaumik SK, Paul J, De T. 2012. TLR4 and NKT cell synergy in immunotherapy against visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog* 8:e1002646.
- Karp CL, el-Safi SH, Wynn TA, Satti MM, Kordofani AM, Hashim FA, Hag-Ali M, Neva FA,

- Nutman TB, Sacks DL. 1993. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *J Clin Invest* 91:1644-1648.
- Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, Arita S, Katayama K, Nomura T, Yoshikawa T, Kubota-Koketsu R, Ikuta K, Okamoto S, Mori Y, Kunisawa J, Kiyono H, Itoh N, Nagano K, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S. 2010. Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against influenza virus. *J Virol* 84:12703-12712.
- Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, Zubairi S, Engwerda CR. 2004. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev* 201:239-253.
- Kemp K, Kemp M, Kharazmi A, Ismail A, Kurtzhals JA, Hviid L, Theander TG. 1999. Leishmania-specific T cells expressing interferon-gamma (IFN-gamma) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 116:500-504.
- Kemp M, Hey AS, Kurtzhals JA, Christensen CB, Gaafar A, Mustafa MD, Kordofani AA, Ismail A, Kharazmi A, Theander TG. 1994a. Dichotomy of the human T cell response to *Leishmania* antigens. I. Th1-like response to *Leishmania* major promastigote antigens in individuals recovered from cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 96:410-415.
- Kemp M, Kurtzhals JA, Bendtzen K, Poulsen LK, Hansen MB, Koech DK, Kharazmi A, Theander TG. 1993a. *Leishmania donovani*-reactive Th1- and Th2-like T-cell clones from individuals who have recovered from visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 61:1069-1073.
- Kemp M, Kurtzhals JA, Christensen CB, Kharazmi A, Jardim A, Bendtzen K, Gachihi GS, Olafson RW, Theander TG. 1993b. Production of interferon-gamma and interleukin-4 by human T cells recognizing *Leishmania* lipophosphoglycan-associated protein. *Immunol Lett* 38:137-144.
- Kemp M, Kurtzhals JA, Kharazmi A, Theander TG. 1993c. Interferon-gamma and interleukin-4 in human *Leishmania donovani* infections. *Immunol Cell Biol* 71 (Pt 6):583-587.
- Kemp M, Kurtzhals JA, Kharazmi A, Theander TG. 1994b. Dichotomy in the human CD4+ T-cell response to *Leishmania* parasites. *APMIS* 102:81-88.
- Khoshdel A, Alborzi A, Rosouli M, Taheri E, Kianny S, Javadian MH. 2009. Increased levels of IL-10, IL-12, and IFN- in patients with visceral leishmaniasis. *Braz J Infect Dis* 13:44-46.
- Kim HY, Chang YJ, Subramanian S, Lee HH, Albacker LA, Matangkasombut P, Savage PB, McKenzie AN, Smith DE, Rottman JB, DeKruyff RH, Umetsu DT. 2012a. Innate lymphoid cells responding to IL-33 mediate airway hyperreactivity independently of adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 129:216-227 e211-216.
- Kim YH, Yang TY, Park CS, Ahn SH, Son BK, Kim JH, Lim DH, Jang TY. 2012b. Anti-IL-33 antibody has a therapeutic effect in a murine model of allergic rhinitis. *Allergy* 67:183-190.
- Kima PE, Soong L, Chicharro C, Ruddle NH, McMahon-Pratt D. 1996. *Leishmania*-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 26:3163-3169.
- Klemenz R, Hoffmann S, Werenskiold AK. 1989. Serum- and oncoprotein-mediated induction of a gene with sequence similarity to the gene encoding carcinoembryonic antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5708-5712.
- Knolle PA, Gerken G. 2000. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 174:21-34.
- Kobori A, Yagi Y, Imaeda H, Ban H, Bamba S, Tsujikawa T, Saito Y, Fujiyama Y, Andoh A. 2010. Interleukin-33 expression is specifically enhanced in inflamed mucosa of ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 45:999-1007.
- Koech DK. 1987. Subpopulations of T lymphocytes in Kenyan patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 36:497-500.
- Komai-Koma M, Gilchrist DS, McKenzie AN, Goodyear CS, Xu D, Liew FY. 2011. IL-33 activates B1 cells and exacerbates contact sensitivity. *J Immunol* 186:2584-2591.
- Komai-Koma M, Xu D, Li Y, McKenzie AN, McInnes IB, Liew FY. 2007. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol* 37:2779-2786.
- Kouzaki H, Iijima K, Kobayashi T, O'Grady SM, Kita H. 2011. The danger signal, extracellular

- ATP, is a sensor for an airborne allergen and triggers IL-33 release and innate Th2-type responses. *J Immunol* 186:4375-4387.
- Kroeger KM, Sullivan BM, Locksley RM. 2009. IL-18 and IL-33 elicit Th2 cytokines from basophils via a MyD88- and p38alpha-dependent pathway. *J Leukoc Biol* 86:769-778.
- Kropf P, Bickle Q, Herath S, Klemenz R, Muller I. 2002a. Organ-specific distribution of CD4+ T1/ST2+ Th2 cells in *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol* 32:2450-2459.
- Kropf P, Herath S, Klemenz R, Muller I. 2003. Signaling through the T1/ST2 molecule is not necessary for Th2 differentiation but is important for the regulation of type 1 responses in nonhealing *Leishmania major* infection. *Infect Immun* 71:1961-1971.
- Kropf P, Herath S, Tewari R, Syed N, Klemenz R, Muller I. 2002b. Identification of two distinct subpopulations of *Leishmania major*-specific T helper 2 cells. *Infect Immun* 70:5512-5520.
- Kubar J, Marty P, Lelievre A, Quaranta JF, Staccini P, Caroli-Bosc C, Le Fichoux Y. 1998. Visceral leishmaniasis in HIV-positive patients: primary infection, reactivation and latent infection. Impact of the CD4+ T-lymphocyte counts. *AIDS* 12:2147-2153.
- Kumar S, Tzimas MN, Griswold DE, Young PR. 1997. Expression of ST2, an interleukin-1 receptor homologue, is induced by proinflammatory stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* 235:474-478.
- Kuroiwa K, Arai T, Okazaki H, Minota S, Tominaga S. 2001. Identification of human ST2 protein in the sera of patients with autoimmune diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 284:1104-1108.
- Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Murphy G, Russo RC, Stolarski B, Garcia CC, Komai-Koma M, Pitman N, Li Y, Niedbala W, McKenzie AN, Teixeira MM, Liew FY, Xu D. 2008. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol* 181:4780-4790.
- Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana B, van Rooijen N, Shepherd M, McSharry C, McInnes IB, Xu D, Liew FY. 2009. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol* 183:6469-6477.
- Kurtzhals JA, Hey AS, Jardim A, Kemp M, Schaefer KU, Odera EO, Christensen CB, Githure JJ, Olafson RW, Theander TG, et al. 1994. Dichotomy of the human T cell response to *Leishmania* antigens. II. Absent or Th2-like response to gp63 and Th1-like response to lipophosphoglycan-associated protein in cells from cured visceral leishmaniasis patients. *Clin Exp Immunol* 96:416-421.
- Lagadinou M, Dimitropoulou D, Assimakopoulos SF, Davoulos G, Marangos M. 2013. Recurrent visceral leishmaniasis in an immunocompetent patient: a case report. *J Med Case Rep* 7:68.
- Laguna F, Garcia-Samaniego J, Moreno V, Gonzalez-Lahoz JM. 1994. Prevalence of gastrointestinal leishmaniasis in Spanish HIV-positive patients with digestive symptoms. *Am J Gastroenterol* 89:1606.
- Lamkanfi M, Dixit VM. 2009. IL-33 raises alarm. *Immunity* 31:5-7.
- Lang T, Lecoecur H, Prina E. 2009. Imaging *Leishmania* development in their host cells. *Trends Parasitol* 25:464-473.
- Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. 2003. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol* 11:210-214.
- Laufs H, Muller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W, Laskay T. 2002. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun* 70:826-835.
- Laurenti MD, Sotto MN, Corbett CE, da Matta VL, Duarte MI. 1990. Experimental visceral leishmaniasis: sequential events of granuloma formation at subcutaneous inoculation site. *Int J Exp Pathol* 71:791-797.
- Le Goffic R, Arshad MI, Rauch M, L'Helgoualc'h A, Delmas B, Piquet-Pellorce C, Samson M. 2011. Infection with influenza virus induces IL-33 in murine lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45:1125-1132.

- Le HT, Tran VG, Kim W, Kim J, Cho HR, Kwon B. 2012. IL-33 priming regulates multiple steps of the neutrophil-mediated anti-Candida albicans response by modulating TLR and dectin-1 signals. *J Immunol* 189:287-295.
- Leclercq V, Lebastard M, Belkaid Y, Louis J, Milon G. 1996. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. *J Immunol* 157:4537-4545.
- Lee RT, Briggs WH, Cheng GC, Rossiter HB, Libby P, Kupper T. 1997. Mechanical deformation promotes secretion of IL-1 alpha and IL-1 receptor antagonist. *J Immunol* 159:5084-5088.
- Lefevre L, Gales A, Olganier D, Bernad J, Perez L, Burcelin R, Valentin A, Auwerx J, Pipy B, Coste A. 2010. PPARgamma ligands switched high fat diet-induced macrophage M2b polarization toward M2a thereby improving intestinal Candida elimination. *PLoS One* 5:e12828.
- Lefrancais E, Roga S, Gautier V, Gonzalez-de-Peredo A, Monsarrat B, Girard JP, Cayrol C. 2012. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:1673-1678.
- Léger N, Depaquit J. 1999. Les phlébotomes. Dans : Les leishmanioses, Dedet, JP., Ellipses. ed.
- Lehmann J, Enssle KH, Lehmann I, Emmendorfer A, Lohmann-Matthes ML. 2000. The capacity to produce IFN-gamma rather than the presence of interleukin-4 determines the resistance and the degree of susceptibility to *Leishmania donovani* infection in mice. *J Interferon Cytokine Res* 20:63-77.
- Lehn M, Weiser WY, Engelhorn S, Gillis S, Remold HG. 1989. IL-4 inhibits H₂O₂ production and antileishmanial capacity of human cultured monocytes mediated by IFN-gamma. *J Immunol* 143:3020-3024.
- Leishman W. 1903. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. . *Br. Med. J.* i:1252-1254.
- Leite VH, Croft SL. 1996. Hepatic extracellular matrix in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *Int J Exp Pathol* 77:181-190.
- Lerner EA, Shoemaker CB. 1992. Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. *J Biol Chem* 267:1062-1066.
- Liew FY. 2012. IL-33: a Janus cytokine. *Ann Rheum Dis* 71 Suppl 2:i101-104.
- Liew FY, Liu H, Xu D. 2005. A novel negative regulator for IL-1 receptor and Toll-like receptor 4. *Immunol Lett* 96:27-31.
- Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. 2010. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol* 10:103-110.
- Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F, Arnold B, Knolle PA. 2000. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 6:1348-1354.
- Liu J, Buckley JM, Redmond HP, Wang JH. 2010. ST2 negatively regulates TLR2 signaling, but is not required for bacterial lipoprotein-induced tolerance. *J Immunol* 184:5802-5808.
- Locksley RM, Heinzel FP, Fankhauser JE, Nelson CS, Sadick MD. 1988. Cutaneous host defense in leishmaniasis: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. *Infect Immun* 56:336-342.
- Locksley RM, Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Gardner KD, Jr. 1987. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann Inst Pasteur Immunol* 138:744-749.
- Luthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, Brumatti G, Taylor RC, Kersse K, Vandenabeele P, Lavelle EC, Martin SJ. 2009. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 31:84-98.
- Mansueto P, Vitale G, Di Lorenzo G, Rini GB, Mansueto S, Cillari E. 2007. Immunopathology of leishmaniasis: an update. *Int J Immunopathol Pharmacol* 20:435-445.
- Marovich MA, McDowell MA, Thomas EK, Nutman TB. 2000. IL-12p70 production by *Leishmania major*-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent

- process. *J Immunol* 164:5858-5865.
- Martinet L, Garrido I, Filleron T, Le Guellec S, Bellard E, Fournie JJ, Rochaix P, Girard JP. 2011. Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res* 71:5678-5687.
- Martinet L, Garrido I, Girard JP. 2012a. Tumor high endothelial venules (HEVs) predict lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Oncoimmunology* 1:789-790.
- Martinet L, Le Guellec S, Filleron T, Lamant L, Meyer N, Rochaix P, Garrido I, Girard JP. 2012b. High endothelial venules (HEVs) in human melanoma lesions: Major gateways for tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology* 1:829-839.
- Marvie P, Lisbonne M, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Turlin B, Preisser L, Bourd-Boittin K, Theret N, Gascan H, Piquet-Pellorce C, Samson M. 2010. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *J Cell Mol Med* 14:1726-1739.
- Mary C, Auriault V, Faugere B, Dessein AJ. 1999. Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigen-specific T cells. *Infect Immun* 67:5559-5566.
- Mary C, Faraut F, Drogoul MP, Xeridat B, Schleinitz N, Cuisenier B, Dumon H. 2006. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am J Trop Med Hyg* 75:858-863.
- Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. 2004. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* 42:5249-5255.
- Matthews DJ, Emson CL, McKenzie GJ, Jolin HE, Blackwell JM, McKenzie AN. 2000. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. *J Immunol* 164:1458-1462.
- Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16:188-189.
- Maxwell PJ, Gallagher R, Seaton A, Wilson C, Scullin P, Pettigrew J, Stratford IJ, Williams KJ, Johnston PG, Waugh DJ. 2007. HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells. *Oncogene* 26:7333-7345.
- McConville MJ, de Souza D, Saunders E, Likic VA, Naderer T. 2007. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. *Trends Parasitol* 23:368-375.
- McElrath MJ, Murray HW, Cohn ZA. 1988. The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. *J Exp Med* 167:1927-1937.
- McFarlane E, Carter KC, McKenzie AN, Kaye PM, Brombacher F, Alexander J. 2011. Endogenous IL-13 plays a crucial role in liver granuloma maturation during *Leishmania donovani* infection, independent of IL-4/Ralpha-responsive macrophages and neutrophils. *J Infect Dis* 204:36-43.
- McFarlane E, Perez C, Charmoy M, Allenbach C, Carter KC, Alexander J, Tacchini-Cottier F. 2008. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 76:532-541.
- Meagher LC, Savill JS, Baker A, Fuller RW, Haslett C. 1992. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. *J Leukoc Biol* 52:269-273.
- Mehal WZ, Azzaroli F, Crispe IN. 2001. Immunology of the healthy liver: old questions and new insights. *Gastroenterology* 120:250-260.
- Meier CL, Svensson M, Kaye PM. 2003. *Leishmania*-induced inhibition of macrophage antigen presentation analyzed at the single-cell level. *J Immunol* 171:6706-6713.
- Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE. 2001. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol* 166:1912-1920.
- Meller-Melloul C, Farnarier C, Dunan S, Faugere B, Franck J, Mary C, Bongrand P, Quilici M, Kaplanski S. 1991. Evidence of subjects sensitized to *Leishmania infantum* on the French

- Mediterranean coast: differences in gamma interferon production between this population and visceral leishmaniasis patients. *Parasite Immunol* 13:531-536.
- Melo FA, Moura EP, Ribeiro RR, Alves CF, Caliari MV, Tafuri WL, Calabrese KS. 2009. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Int J Exp Pathol* 90:538-548.
- Michel G, Pomares C, Ferrua B, Marty P. 2011. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum (L. chagasi)* in human. *Acta Trop* 119:69-75.
- Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM. 2005. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med* 201:747-754.
- Miller AM, Asquith DL, Hueber AJ, Anderson LA, Holmes WM, McKenzie AN, Xu D, Sattar N, McInnes IB, Liew FY. 2010. Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. *Circ Res* 107:650-658.
- Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, Baker AH, McInnes IB, Liew FY. 2008. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med* 205:339-346.
- Miller MA, McGowan SE, Gantt KR, Champion M, Novick SL, Andersen KA, Bacchi CJ, Yarlett N, Britigan BE, Wilson ME. 2000. Inducible resistance to oxidant stress in the protozoan *Leishmania chagasi*. *J Biol Chem* 275:33883-33889.
- Mills CD. 2012. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. *Crit Rev Immunol* 32:463-488.
- Mirchandani AS, Salmond RJ, Liew FY. 2012. Interleukin-33 and the function of innate lymphoid cells. *Trends Immunol* 33:389-396.
- Mirkovich AM, Galelli A, Allison AC, Modabber FZ. 1986. Increased myelopoiesis during *Leishmania major* infection in mice: generation of 'safe targets', a possible way to evade the effector immune mechanism. *Clin Exp Immunol* 64:1-7.
- Miyagaki T, Sugaya M, Yokobayashi H, Kato T, Ohmatsu H, Fujita H, Saeki H, Kikuchi Y, Tamaki T, Sato S. 2011. High levels of soluble ST2 and low levels of IL-33 in sera of patients with HIV infection. *J Invest Dermatol* 131:794-796.
- Mjosberg JM, Trifari S, Crellin NK, Peters CP, van Drunen CM, Piet B, Fokkens WJ, Cupedo T, Spits H. 2011. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD161. *Nat Immunol* 12:1055-1062.
- Mohrs M, Ledermann B, Kohler G, Dorfmueller A, Gessner A, Brombacher F. 1999. Differences between IL-4- and IL-4 receptor alpha-deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling. *J Immunol* 162:7302-7308.
- Moll H, Flohe S, Blank C. 1995a. Dendritic cells seclude *Leishmania* parasites that persist in cured mice--a role in the maintenance of T-cell memory? *Adv Exp Med Biol* 378:507-509.
- Moll H, Flohe S, Rollinghoff M. 1995b. Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. *Eur J Immunol* 25:693-699.
- Molto A, Mateo L, Lloveras N, Olive A, Minguez S. 2010. Visceral leishmaniasis and macrophagic activation syndrome in a patient with rheumatoid arthritis under treatment with adalimumab. *Joint Bone Spine* 77:271-273.
- Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, Alenghat T, Ziegler CG, Doering TA, Angelosanto JM, Laidlaw BJ, Yang CY, Sathaliyawala T, Kubota M, Turner D, Diamond JM, Goldrath AW, Farber DL, Collman RG, Wherry EJ, Artis D. 2011. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol* 12:1045-1054.
- Monticelli LA, Sonnenberg GF, Artis D. 2012. Innate lymphoid cells: critical regulators of allergic inflammation and tissue repair in the lung. *Curr Opin Immunol* 24:284-289.
- Moore JW, Moyo D, Beattie L, Andrews PS, Timmis J, Kaye PM. 2013. Functional complexity of the *Leishmania* granuloma and the potential of in silico modeling. *Front Immunol* 4:35.
- Moreno A, Marazuela M, Yebra M, Hernandez MJ, Hellin T, Montalban C, Vargas JA. 1988. Hepatic fibrin-ring granulomas in visceral leishmaniasis. *Gastroenterology* 95:1123-1126.

- Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa J, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S. 2010. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* 463:540-544.
- Mosser DM, Brittingham A. 1997. Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology* 115 Suppl:S9-23.
- Mosser DM, Edwards JP. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958-969.
- Moulin D, Donze O, Talabot-Ayer D, Mezin F, Palmer G, Gabay C. 2007. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine* 40:216-225.
- Moussion C, Ortega N, Girard JP. 2008. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One* 3:e3331.
- Muhanna N, Horani A, Doron S, Safadi R. 2007. Lymphocyte-hepatic stellate cell proximity suggests a direct interaction. *Clin Exp Immunol* 148:338-347.
- Mukbel RM, Patten C, Jr., Gibson K, Ghosh M, Petersen C, Jones DE. 2007. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop Med Hyg* 76:669-675.
- Mukhopadhyay D, Saha P, Chatterjee M. 2012. Targets for immunochemotherapy in leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10:261-264.
- Munoz-Rodriguez FJ, Padro S, Pastor P, Rosa-Re D, Valls ME, Miro JM, Gatell JM. 1997. Pleural and peritoneal leishmaniasis in an AIDS patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16:246-248.
- Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA, Farrell JP. 2001. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol* 31:2848-2856.
- Murphy TL, Cleveland MG, Kulesza P, Magram J, Murphy KM. 1995. Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. *Mol Cell Biol* 15:5258-5267.
- Murray HW. 1990. Effect of continuous administration of interferon-gamma in experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 161:992-994.
- Murray HW. 2000. Mononuclear cell recruitment, granuloma assembly, and response to treatment in experimental visceral leishmaniasis: intracellular adhesion molecule 1-dependent and -independent regulation. *Infect Immun* 68:6294-6299.
- Murray HW. 2001. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol* 82:249-267.
- Murray HW, Cervia JS, Hariprashad J, Taylor AP, Stoeckle MY, Hockman H. 1995. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental visceral leishmaniasis. *J Clin Invest* 95:1183-1192.
- Murray HW, Flanders KC, Donaldson DD, Sypek JP, Gotwals PJ, Liu J, Ma X. 2005. Antagonizing deactivating cytokines to enhance host defense and chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 73:3903-3911.
- Murray HW, Hariprashad J, Coffman RL. 1997. Behavior of visceral *Leishmania donovani* in an experimentally induced T helper cell 2 (Th2)-associated response model. *J Exp Med* 185:867-874.
- Murray HW, Lu CM, Mauze S, Freeman S, Moreira AL, Kaplan G, Coffman RL. 2002. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect Immun* 70:6284-6293.
- Murray HW, Miralles GD, Stoeckle MY, McDermott DF. 1993. Role and effect of IL-2 in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol* 151:929-938.
- Murray HW, Nathan CF. 1999. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med* 189:741-746.
- Murray HW, Rubin BY, Carriero S, Acosta AM. 1984. Reversible defect in antigen-induced lymphokine and gamma-interferon generation in cutaneous leishmaniasis. *J Immunol*

133:2250-2254.

- Murray HW, Squires KE, Miralles CD, Stoeckle MY, Granger AM, Granelli-Piperno A, Bogdan C. 1992. Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. *J Immunol* 148:1858-1863.
- Murray HW, Stern JJ, Welte K, Rubin BY, Carriero SM, Nathan CF. 1987. Experimental visceral leishmaniasis: production of interleukin 2 and interferon-gamma, tissue immune reaction, and response to treatment with interleukin 2 and interferon-gamma. *J Immunol* 138:2290-2297.
- Murray HW, Tsai CW, Liu J, Ma X. 2006a. Responses to *Leishmania donovani* in mice deficient in interleukin-12 (IL-12), IL-12/IL-23, or IL-18. *Infect Immun* 74:4370-4374.
- Murray HW, Tsai CW, Liu J, Ma X. 2006b. Visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin-13^{-/-} mice. *Infect Immun* 74:2487-2490.
- Murray HW, Xiang Z, Ma X. 2006c. Responses to *Leishmania donovani* in mice deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Am J Trop Med Hyg* 74:1013-1015.
- Nashleanas M, Kanaly S, Scott P. 1998. Control of *Leishmania major* infection in mice lacking TNF receptors. *J Immunol* 160:5506-5513.
- Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, Bucks C, Kane CM, Fallon PG, Pannell R, Jolin HE, McKenzie AN. 2010. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 464:1367-1370.
- Nerlich AG, Bianucci R, Trisciuglio A, Schonian G, Ball M, Giuffra V, Bachmeier B, Pusch CM, Ferroglio E, Fornaciari G. 2012. Visceral leishmaniasis during Italian Renaissance, 1522-1562. *Emerging Infectious Diseases* 18:184-186.
- Ng LG, Hsu A, Mandell MA, Roediger B, Hoeller C, Mrass P, Iparraguirre A, Cavanagh LL, Triccas JA, Beverley SM, Scott P, Weninger W. 2008. Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS Pathog* 4:e1000222.
- Niedbala W, Cai B, Liu H, Pitman N, Chang L, Liew FY. 2007. Nitric oxide induces CD4⁺CD25⁺Foxp3 regulatory T cells from CD4⁺CD25⁺T cells via p53, IL-2, and OX40. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15478-15483.
- Nishida A, Andoh A, Imaeda H, Inatomi O, Shiomi H, Fujiyama Y. 2010. Expression of interleukin 1-like cytokine interleukin 33 and its receptor complex (ST2L and IL1RAcP) in human pancreatic myofibroblasts. *Gut* 59:531-541.
- Noronha FS, Cruz JS, Beirao PS, Horta MF. 2000. Macrophage damage by *Leishmania amazonensis* cytolysin: evidence of pore formation on cell membrane. *Infect Immun* 68:4578-4584.
- Nylen S, Maasho K, Soderstrom K, Ilg T, Akuffo H. 2003. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. *Clin Exp Immunol* 131:457-467.
- Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Saito H, Nakae S. 2010. IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. *Allergol Int* 59:143-160.
- Ohmori Y, Fukumoto S, Hamilton TA. 1995. Two structurally distinct kappa B sequence motifs cooperatively control LPS-induced KC gene transcription in mouse macrophages. *J Immunol* 155:3593-3600.
- Ohno T, Oboki K, Kajiwara N, Morii E, Aozasa K, Flavell RA, Okumura K, Saito H, Nakae S. 2009. Caspase-1, caspase-8, and calpain are dispensable for IL-33 release by macrophages. *J Immunol* 183:7890-7897.
- Olagnier D, Lavergne RA, Meunier E, Lefevre L, Dardenne C, Aubouy A, Benoit-Vical F, Ryffel B, Coste A, Berry A, Pipy B. 2011. Nrf2, a PPARgamma alternative pathway to promote CD36 expression on inflammatory macrophages: implication for malaria. *PLoS Pathog* 7:e1002254.
- Oliphant CJ, Barlow JL, McKenzie AN. 2011. Insights into the initiation of type 2 immune responses. *Immunology* 134:378-385.

- Onda H, Kasuya H, Takakura K, Hori T, Imaizumi T, Takeuchi T, Inoue I, Takeda J. 1999. Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:1279-1288.
- Oregioni O, Marty P, Le Fichoux Y, Angeli K, Gorlier C, Rosenthal E, Perrin C. 2003. Cytology of peritoneal leishmaniasis in a patient with AIDS. *Acta Cytol* 47:98-99.
- Oshikawa K, Kuroiwa K, Tago K, Iwahana H, Yanagisawa K, Ohno S, Tominaga SI, Sugiyama Y. 2001. Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 164:277-281.
- Oshikawa K, Yanagisawa K, Tominaga S, Sugiyama Y. 2002a. Expression and function of the ST2 gene in a murine model of allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 32:1520-1526.
- Oshikawa K, Yanagisawa K, Tominaga S, Sugiyama Y. 2002b. ST2 protein induced by inflammatory stimuli can modulate acute lung inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 299:18-24.
- Oswald IP, Wynn TA, Sher A, James SL. 1992. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8676-8680.
- Padigel UM, Farrell JP. 2005. Control of infection with *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice lacking the common gamma-chain for FcR is associated with reduced production of IL-10 and TGF-beta by parasitized cells. *J Immunol* 174:6340-6345.
- Palatnik-de-Sousa CB, Day MJ. 2011. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasit Vectors* 4:197.
- Palmer G, Lipsky BP, Smithgall MD, Meininger D, Siu S, Talabot-Ayer D, Gabay C, Smith DE. 2008. The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33. *Cytokine* 42:358-364.
- Palmer G, Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Toy D, Seemayer CA, Viatte S, Finckh A, Smith DE, Gabay C. 2009. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 60:738-749.
- Pampiglione S, Manson-Bahr PE, La Placa M, Borgatti MA, Musumeci S. 1975. Studies in Mediterranean leishmaniasis. 3. The leishmanin skin test in kala-azar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 69:60-68.
- Papadopoulou C, Kostoula A, Dimitriou D, Panagiou A, Bobojianni C, Antoniadis G. 2005. Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *J Infect* 50:53-60.
- Passos S, Carvalho LP, Orge G, Jeronimo SM, Bezerra G, Soto M, Alonso C, Carvalho EM. 2005. Recombinant leishmania antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 12:1164-1167.
- Pastorelli L, De Salvo C, Cominelli MA, Vecchi M, Pizarro TT. 2011. Novel cytokine signaling pathways in inflammatory bowel disease: insight into the dichotomous functions of IL-33 during chronic intestinal inflammation. *Therap Adv Gastroenterol* 4:311-323.
- Pastorelli L, Garg RR, Hoang SB, Spina L, Mattioli B, Scarpa M, Fiocchi C, Vecchi M, Pizarro TT. 2010. Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:8017-8022.
- Pearson RD, Steigbigel RT. 1980. Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. *J Immunol* 125:2195-2201.
- Pearson RD, Steigbigel RT. 1981. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 127:1438-1443.
- Pecaric-Petkovic T, Didichenko SA, Kaempfer S, Spiegl N, Dahinden CA. 2009. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood* 113:1526-1534.
- Peng H, Sun R, Zhang Q, Zhao J, Wei J, Zeng X, Zheng H, Wu Z. 2013. Interleukin 33 Mediates Type 2 Immunity and Inflammation in the Central Nervous System of Mice Infected With

- Angiostrongylus cantonensis*. *J Infect Dis* 207:860-869.
- Perrin C, Taillan B, Hofman P, Mondain V, Lefichoux Y, Michiels JF. 1995. Atypical cutaneous histological features of visceral leishmaniasis in acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Dermatopathol* 17:145-150.
- Peruhype-Magalhaes V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, Figueiredo RM, Guimaraes-Carvalho SF, Ferrari TC, Van Weyenbergh J, Correa-Oliveira R. 2006. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol* 146:124-132.
- Peters BS, Fish D, Golden R, Evans DA, Bryceson AD, Pinching AJ. 1990. Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical features and response to therapy. *Q J Med* 77:1101-1111.
- Piehl D, Grahnert A, Eschke M, Richter T, Kohler G, Stenzel W, Alber G. 2013. T1/ST2 promotes T helper 2 cell activation and polyfunctionality in bronchopulmonary mycosis. *Mucosal Immunol* 6:405-414.
- Pittalis S, Nicastrì E, Spinazzola F, Ghirga P, De Marco M, Paglia MG, Narciso P. 2006. *Leishmania infantum* leishmaniasis in corticosteroid--treated patients. *BMC Infect Dis* 6:177.
- Plewes KA, Barr SD, Gedamu L. 2003. Iron superoxide dismutases targeted to the glycosomes of *Leishmania chagasi* are important for survival. *Infect Immun* 71:5910-5920.
- Pratlong F, Lanotte G. 1999. Identification, Taxonomie et Phylogénèse. Dans : *Les leishmanioses*, Dedet, JP., Ellipses ed.
- Prefontaine D, Lajoie-Kadoch S, Foley S, Audusseau S, Olivenstein R, Halayko AJ, Lemiere C, Martin JG, Hamid Q. 2009. Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J Immunol* 183:5094-5103.
- Price AE, Liang HE, Sullivan BM, Reinhardt RL, Eislely CJ, Erle DJ, Locksley RM. 2010. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11489-11494.
- Priestle JP, Schar HP, Grutter MG. 1989. Crystallographic refinement of interleukin 1 beta at 2.0 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9667-9671.
- Puentes SM, Dwyer DM, Bates PA, Joiner KA. 1989. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J Immunol* 143:3743-3749.
- Puentes SM, Sacks DL, da Silva RP, Joiner KA. 1988. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* 167:887-902.
- Qi H, Denning TL, Soong L. 2003. Differential induction of interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. *Infect Immun* 71:3337-3342.
- Racoosin EL, Beverley SM. 1997. *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Exp Parasitol* 85:283-295.
- Rallis T, Day MJ, Saridomichelakis MN, Adamama-Moraitou KK, Papazoglou L, Fytianou A, Koutinas AF. 2005. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *J Comp Pathol* 132:145-152.
- Ramaprakash H, Shibata T, Duffy KE, Ismailoglu UB, Bredernitz RM, Moreira AP, Coelho AL, Das AM, Fursov N, Chupp GL, Hogaboam CM. 2011. Targeting ST2L potentiates CpG-mediated therapeutic effects in a chronic fungal asthma model. *Am J Pathol* 179:104-115.
- Rani R, Smulian AG, Greaves DR, Hogan SP, Herbert DR. 2011. TGF-beta limits IL-33 production and promotes the resolution of colitis through regulation of macrophage function. *Eur J Immunol* 41:2000-2009.
- Rank MA, Kobayashi T, Kozaki H, Bartemes KR, Squillace DL, Kita H. 2009. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol* 123:1047-

- Ravindran R, Anam K, Bairagi BC, Saha B, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP, Banerjee D, Ali N. 2004. Characterization of immunoglobulin G and its subclass response to Indian kala-azar infection before and after chemotherapy. *Infect Immun* 72:863-870.
- Ready PD. 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill* 15:19505.
- Reiner NE, Ng W, Wilson CB, McMaster WR, Burchett SK. 1990. Modulation of in vitro monocyte cytokine responses to *Leishmania donovani*. Interferon-gamma prevents parasite-induced inhibition of interleukin 1 production and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1. *J Clin Invest* 85:1914-1924.
- Reiner SL, Locksley RM. 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 13:151-177.
- Reis e Sousa C, Hieny S, Scharon-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A. 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 186:1819-1829.
- Rialland M, Corlu A, Ilyin G, Cabillic F, Lamy I, Guguen-Guillouzo C. 2000. Pattern of cytokine expression by rat liver epithelial cells supporting long-term culture of human CD34(+)umbilical cord blood cells. *Cytokine* 12:951-959.
- Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. 1998. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 31:143-148.
- Ribeiro-Gomes FL, Moniz-de-Souza MC, Alexandre-Moreira MS, Dias WB, Lopes MF, Nunes MP, Lungarella G, DosReis GA. 2007. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J Immunol* 179:3988-3994.
- Ribeiro-Gomes FL, Peters NC, Debrabant A, Sacks DL. 2012. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathog* 8:e1002536.
- Ritter U, Meissner A, Scheidig C, Korner H. 2004. CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. *Eur J Immunol* 34:1542-1550.
- Rittig MG, Bogdan C. 2000. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today* 16:292-297.
- Rittig MG, Wilske B, Krause A. 1999. Phagocytosis of microorganisms by means of overshooting pseudopods: where do we stand? *Microbes Infect* 1:727-735.
- Robert-Gangneux F, Drogoul AS, Rostan O, Piquet-Pellorce C, Cayon J, Lisbonne M, Herbelin A, Gascan H, Guiguen C, Samson M, Gangneux JP. 2012. Invariant NKT cells drive hepatic cytokinic microenvironment favoring efficient granuloma formation and early control of *Leishmania donovani* infection. *PLoS One* 7:e33413.
- Rodrigues V, Jr., Santana da Silva J, Campos-Neto A. 1998. Transforming growth factor beta and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 66:1233-1236.
- Rogers ME, Bates PA. 2007. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathog* 3:e91.
- Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA. 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430:463-467.
- Rolao N, Cortes S, Gomes-Pereira S, Campino L. 2007. *Leishmania infantum*: mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. *Exp Parasitol* 115:270-276.
- Rollins BJ. 1997. Chemokines. *Blood* 90:909-928.
- Ronet C, Hauyon-La Torre Y, Revaz-Breton M, Mastelic B, Tacchini-Cottier F, Louis J, Launois P. 2010. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. *J Immunol* 184:886-894.
- Rosas LE, Satoskar AA, Roth KM, Keiser TL, Barbi J, Hunter C, de Sauvage FJ, Satoskar AR.

2006. Interleukin-27R (WSX-1/T-cell cytokine receptor) gene-deficient mice display enhanced resistance to leishmania donovani infection but develop severe liver immunopathology. *Am J Pathol* 168:158-169.
- Rosenthal E, Marty P, le Fichoux Y, Cassuto JP. 2000. Clinical manifestations of visceral leishmaniasis associated with HIV infection: a retrospective study of 91 French cases. *Ann Trop Med Parasitol* 94:37-42.
- Rosenthal LA, Sutterwala FS, Kehrli ME, Mosser DM. 1996. Leishmania major-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infect Immun* 64:2206-2215.
- Rosenthal PJ, Chaisson RE, Hadley WK, Leech JH. 1988. Rectal leishmaniasis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 84:307-309.
- Rougeron V, Banuls AL, Carme B, Simon S, Couppie P, Nacher M, Hide M, De Meeus T. 2011. Reproductive strategies and population structure in Leishmania: substantial amount of sex in Leishmania Viannia guyanensis. *Mol Ecol* 20:3116-3127.
- Rougeron V, De Meeus T, Kako Ouraga S, Hide M, Banuls AL. 2010. "Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)" in Leishmania after two decades of laboratory and field analyses. *PLoS Pathog* 6:e1001004.
- Rousseau D, Demartino S, Ferrua B, Michiels JF, Anjuere F, Fragaki K, Le Fichoux Y, Kubar J. 2001. In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in Leishmania infantum infection. *BMC Microbiol* 1:17.
- Roussel L, Erard M, Cayrol C, Girard JP. 2008. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep* 9:1006-1012.
- Russell DG. 1987. The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant C3-acceptor site on Leishmania mexicana promastigotes. *Eur J Biochem* 164:213-221.
- Sacks DL. 1988. B cell dependent T lymphocyte responses in leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83 Suppl 1:506-513.
- Sacks DL. 1992. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of Leishmania promastigotes. *Infect Agents Dis* 1:200-206.
- Sacks DL. 2001. Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol* 3:189-196.
- Sacks DL, Lal SL, Shrivastava SN, Blackwell J, Neva FA. 1987. An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar. *J Immunol* 138:908-913.
- Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N. 2006. Immune responses in kala-azar. *Indian J Med Res* 123:245-266.
- Saidi S, Bouri F, Lencel P, Duplomb L, Baud'huin M, Delplace S, Leterme D, Miellot F, Heymann D, Hardouin P, Palmer G, Magne D. 2011. IL-33 is expressed in human osteoblasts, but has no direct effect on bone remodeling. *Cytokine* 53:347-354.
- Sakai N, Van Sweringen HL, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, Burns JM, Tevar AD, Edwards MJ, Lentsch AB. 2012. Interleukin-33 is hepatoprotective during liver ischemia/reperfusion in mice. *Hepatology* 56:1468-1478.
- Saleh H, Eeles D, Hodge JM, Nicholson GC, Gu R, Pompolo S, Gillespie MT, Quinn JM. 2011. Interleukin-33, a target of parathyroid hormone and oncostatin m, increases osteoblastic matrix mineral deposition and inhibits osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* 152:1911-1922.
- Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie AN, Lee RT. 2007. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest* 117:1538-1549.
- Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Muhlradt PF, Takeda K, Akira S. 2000. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol* 165:7096-7101.
- Savinko T, Matikainen S, Saarialho-Kere U, Lehto M, Wang G, Lehtimäki S, Karisola P, Reunala T, Wolff H, Lauerma A, Alenius H. 2012. IL-33 and ST2 in atopic dermatitis: expression

- profiles and modulation by triggering factors. *J Invest Dermatol* 132:1392-1400.
- Scalfone LK, Nel HJ, Gagliardo LF, Cameron JL, Al-Shokri S, Leifer CA, Fallon PG, Appleton JA. 2013. Participation of MyD88 and IL-33 as innate drivers of Th2 immunity to *Trichinella spiralis*. *Infect Immun*.
- Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. 2000. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 177:195-203.
- Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23:479-490.
- Schneider E, Petit-Bertron AF, Bricard R, Levasseur M, Ramadan A, Girard JP, Herbelin A, Dy M. 2009. IL-33 activates unprimed murine basophils directly in vitro and induces their in vivo expansion indirectly by promoting hematopoietic growth factor production. *J Immunol* 183:3591-3597.
- Scott P. 1993. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science* 260:496-497.
- Scott P, Natovitz P, Sher A. 1986. B lymphocytes are required for the generation of T cells that mediate healing of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 137:1017-1021.
- Seaman J, Mercer AJ, Sondorp E. 1996. The epidemic of visceral leishmaniasis in western Upper Nile, southern Sudan: course and impact from 1984 to 1994. *Int J Epidemiol* 25:862-871.
- Sedhom MA, Pichery M, Murdoch JR, Foligne B, Ortega N, Normand S, Mertz K, Sanmugalingam D, Brault L, Grandjean T, Lefrancais E, Fallon PG, Quesniaux V, Peyrin-Biroulet L, Cathomas G, Junt T, Chamillard M, Girard JP, Ryffel B. 2012. Neutralisation of the interleukin-33/ST2 pathway ameliorates experimental colitis through enhancement of mucosal healing in mice. *Gut*.
- Seidelin JB, Rogler G, Nielsen OH. 2011. A role for interleukin-33 in T(H)2-polarized intestinal inflammation? *Mucosal Immunol* 4:496-502.
- Shaw SE, Langton DA, Hillman TJ. 2009. Canine leishmaniosis in the United Kingdom: a zoonotic disease waiting for a vector? *Vet Parasitol* 163:281-285.
- Sheth K, Bankey P. 2001. The liver as an immune organ. *Curr Opin Crit Care* 7:99-104.
- Shi Z, Wakil AE, Rockey DC. 1997. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10663-10668.
- Shimpo M, Morrow DA, Weinberg EO, Sabatine MS, Murphy SA, Antman EM, Lee RT. 2004. Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2 predict mortality and clinical outcome in acute myocardial infarction. *Circulation* 109:2186-2190.
- Silva LC, Castro RS, Figueiredo MM, Michalick MS, Tafuri WL. 2013. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. *Int J Exp Pathol*.
- Silveira FT, Lainson R, De Souza AA, Campos MB, Carneiro LA, Lima LV, Ramos PK, de Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. 2010. Further evidences on a new diagnostic approach for monitoring human *Leishmania (L.) infantum* chagasi infection in Amazonian Brazil. *Parasitol Res* 106:377-386.
- Silver MR, Margulis A, Wood N, Goldman SJ, Kasaian M, Chaudhary D. 2010. IL-33 synergizes with IgE-dependent and IgE-independent agents to promote mast cell and basophil activation. *Inflamm Res* 59:207-218.
- Singh B, Sundar S. 2012. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine* 30:3834-3842.
- Singh N, Kumar M, Singh RK. 2012. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med* 5:485-497.
- Singh S, Kumari V, Singh N. 2002. Predicting kala-azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant K39 antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:568-572.
- Singh VK, Balaraman S, Tewary P, Madhubala R. 2004. *Leishmania donovani* activates nuclear

- transcription factor-kappaB in macrophages through reactive oxygen intermediates. *Biochem Biophys Res Commun* 322:1086-1095.
- Slack JL, Schooley K, Bonnert TP, Mitcham JL, Qwarnstrom EE, Sims JE, Dower SK. 2000. Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem* 275:4670-4678.
- Smelt SC, Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. 2000. B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *J Immunol* 164:3681-3688.
- Smelt SC, Engwerda CR, McCrossen M, Kaye PM. 1997. Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. *J Immunol* 158:3813-3821.
- Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. 2008. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol* 20:1019-1030.
- Sosa MR, Rosas LE, McKenzie AN, Satoskar AR. 2001. IL-13 gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *L. mexicana* infection. *Eur J Immunol* 31:3255-3260.
- Spath GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM. 2003a. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9536-9541.
- Spath GF, Lye LF, Segawa H, Sacks DL, Turco SJ, Beverley SM. 2003b. Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient *Leishmania major*. *Science* 301:1241-1243.
- Sponheim J, Pollheimer J, Olsen T, Balogh J, Hammarstrom C, Loos T, Kasprzycka M, Sorensen DR, Nilsen HR, Kuchler AM, Vatn MH, Haraldsen G. 2010. Inflammatory bowel disease-associated interleukin-33 is preferentially expressed in ulceration-associated myofibroblasts. *Am J Pathol* 177:2804-2815.
- Squier MK, Sehnert AJ, Cohen JJ. 1995. Apoptosis in leukocytes. *J Leukoc Biol* 57:2-10.
- Squires KE, Rosenkaimer F, Sherwood JA, Forni AL, Were JB, Murray HW. 1993. Immunochemotherapy for visceral leishmaniasis: a controlled pilot trial of antimony versus antimony plus interferon-gamma. *Am J Trop Med Hyg* 48:666-669.
- Stager S, Alexander J, Carter KC, Brombacher F, Kaye PM. 2003. Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. *Infect Immun* 71:4804-4807.
- Stager S, Maroof A, Zubairi S, Sanos SL, Kopf M, Kaye PM. 2006. Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10+ CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 36:1764-1771.
- Stanley AC, Engwerda CR. 2007. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol* 85:138-147.
- Stenger S, Thuring H, Rollinghoff M, Bogdan C. 1994. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med* 180:783-793.
- Stober D, Schirmbeck R, Reimann J. 2001. IL-12/IL-18-dependent IFN-gamma release by murine dendritic cells. *J Immunol* 167:957-965.
- Stolarski B, Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Xu D, Liew FY. 2010. IL-33 exacerbates eosinophil-mediated airway inflammation. *J Immunol* 185:3472-3480.
- Su Z, Lin J, Lu F, Zhang X, Zhang L, Gandhi NB, de Paiva CS, Pflugfelder SC, Li DQ. 2013. Potential autocrine regulation of interleukin-33/ST2 signaling of dendritic cells in allergic inflammation. *Mucosal Immunol*.
- Sundar S, Murray HW. 1995. Effect of treatment with interferon-gamma alone in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 172:1627-1629.
- Sundar S, Reed SG, Sharma S, Mehrotra A, Murray HW. 1997a. Circulating T helper 1 (Th1) cell- and Th2 cell-associated cytokines in Indian patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 56:522-525.
- Sundar S, Rosenkaimer F, Makharia MK, Goyal AK, Mandal AK, Voss A, Hilgard P, Murray HW.

1998. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet* 352:1821-1823.
- Sundar S, Rosenkaimer F, Murray HW. 1994. Successful treatment of refractory visceral leishmaniasis in India using antimony plus interferon-gamma. *J Infect Dis* 170:659-662.
- Sundar S, Singh VP, Sharma S, Makharia MK, Murray HW. 1997b. Response to interferon-gamma plus pentavalent antimony in Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 176:1117-1119.
- Svensson M, Zubairi S, Maroof A, Kazi F, Taniguchi M, Kaye PM. 2005. Invariant NKT cells are essential for the regulation of hepatic CXCL10 gene expression during *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun* 73:7541-7547.
- Tafuri WL, de Oliveira MR, Melo MN. 2001. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol* 96:203-212.
- Tago K, Noda T, Hayakawa M, Iwahana H, Yanagisawa K, Yashiro T, Tominaga S. 2001. Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochem Biophys Res Commun* 285:1377-1383.
- Tajima S, Oshikawa K, Tominaga S, Sugiyama Y. 2003. The increase in serum soluble ST2 protein upon acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 124:1206-1214.
- Takagi T, Yanagisawa K, Tsukamoto T, Tetsuka T, Nagata S, Tominaga S. 1993. Identification of the product of the murine ST2 gene. *Biochim Biophys Acta* 1178:194-200.
- Talabot-Ayer D, Calo N, Vigne S, Lamacchia C, Gabay C, Palmer G. 2012. The mouse interleukin (IL)33 gene is expressed in a cell type- and stimulus-dependent manner from two alternative promoters. *J Leukoc Biol* 91:119-125.
- Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Gabay C, Palmer G. 2009. Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage. *J Biol Chem* 284:19420-19426.
- Taylor AP, Murray HW. 1997. Intracellular antimicrobial activity in the absence of interferon-gamma: effect of interleukin-12 in experimental visceral leishmaniasis in interferon-gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 185:1231-1239.
- Teixeira CR, Teixeira MJ, Gomes RB, Santos CS, Andrade BB, Raffaele-Netto I, Silva JS, Guglielmotti A, Miranda JC, Barral A, Brodskyn C, Barral-Netto M. 2005. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *J Immunol* 175:8346-8353.
- Thakur CP, Kumar K. 1992. Post kala-azar dermal leishmaniasis: a neglected aspect of kala-azar control programmes. *Ann Trop Med Parasitol* 86:355-359.
- Thomas BN, Buxbaum LU. 2008. FcγRIII mediates immunoglobulin G-induced interleukin-10 and is required for chronic *Leishmania mexicana* lesions. *Infect Immun* 76:623-631.
- Thomassen E, Kothny G, Haas S, Danescu J, Hultner L, Dormer P, Werenskiold AK. 1995. Role of cell type-specific promoters in the developmental regulation of T1, an interleukin 1 receptor homologue. *Cell Growth Differ* 6:179-184.
- Tominaga S. 1989. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS Lett* 258:301-304.
- Tominaga S, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Tetsuka T. 1991. Molecular cloning of the murine ST2 gene. Characterization and chromosomal mapping. *Biochim Biophys Acta* 1090:1-8.
- Tominaga S, Kuroiwa K, Tago K, Iwahana H, Yanagisawa K, Komatsu N. 1999. Presence and expression of a novel variant form of ST2 gene product in human leukemic cell line UT-7/GM. *Biochem Biophys Res Commun* 264:14-18.
- Townsend MJ, Fallon PG, Matthews DJ, Jolin HE, McKenzie AN. 2000. T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med* 191:1069-1076.
- Trinchieri G, Wysocka M, D'Andrea A, Rengaraju M, Aste-Amezaga M, Kubin M, Valiante NM, Chehimi J. 1992. Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukin-12 is a key regulator of immune response and inflammation. *Prog Growth Factor Res* 4:355-368.
- Tumang MC, Keogh C, Moldawer LL, Helfgott DC, Teitelbaum R, Hariprasad J, Murray HW. 1994. Role and effect of TNF-alpha in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol*

153:768-775.

- Turco SJ. 1999. Adversarial relationship between the leishmania lipophosphoglycan and protein kinase C of host macrophages. *Parasite Immunol* 21:597-600.
- Ueda A, Okuda K, Ohno S, Shirai A, Igarashi T, Matsunaga K, Fukushima J, Kawamoto S, Ishigatsubo Y, Okubo T. 1994. NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J Immunol* 153:2052-2063.
- Uyttenhove C, Brombacher F, Van Snick J. 2010. TGF-beta interactions with IL-1 family members trigger IL-4-independent IL-9 production by mouse CD4(+) T cells. *Eur J Immunol* 40:2230-2235.
- van Lunzen J, Kern P, Schmitz J, Brzoska J, Flessenkamper S, Dietrich M. 1993. Short term treatment of visceral leishmaniasis of the Old World with low dose interferon gamma and pentavalent antimony. *Infection* 21:362-366.
- van Zandbergen G, Hermann N, Laufs H, Solbach W, Laskay T. 2002. Leishmania promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infect Immun* 70:4177-4184.
- Venuprasad K, Banerjee PP, Chattopadhyay S, Sharma S, Pal S, Parab PB, Mitra D, Saha B. 2002. Human neutrophil-expressed CD28 interacts with macrophage B7 to induce phosphatidylinositol 3-kinase-dependent IFN-gamma secretion and restriction of Leishmania growth. *J Immunol* 169:920-928.
- Venuprasad K, Chattopadhyay S, Saha B. 2003. CD28 signaling in neutrophil induces T-cell chemotactic factor(s) modulating T-cell response. *Hum Immunol* 64:38-43.
- Veress B, Omer A, Satir AA, El Hassan AM. 1977. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. *Immunology* 33:605-610.
- Verma S, Kumar R, Katara GK, Singh LC, Negi NS, Ramesh V, Salotra P. 2010. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. *PLoS One* 5:e10107.
- Vinas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Berenguer C, Enrich C, Nicolas JM, Ercilla G, Gallart T, Vives J, Arroyo V, Rodes J. 2003. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* 38:919-929.
- Vouldoukis I, Becherel PA, Riveros-Moreno V, Arock M, da Silva O, Debre P, Mazier D, Mossalayi MD. 1997. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of Leishmania infantum and Leishmania major by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur J Immunol* 27:860-865.
- Wadhone P, Maiti M, Agarwal R, Kamat V, Martin S, Saha B. 2009. Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response. *J Immunol* 182:7146-7154.
- Wagenaar JF, Gasem MH, Goris MG, Leeflang M, Hartskeerl RA, van der Poll T, van 't Veer C, van Gorp EC. 2009. Soluble ST2 levels are associated with bleeding in patients with severe Leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis* 3:e453.
- Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Naramura M, Tian L, Towne J, Sims JE, Stark GR, Li X. 2003. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 4:920-927.
- Walzl G, Matthews S, Kendall S, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ, Openshaw PJ, Hussell T. 2001. Inhibition of T1/ST2 during respiratory syncytial virus infection prevents T helper cell type 2 (Th2)- but not Th1-driven immunopathology. *J Exp Med* 193:785-792.
- Wang J, Cai Y, Ji H, Feng J, Ayana DA, Niu J, Jiang Y. 2012a. Serum IL-33 levels are associated with liver damage in patients with chronic hepatitis B. *J Interferon Cytokine Res* 32:248-253.
- Wang J, Zhao P, Guo H, Sun X, Jiang Z, Xu L, Feng J, Niu J, Jiang Y. 2012b. Serum IL-33 levels are associated with liver damage in patients with chronic hepatitis C. *Mediators Inflamm* 2012:819636.
- Wasserman A, Ben-Shoshan J, Entin-Meer M, Maysel-Auslender S, Guzner-Gur H, Keren G. 2012.

- Interleukin-33 augments Treg cell levels: a flaw mechanism in atherosclerosis. *Isr Med Assoc J* 14:620-623.
- Watters TM, Kenny EF, O'Neill LA. 2007. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunol Cell Biol* 85:411-419.
- Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY. 1995. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375:408-411.
- Weinberg EO, Shimpo M, Hurwitz S, Tominaga S, Rouleau JL, Lee RT. 2003. Identification of serum soluble ST2 receptor as a novel heart failure biomarker. *Circulation* 107:721-726.
- Weiss MG. 2008. Stigma and the social burden of neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e237.
- Werenskiold AK. 1992. Characterization of a secreted glycoprotein of the immunoglobulin superfamily inducible by mitogen and oncogene. *Eur J Biochem* 204:1041-1047.
- Werenskiold AK, Hoffmann S, Klemenz R. 1989. Induction of a mitogen-responsive gene after expression of the Ha-ras oncogene in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 9:5207-5214.
- Widmer U, Manogue KR, Cerami A, Sherry B. 1993. Genomic cloning and promoter analysis of macrophage inflammatory protein (MIP)-2, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, members of the chemokine superfamily of proinflammatory cytokines. *J Immunol* 150:4996-5012.
- Wieland CW, van der Windt GJ, Florquin S, McKenzie AN, van der Poll T. 2009. ST2 deficient mice display a normal host defense against pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect* 11:524-530.
- Wills-Karp M, Rani R, Dienger K, Lewkowich I, Fox JG, Perkins C, Lewis L, Finkelman FD, Smith DE, Bryce PJ, Kurt-Jones EA, Wang TC, Sivaprasad U, Hershey GK, Herbert DR. 2012. Trefoil factor 2 rapidly induces interleukin 33 to promote type 2 immunity during allergic asthma and hookworm infection. *J Exp Med* 209:607-622.
- Wilson ME, Young BM, Davidson BL, Mente KA, McGowan SE. 1998. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. *J Immunol* 161:6148-6155.
- Wilson R, Bates MD, Dostalova A, Jecna L, Dillon RJ, Volf P, Bates PA. 2010. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay. *PLoS Negl Trop Dis* 4.
- Woelbing F, Kostka SL, Moelle K, Belkaid Y, Sunderkoetter C, Verbeek S, Waisman A, Nigg AP, Knop J, Udey MC, von Stebut E. 2006. Uptake of *Leishmania* major by dendritic cells is mediated by Fc-gamma receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med* 203:177-188.
- Wood IS, Wang B, Trayhurn P. 2009. IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 384:105-109.
- Xu D, Chan WL, Leung BP, Huang F, Wheeler R, Piedrafita D, Robinson JH, Liew FY. 1998. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J Exp Med* 187:787-794.
- Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, Pitman N, Kurowska-Stolarska M, McKenzie AN, McInnes IB, Liew FY. 2008. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10913-10918.
- Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL, Tong L. 2000. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 408:111-115.
- Xynos ID, Tektonidou MG, Pikazis D, Sipsas NV. 2009. Leishmaniasis, autoimmune rheumatic disease, and anti-tumor necrosis factor therapy, Europe. *Emerg Infect Dis* 15:956-959.
- Yagami A, Orihara K, Morita H, Futamura K, Hashimoto N, Matsumoto K, Saito H, Matsuda A. 2010. IL-33 mediates inflammatory responses in human lung tissue cells. *J Immunol* 185:5743-5750.
- Yanagawa Y, Matsumoto M, Togashi H. 2011. Adrenoceptor-mediated enhancement of interleukin-33 production by dendritic cells. *Brain Behav Immun* 25:1427-1433.
- Yanagisawa K, Takagi T, Tsukamoto T, Tetsuka T, Tominaga S. 1993. Presence of a novel primary

- response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1. *FEBS Lett* 318:83-87.
- Yang Q, Li G, Zhu Y, Liu L, Chen E, Turnquist H, Zhang X, Finn OJ, Chen X, Lu B. 2011. IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 41:3351-3360.
- Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Taki Y, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishii KJ, Yoshimoto T, Akira S, Nakanishi K. 2012. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:3451-3456.
- Yin H, Li XY, Jin XB, Zhang BB, Gong Q, Yang H, Zheng F, Gong FL, Zhu JY. 2010. IL-33 prolongs murine cardiac allograft survival through induction of TH2-type immune deviation. *Transplantation* 89:1189-1197.
- Zijlstra EE, el-Hassan AM, Ismael A. 1995. Endemic kala-azar in eastern Sudan: post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 52:299-305.
- Zilberstein D, Shapira M. 1994. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 48:449-470.
- Zink AR, Spigelman M, Schraut B, Greenblatt CL, Nerlich AG, Donoghue HD. 2006. Leishmaniasis in ancient Egypt and Upper nubia. *Emerg Infect Dis* 12:1616-1617.
- Zwingenberger K, Harms G, Pedrosa C, Omena S, Sandkamp B, Neifer S. 1990. Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: evidence for predominance of endogenous interleukin 4 over interferon-gamma production. *Clin Immunol Immunopathol* 57:242-249.

Annexes

Liste des communications

I. Communications orales

Rostan et al. L'expression hépatique de l'IL-33 est corrélée à la réponse granulomateuse efficace des souris infectées par *Leishmania donovani*.

Congrès annuel de la Société Française de Parasitologie, Angers 2010.

Rostan et al. Les cellules étoilées du foie, un sanctuaire hépatique pour *Leishmania donovani* ?

Congrès annuel de la Société Française de Parasitologie, Rennes, 2012.

II. Communications affichées

Rostan et al. IL-33 overexpression in the liver of *Leishmania donovani* infected mice is correlated with an efficient granulomatous response.

Colloque des Cytokines du Croisic, Le Croisic, 2010

European Doctoral College in Environment and Health, Rennes, 2010.

Robert-Gangneux, **Rostan** et al. IL-33 induction is correlated with an efficient hepatic granulomatous response in *Leishmania donovani* infected mice.

European Congress of Clinical Microbiol & infect diseases (ECCMID), Milan, 2011.

Rostan et al. Tracking the IL-33/ST2 pathway during visceral leishmaniasis.

European Doctoral College in Environment and Health, Rennes, 2012.

Rostan et al. Rôle du récepteur ST2 au cours de la réponse inflammatoire hépatique contre *Leishmania donovani* sur un modèle de souris BALB/c KO.

Congrès annuel de la Société Française de Parasitologie, Rennes, 2012 : Prix de la SFP

Congrès des Jeunes Chercheurs, Paris, 2012.

VU :

**Le Directeur de Thèse
Doctorale**
(Nom et Prénom)

VU :

Le Responsable de l'École

VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes 1

Guy CATHELINEAU

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le Président de Jury,
(Nom et Prénom)

IL-33/ST2 axis is associated with human visceral leishmaniasis and suppresses Th1 responses in the liver of BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*

Running title: IL-33/ST2 hepatic pathway and visceral leishmaniasis

Octavie Rostan^{1,2}, Jean-Pierre Gangneux^{1,3,4}, Claire Piquet-Pellorce^{1,2}, Christelle Manuel³, Andrew N.J. McKenzie⁵, Claude Guiguen^{3,4}, Michel Samson^{1,2}, Florence Robert-Gangneux^{1,3,4,#}

¹ Inserm U1085, IRSET, 2 avenue du Professeur Léon Bernard, F-35043 Rennes, France.

² BIOSIT, Structure fédérative UMS3480 CNRS – US18 Inserm, F-35043 Rennes, France.

³ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Faculté de médecine, Université de Rennes 1, Rennes, F-35043 Rennes, France.

⁴ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre hospitalier universitaire Ponchaillou, F-35033 Rennes, France.

⁵ MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge, UK.

Abstract

During visceral leishmaniasis, the control of hepatic parasite burden is mainly due to the granuloma assembly, in a micro-environment consisting of both Th1 and Th2 components. Using ELISA dosages, q-PCR, immunohistochemistry and flow cytometry, we studied the role of IL-33, a recently described cytokine signaling through ST2 receptor, during visceral leishmaniasis.

We showed that a higher level of IL-33 was detected in the serum of patients with visceral leishmaniasis compared to healthy donors, and demonstrated the presence of IL-33⁺ cells in the liver biopsy of a patient. Similarly, in BALB/c mice experimentally infected with *L. donovani*, a higher level of IL-33 was detected in the serum, as well as the presence of IL-33⁺ cells and ST2⁺ cells in the mouse liver. In ST2^{-/-} BALB/c mice, a better control of the hepatic parasite burden and a reduced hepatomegaly were observed. This was associated with a strong induction of Th1 cytokines (IFN- γ , IL-12) compared to WT mice, and a better recruitment of myeloid cells associated with strongly induced chemokines (CCL2, CXCL2) and receptors (CCR2, CXCR2). Conversely, BALB/c mice treated twice weekly with recombinant IL-33 showed a dramatically reduced induction of Th1 cytokines and a delayed inhibition of monocytes and neutrophils recruitment in the liver, associated with reduced KC and CXCR2 expression.

Taken together, our results suggest that IL-33 could be a new deleterious regulator of the hepatic immune response against *Leishmania donovani*, via the repression of the Th1 response and myeloid cell recruitment.

Importance

Visceral leishmaniasis is a life-threatening systemic disease due to the *Leishmania* protozoa *L. infantum* and *L. donovani*, and is ranked by the World Health Organization as second most important protozoan parasitic disease after malaria for its grave morbidity, high mortality and global distribution. *Leishmania* parasites subvert the host immune response to propagate to target organs, the spleen, the bone marrow and the liver. Control of hepatic parasite burdens depends on a delicate and poorly understood Th1/Th2 immune balance. To better understand this complex immune response, new cytokines are interesting targets for research studies. IL-33 is a newly described cytokine usually associated with Th2 response and involved in different diseases including infectious diseases and hepatitis. Our results suggest that IL-33 could be a new factor of susceptibility and a potential prognostic marker during visceral leishmaniasis.

Key words: IL-33, ST2, Visceral leishmaniasis, Th1 cytokines, Chemokines, Monocytes, Neutrophils, *Leishmania donovani*

#Corresponding authors:

Florence Robert-Gangneux. Tel.: (+33)2 23 23 44 99; Fax: (+33)2 23 23 46 29. E-mail address:

florence.robert-gangneux@univ-rennes1.fr

Introduction

Interleukin-33 (IL-33) is a recently identified member of the IL-1 cytokine family that can act either as a nuclear binding factor or as a cytokine (4, 50). Once secreted, IL-33 signals through a heterodimer composed of the ST2 specific receptor (also called T1 or IL-1RL1) and the IL-1 receptor accessory protein, which is a member of the IL-1 receptor family (50). Before the discovery of IL-33, ST2 was known as a Th2 cell marker constitutively expressed or induced on several immune cell types, such as Th2 lymphocytes, invariant natural killer T (iNKT), natural killer (NK) cells, cytotoxic T cells, monocytes, macrophages, dendritic cells, polymorphonuclear neutrophils (PMN), mast cells, basophils and eosinophils (37). Accordingly, IL-33 has a broad range of effects on the immune system, either proinflammatory effects or promotion of Th2 immune response, leading to beneficial or worsening outcomes depending on the clinical setting (27, 41). IL-33 plays a deleterious role in many auto-immune diseases such as rheumatoid arthritis (44, 60) and inflammatory bowel disease (5), and induces a predisposition to asthma and other allergic diseases (19, 24). Conversely, IL-33 has a protective role in many diseases associated with exacerbated Th1 response like atherosclerosis (35) and in some cardiovascular or metabolic diseases (33-34). During infectious diseases, IL-33 may also play opposing roles depending on the organ involved and the Th1/Th2 immune balance necessary to control the infection. IL-33 was shown to be protective during sepsis (1) or keratitis due to *Pseudomonas aeruginosa* (14) and during infections with *Trichuris muris* (16), *Schistosoma mansoni* (56) or *Toxoplasma gondii* (17), whereas it is deleterious during cutaneous leishmaniasis. In *Leishmania major* infected mice, it was demonstrated that a minor population of ST2⁺ Th2 cells were specifically enriched in the non healing infection site (20), and that blockade of ST2 using a ST2-specific blocking antibody or a fusion protein T1-Fc, resulted in the development of less severe disease, with reduced parasite load and a switch in T cell response polarity to a protective Th1 response (21).

During visceral leishmaniasis (VL) due to *L. infantum* and *L. donovani*, the control of hepatic parasite burden is mainly due to a granulomatous

inflammatory response, mostly involving Kupffer cells (KC) and infiltrating blood monocytes (40). In experimental models of VL, IL-12 plays a pivotal role by initiating a Th1 cell response with the production of IFN- γ , which activates macrophages leading to parasite death (11). However, regarding its sustained exposition to many antigens and chemicals, the liver is characterized by a tolerogenic Th2 biased micro-environment, with IL-10 and TGF- β secretion (6). Thus, a peculiar immune environment involving both Th1 and Th2 cells is usually described during VL and is associated with the efficient granuloma assembly and parasite killing (10, 54). Recently described cytokines could be involved in this complex hepatic immune response. Whereas ST2 is clearly associated with the deleterious Th2 response against *L. major* in the skin during cutaneous leishmaniasis (21), no data are available about the role of IL-33 and ST2 in the liver during VL. Here, we show that IL-33 and ST2 are expressed in the liver during human and experimental murine VL. ST2 deficiency in transgenic BALB/c mice led to better controlled parasite burden in the liver, associated with an early infiltrate of PMN and monocytes and a Th1 polarized immune response. Conversely, injection of recombinant IL-33 in BALB/c mice led to repressed Th1 response and limited infiltrate of PMN and monocytes.

Results

Human visceral leishmaniasis is associated with increased serum IL-33 and IL-33 expression in the liver

IL-33 was detected at significantly higher levels in the serum of the 6 VL patients than in the 21 healthy controls (41.8 ± 13.5 pg/mL, versus 8.6 ± 2.2 pg/mL, $p=0.0105$) (Figure 1A). All dosages were carried out before onset of treatment.

Immunohistochemical staining of the liver biopsy obtained from a patient with VL revealed huge parasite burden, associated with numerous IL-33 positive cells, either endothelial cells or infiltrating cells and cells surrounding granulomatous foci (Figure 1B). These observations led us to further investigate the role of IL-33 in murine models.

Infection with *L. donovani* is associated with increasing levels of serum IL-33 and IL-33 expression in the liver

IL-33 levels were measured in the serum of BALB/c mice infected with *L. donovani* at different time points of the disease, and revealed a low level of detection in non infected mice (3.4 ± 1.8 pg/mL), as well as at day 15 and day 30 post-infection (respectively 2.4 ± 2.3 and 4.1 ± 4.1 pg/mL). A significant increase in IL-33 was detected in the serum at day 60 with a mean concentration of 89.7 ± 20.1 pg/mL ($p < 0.05$ compared with D0, D15 and D30) (Figure 1C).

As for human, immunohistochemical staining of liver biopsies using a goat anti-mouse IL-33 revealed the presence of a specific nuclear staining in cells preferentially located in granulomas and infiltrates surrounding blood vessels at D60 (Figure 1D), and to a lower extent at D15 and D30 (data not shown). In addition, as classically described, some endothelial cells were also IL-33⁺, as confirmed via a co-staining of IL-33 and CD31 by immunofluorescence on liver frozen sections at all time points (data not shown).

Infection with *L. donovani* induces the recruitment of ST2⁺ cells in the liver of BALB/c mice

In order to study the impact of this IL-33 hepatic expression and late systemic secretion, the presence of ST2 expressing cells was first demonstrated by immunohistochemistry in the liver at D60 (Figure 2A). A flow cytometry analysis in the whole liver using the same antibody revealed a specific ST2 expression in CD11b⁺ GR1^{int} cells and in CD19⁺ cells compared with isotype control antibody (Figure 2B). Indeed, the MFI ratio of anti-ST2 antibody and isotype were respectively 2.2 and 2.3 and significantly differed from 1, whereas other analyzed cell populations showed lower and non significant ratios (Figure 2C). On day 60 after infection, no significant change was observed in the MFI ratio for any cell type (Figure 2C). However, a significant infiltrate of all analyzed cell types was observed at D60 compared to non infected mice, with a 5.5 fold increase of CD11b⁺ GR1^{int} cell number in the total liver, whereas other cell types were only 2.5 to 3.8-fold increased (Figure 2D), leading to an enrichment of ST2⁺ cells after infection.

The hepatic Leishmania burden is better controlled in ST2^{-/-} BALB/c mice

To address the role of the ST2⁺ infiltrating cells, the hepatic immune response was compared in wild-type (WT) and ST2 deficient mice after infection with *L. donovani*. In WT mice, the parasite burden was significantly higher at D60 (757.0 ± 125.3 LDU), compared with D15 and D30 (399.4 ± 76.86 and 389.5 ± 73.67 LDU, respectively). In ST2^{-/-} mice, the parasite burden was not different from WT mice at D15 and D30, but no increase was observed at D60. At this time post-infection, the liver parasite burden was significantly lower in ST2^{-/-} mice (400.8 ± 69.62 LDU) compared to WT mice ($p < 0.05$) (Figure 3A).

The uncontrolled parasite burden in BALB/c mice at D60 was associated with an important hepatomegaly, a common feature of VL. Indeed, the weight of the liver reached 1.4 ± 0.1 g at D60, and was significantly increased, compared with non infected mice (1.1 ± 0.1 , $p < 0.05$). The basic liver weight of non infected ST2^{-/-} mice was comparable to that of non infected WT mice, but at D60 it was significantly lower in ST2^{-/-} mice compared to WT mice (1.0 ± 0.1 , $p < 0.05$) (Figure 3B).

ST2^{-/-} mice infected with *L. donovani* display a Th1 polarized immune response

As the hepatic immune response against *L. donovani* is highly dependent on cytokine induction, q-PCR analyses were performed on hepatic lysates to quantify the induction of key Th1 and Th2 cytokines. Whereas IL-12p35 was not significantly induced in WT mice during the course of the disease, a strong induction was observed in ST2^{-/-} mice at D15 and D60 ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) (Figure 4A). Similarly, IFN- γ was not significantly induced in infected WT mice compared to non infected mice, but a significant induction was observed in ST2^{-/-} mice at early and late time points ($p < 0.05$) (Figure 4B). In contrary, IL-13 and IL-4 were not, or were weakly, detected with no difference between infected and non-infected mice (data not shown).

Monocytes and PMN are recruited early in the liver of ST2^{-/-} BALB/c mice in response to *L. donovani* infection

As monocytes and PMN are important cell types recruited early in the liver for an efficient immune response against *L. donovani*, some key

chemokines involved in their attraction, CCL2 and CXCL2, were quantified by q-PCR. A significant elevation in CCL2 mRNA was observed at D15 ($p<0.05$) and D30 ($p<0.01$) in the ST2^{-/-} samples as compared to those from WT mice (Figure 5A). A significant rise of CXCL2 expression was also observed in ST2^{-/-} mice at D30 ($p<0.001$) with a significantly stronger induction compared to WT mice ($p<0.05$) (Figure 5B).

To quantify the recruitment of CCL2 and CXCL2 responding cells, the induction of CCR2 and CXCR2 receptors was analyzed by q-PCR in hepatic lysates. CCR2 was not perceptibly induced in WT mice, whereas a significantly higher induction was observed in ST2^{-/-} mice at D15 ($p<0.05$) and D30 ($p<0.01$) (Figure 5C). Similarly, a significant induction of CXCR2 was observed at D15 in ST2^{-/-} mice, compared to WT mice ($p<0.001$) (Figure 5D).

To address the role of CCL2 and CXCL2 to recruit myeloid cells in the liver during the course of infection, the expression of the myeloperoxidase (MPO) was quantified by q-PCR in the liver. The expression of this enzyme, mostly expressed in PMN, was higher in ST2^{-/-} mice after infection ($p<0.05$ at D30) (Figure 5E). To confirm the stronger myeloid cell recruitment in ST2^{-/-} mice, an immunohistochemical staining using an anti-MPO antibody was performed on liver sections. The number of MPO⁺ cells was expressed by the tissue surface (mm²). A striking infiltrate of MPO⁺ cells was observed at D15. At this time point, the number of MPO⁺ cells was two-fold higher in ST2^{-/-} compared to WT mice ($p<0.05$) (Figure 5F-H), but no significant difference was observed between WT and ST2^{-/-} mice at D30 and D60 (Figure 5F).

Recombinant IL-33 treatment limits the Th1 immune response in infected BALB/c mice

In order to consolidate the data obtained with ST2 deficient mice and address more specifically the role of free IL-33 in the liver, BALB/c WT mice were infected with *L. donovani* and treated intraperitoneally with recombinant IL-33 (rIL-33) twice a week until D15, D30 or D60.

A dramatic reduction of hepatic IFN- γ and IL-12p35 induction was observed in rIL-33 treated mice compared to non treated mice (NT) ($p<0.001$ and $p<0.05$ on day 60, respectively) (Figure 6A-B). No difference was observed in the induction levels of IL-4 and IL-13 at all time

points (data not shown), suggesting a specific Th1 repression in the liver of BALB/c mice in response to IL-33. Additionally, a mild increase in parasite loads was observed in treated mice compared to NT mice (528 ± 83 LDU and 433 ± 56 LDU at day 30, respectively, $p=ns$).

Treatment of BALB/c mice with rIL-33 inhibits the hepatic recruitment of monocytes and PMN after infection with *L. donovani*

Quantitative analysis of chemokine mRNA in liver lysates showed a significant induction of CCL2 at D15, D30 and D60 and of CXCL2 at D15 and D30 ($p<0.05$), but the kinetics was surprisingly similar between NT and rIL-33 treated mice for both chemokines (Figure 7A-B).

The induction of chemokine receptors was also analyzed. A significant induction of CCR2 was observed at all time points ($p<0.05$ at day 15 and $p<0.01$ at day 60), with no obvious difference between NT and rIL-33 treated mice (Figure 7C). CXCR2 was also significantly induced in both NT and rIL-33 treated mice ($p<0.01$ and $p<0.05$, respectively), but to a lower extent at D30 and D60 in rIL-33 treated mice ($p<0.05$ between both groups of mice at day 60) (Figure 7D). The discrepancy of reduced CXCR2 but unmodified expression of CXCL2 in rIL-33 treated mice led us to investigate KC expression, since KC responding cells also express CXCR2. This chemokine was indeed significantly induced in the liver of NT mice at D15, D30 and D60 ($p<0.05$), whereas it was significantly repressed at D60 in treated mice, compared to NT mice ($p<0.001$) (Figure 7E).

To analyze the impact of KC and CXCL2 repression in rIL-33 treated mice, infiltrating MPO⁺ cells were counted on liver sections stained by immunohistochemistry. As expected, a significant recruitment of MPO⁺ cells was observed in NT mice at D30 and D60 ($p<0.05$). In rIL-33 treated mice, the number of MPO⁺ cells was similar at D15 and D30 but significantly lower at D60 ($p<0.05$) (Figures 7F-H). Flow cytometry analysis was performed on infected NT or rIL-33 treated mice to characterize the presence of PMN and macrophages in the total liver during the course of the disease. In agreement with immunohistochemistry, no difference was observed between NT and rIL-33 treated mice at D15 and D30, but the number of CD11b⁺ GR1^{high} cells was significantly reduced in rIL-33

treated mice at D60, as well as the number of CD11b⁺ GR1^{int} cells (Figures 7I-J).

Discussion

IL-33 is a recently described cytokine with involvement in many diseases (23, 26, 36, 41, 43). Our team and others have contributed to the characterization of IL-33 sources during acute hepatitis (2-3). During chronic hepatitis, expression of IL-33 and its receptor ST2 is associated with sustained inflammation and Th2 response leading to fibrosis in the liver of both mouse and humans, with a correlation between IL-33 expression and fibrosis severity (30). As liver fibrosis is a common feature during visceral leishmaniasis (VL) (7), we investigated the expression of IL-33 during human VL. Significant IL-33 release in the serum of VL patients was observed compared with healthy blood donors, and numerous IL-33⁺ cells were detected by immunohistochemistry in the liver biopsy from a patient. Thus, IL-33 could be either a biomarker of the disease which could reflect its severity, or a marker among others of the host defense against *Leishmania* parasites. The large variation in the IL-33 levels in the patients (SEM=13,50) compared with healthy donors (SEM=3,227) suggests a variable release of IL-33, possibly depending on the severity of the disease, the genetic background of the patient, the immunologic status and/or other associated diseases. The place of IL-33 and ST2 as diagnostic or prognostic tools, as proposed in other diseases (18, 55), should be explored in a larger and prospective study of VL patients with different risk factors, but also before and after treatment.

To elucidate the role of IL-33 during VL, a model of BALB/c mice was used. As observed in humans, IL-33 was significantly increased in the serum of BALB/c mice infected with *L. donovani* and was detected in the liver by immunohistochemistry. As expected, most endothelial cells were IL-33⁺ cells (38), but additionally, numerous IL-33⁺ infiltrating cells were observed in the hepatic tissue, mainly located in granulomas. This led us to investigate the effect of IL-33 on the recruitment of ST2⁺ immune cells in the liver of BALB/c mice. Immunohistochemistry revealed the localization of ST2⁺ infiltrating cells in and around the granulomas, suggesting a regulatory role for IL-

33 signaling via ST2 in the granulomatous response against *L. donovani*. Flow cytometry analysis of the liver immune cells showed the presence of ST2⁺ macrophages and ST2⁺ B lymphocytes in the liver of BALB/c mice, but no significant increase of ST2 MFI was observed after infection. However, the important recruitment of monocytes/macrophages ($\times 5.5$) and B lymphocytes compared to other immune cell types could account for enrichment in ST2⁺ cells in the liver after infection. Interestingly, flow cytometry analysis on C56BL/6 mice, performed simultaneously, showed lower levels of ST2 MFI (data not shown). Since C56BL/6 mice display a preferential Th1 immune response whereas BALB/c mice are known as having a Th2-biased genetic background (28), these data are consistent with the widely recognized function of ST2 as a marker associated with Th2 response (22, 51, 57). As the balance between Th1 and Th2 responses is critical for VL susceptibility (29, 47), we further investigated whether IL-33 could act as a factor of susceptibility associated with Th2 response.

ST2 deficient BALB/c mice indeed showed a better control of the hepatic parasite burden and a reduced hepatomegaly, compared with wild-type (WT) congenic controls. During cutaneous leishmaniasis (CL) due to *L. major*, the blockade of ST2 in BALB/c mice was associated with limited lesions and better control of the parasite burden, via an improved Th1 response. Similarly, we showed a switch in the immune response in favor of Th1, with an increased expression of IFN- γ and IL-12 in the liver of ST2^{-/-} mice during VL, both cytokines of utmost importance in the control of infection. The expression of Th2 cytokines such as IL-13 and IL-4 did not significantly differ during the course of murine VL between WT and ST2^{-/-} mice (data not shown). Inversely, recombinant IL-33 (rIL-33) treated mice displayed reduced IL-12 and IFN- γ induction levels without change in IL-4 expression in the liver. These data suggest that IL-33 could act as a repressor of Th1 response during VL as observed during CL (21), rather than an inducer of Th2 response as described during other diseases (45, 56).

The influx of both monocytes and PMN is necessary for functional granuloma formation and final parasite clearance in the liver (9, 40, 53). Previous studies of our team and others showed a key role of CCL2, CXCL2 and KC in the recruitment of these myeloid cells and

the efficacy of disease control (8, 32, 46), thus we focused on these chemokines. We observed an earlier and stronger induction of CCL2 and CXCL2 in ST2^{-/-} mice than in WT mice, associated with a higher induction of their corresponding receptors CCR2 and CXCR2. Conversely, rIL-33 treated mice displayed an impaired induction of CXCR2, delayed to 60 days post-infection. This apparent difference in kinetics is probably linked to these experimental models, with an early impact of genetic ST2 deficiency on micro-environmental factors, but late effects of long-term treatment with low rIL-33 dosages. Moreover, no difference in CCL2 and CXCL2 was observed between treated and non-treated mice, whereas KC was dramatically reduced in rIL-33 treated mice and was unmodified in ST2^{-/-} mice (data not shown). These results suggest that beside CCL2 and CXCL2, KC is also implicated in the recruitment of MPO⁺ cells in BALB/c mice and can be down-regulated by IL-33. Overall, the reduction of CCL2, CXCL2 and KC induction associated with IL-33 signaling in both models was correlated with the decrease in monocytes and PMN influx in the liver. Although divergent conclusions can be found in the literature regarding the role of IL-33 in monocytes and neutrophils recruitment according to the model (1, 25-26, 48), it is frequently associated with inflammatory responses and cell attraction during inflammatory diseases. By contrast, our results are consistent with a recent study, showing that IL-33 was associated with a repression of neutrophils recruitment, thereby limiting liver damage and disease severity in an experimental model of liver ischemia and reperfusion (48).

The signaling pathways underlying the down-regulation of Th1 effectors in our model remain to be determined. As IL-33 is known to be a regulator of the NF-κB pathway (49), and NF-κB is a key regulator of cytokines, chemokines and receptors expression, including IL-12 (15, 39), IFN-γ (12), KC (42), CCL2 (58), CXCL2 (59) and CXCR2 (31), which were identified to be of major interest in our study, the study of NF-κB regulation by IL-33 in infected cells should be undertaken to better understand the mechanism of action of IL-33 during VL. As a first approach, we analyzed the NF-κBp65 induction by q-PCR on liver extracts, which revealed a significant overexpression in ST2^{-/-} BALB/c mice and a significant downregulation

in rIL-33 treated mice compared to WT untreated mice (data not shown). These results suggest that IL-33 could repress the NF-κBp65 expression, as stated in a previous study (49), in order to counterbalance the NF-κB induction observed in response to *Leishmania* infection (13, 52), leading to downregulation of chemokines and Th1 cytokines. As IL-33 signaling via ST2 is usually associated with NF-κB activation (50), the apparent down-modulation of NF-κBp65 expression by IL-33 during *L. donovani* VL needs further investigations to better characterize the post-translational regulation of NF-κB pathways in this model.

In conclusion, our results showed that in BALB/c mice, the IL-33/ST2 pathway does not to control *L. donovani* infection, but instead is associated with the down-regulation of the Th1 response and poorer outcome. The role IL-33 as a prognostic marker during VL in humans should be explored.

Materials and Methods

Ethics statement

The study on mouse models was carried out in accordance with the French institutional guidelines (Direction des Services Vétérinaires, agreement number #35-135), and with the EC directive #86/609/CEE. The use of ST2^{-/-} mice in our animal facilities was approved by the Commission Génie Génétique (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, agreement number 5387-CA-1). Human blood samples were collected after written informed consent was obtained from the patients.

Patients

The sera from patients with VL (n=6) and healthy donors (n=21) were collected for IL-33 dosage. A liver biopsy performed during the diagnosis of one case of VL was also available for histological analysis with IL-33 staining.

Mice

Female BALB/c wild-type mice were purchased from Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France) and acclimatized for at least 10 days before challenge. BALB/c ST2-deficient (ST2^{-/-}) mice (56) and were backcrossed for at least 10 generations. Mice were bred and housed in our animal facilities. Mice were 7-12-weeks-

old when challenged with *L. donovani*. Naïve congenic mice, matched according to age, were used as non-infected controls.

Parasites and infection of mice

The *L. donovani* strain (MHOM/SD/97/LEM3427, typed as Zym MON-18 by the Centre National de Référence des Leishmanioses, Montpellier, France) was maintained in vivo by serial murine passages and grown in vitro on NNN (Novy-McNeal-Nicolle) blood agar at 27°C. Prior to infection, amplification of promastigotes was carried out by culture in Schneider's *Drosophila* medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, for 6 days at 27°C, until they reached stationary phase. Animals were infected on day 0 (D0) by intraperitoneal injection of 10⁸ promastigotes, and groups of 4-13 mice were sacrificed on D15, D30, or D60. Prior to sacrifice, blood was collected by retro-orbital puncture, and the serum was stored at -80°C. The liver was recovered and weighed, cut into pieces and then used for immune cell typing by flow cytometry or formalin-fixed and paraffin-embedded or snap frozen in isopentane/liquid nitrogen for mRNA extraction.

Treatment with recombinant IL-33

Recombinant IL-33 (rIL-33) was purchased from Peprotech. Mice were infected with *L. donovani* at D0 as previously described and then intraperitoneally treated with 0.5 µg of rIL-33 per mice twice a week until their sacrifice at D15, D30 or D60.

Serum IL-33 quantification

IL-33 was quantified in the serum of both human and mouse serum with a 1:2 dilution using respectively the specific human and mouse DuoSet ELISA[®] development systems (R&D Systems), according to the manufacturer's instructions, except for the reveal step in which orthophenyl-dianizidine was used instead of tetramethylbenzidine. Absorbance was determined at 490 nm using a spectrophotometer, and the results were determined from a ten-point standard curve, and expressed as pg/mL.

Quantification of liver parasitic burden

Parasite burden was determined by microscopic examination of Giemsa-stained

smears, with the results expressed as Leishman Donovan Units (LDU) (i.e. number of amastigotes per 1000 cell nuclei × liver weight in mg) (Murray et al., 2005).

Immunohistochemical characterization of immune cells in the liver

Mouse myeloperoxidase (MPO) was stained using a polyclonal rabbit anti-MPO antibody diluted 1/1000 (DakoCytomation), mouse ST2 receptor was stained by immunocytochemistry of liver sections using a rat anti-mouse ST2 antibody diluted 1/100 (DJ8, MB Bioproducts), mouse IL-33 was stained using a goat anti-mouse IL-33 diluted 1/50 (R&D systems), and human IL-33 was stained using the Nessler-1 monoclonal antibody diluted 1/50 (Enzo Life Sciences). All immunohistochemical experiments were performed on the Ventana Discovery XT robot, using the Ventana DABMap detection kit (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona) with a biotinylated goat anti-rabbit antibody diluted 1/700 (Vector laboratory), a biotinylated donkey anti-rat antibody diluted 1/100 (Jackson immune research), a horse anti-goat antibody diluted 1/700 (Vector laboratory) and a horse anti-mouse antibody diluted 1/700 (Vector laboratory), respectively. The sections were then counterstained with hematoxylin. The number of MPO⁺ cells was counted after microscopic examination and reported per mm² using a Zeiss Primo Star optical microscope. Pictures were obtained with a Nikon 80i optical microscope equipped with a numerical camera.

RNA isolation and analysis of hepatic gene expression

Total cellular RNA was extracted and purified from liver samples using Trizol reagent (Invitrogen), then treated with DNase (10 U DNase I/µg total RNA) and reverse transcribed with a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR amplifications were carried out in duplicate using Power SYBR[®]green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 3 µM primers and cDNA corresponding to 30 ng of total RNA input in a final volume of 10 µL, in 384-well optical plates, using a 7900HT Fast Real Time q-PCR system (Applied Biosystems). The PCR primers were designed using Primer express 3 software and synthesized by Qiagen or Sigma-

Aldrich (Lyon, France). Expression levels of target genes were normalized by comparison to expression of 18S rRNA. Results were expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ referred as fold induction in relation to the mean Ct obtained with non-infected WT mice.

Flow cytometry analyses

For flow cytometry analyses, livers were perfused with PBS to remove blood cell contamination prior to dissection. After homogenization of liver tissue and elimination of hepatocytes by sedimentation, immune cells were purified using 35% Percoll (GE healthcare) and red blood cells were lysed. 10^6 leucocytes were incubated with anti-CD16/32 (BD Pharmingen) to block non-specific binding and washed. Cells were then incubated 30 minutes with appropriate dilutions of anti-GR1-PB, anti-CD11b-PE-Cy7, anti-CD3-Pacific Blue, anti-CD8-APC-Cy7, anti-CD4-PE, anti-NP46-PerCP-Cy5.5 and anti-CD19-APC antibodies, all purchased from BD PharMingen. The staining of ST2 was assessed with a rat monoclonal anti-mouse ST2-FITC antibody (clone DJ8, MB Bioproducts). Cells were washed, fixed in PBS containing 2 % FCS, 0.01 M sodium azide and 2 % formaldehyde and analyzed on a FACS Aria II[®] flow cytometer using BD FACS Diva software (BD Bioscience), and the data were processed using CXP software (Beckman Coulter). Dead cells and doublet cells were excluded on the basis of forward and side scatter. The different immune cell types were identified and gated as follows: B lymphocytes were CD19⁺, NK cells were NP46⁺ CD3⁻, NKT cells were NP46⁺ CD3⁺, T CD8⁺ lymphocytes were NP46⁻ CD3⁺ CD8⁺ CD4⁻, T CD4⁺ lymphocytes were NP46⁻ CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻. PMN were GR1^{high} CD11b⁺ and macrophages were GR1^{int} CD11b⁺ (Figure S1). The macrophage gating strategy was validated using a F4/80 antibody as previously described (46). Cell numbers per liver were calculated as follows: (number of gated cells / number of living cells) x number of infiltrating cells purified from the whole liver. ST2 expression and induction were quantified by the ratio mean fluorescence intensities (MFI) of ST2 / MFI of control Ig-FITC in each gated cell types.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM for each group of mice (4-11 mice per group from 2-3

independent experiments). Differences between groups were analyzed using the t-test of Student (human data) or the non-parametric Mann and Whitney test (mouse data). A one-sample t-test was used to confirm the expression of ST2 observed by flow cytometry on different cell types as follow: the MFI ratios were compared to 1, which is the value theoretically expected if there were no difference between a specific antibody and its control isotype. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.02 software. Differences were considered significant when the p-value was <0.05, and graduated as *(p<0.05), **(p<0.01), and ***(p<0.001).

Acknowledgments

Octavie Rostan was granted by the “Ministere de l’Enseignement Superieur et de la Recherche”. This work was supported by the “Institut de Parasitologie de l’Ouest” and a grant from the CPER Bretagne - 360b 2007-2013/ European funding FEDER. We thank Pascal Bellaud, Roselyne Viel and Dr. Alain Fautrel for technical support and advices, and the SFR BIOSIT Histopathology platform H2P2 for the use of its histology facilities. We thank Dr. Gersende Lacombe and the cytometry platform of SFR BIOSIT for flow cytometry acquisition. We thank Dr. Charles Mary from the CHU of Marseille for providing some blood samples.

References

1. Alves-Filho, J. C., F. Sonego, F. O. Souto, A. Freitas, W. A. Verri, Jr., M. Auxiliadora-Martins, A. Basile-Filho, A. N. McKenzie, D. Xu, F. Q. Cunha, and F. Y. Liew. 2010. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med* **16**:708-12.
2. Arshad, M. I., C. Piquet-Pellorce, A. L’Helgoualc’h, M. Rauch, S. Patrat-Delon, F. Ezan, C. Lucas-Clerc, S. Nabti, A. Lehuen, F. J. Cubero, J. P. Girard, C. Trautwein, and M. Samson. 2012. TRAIL but not FasL and TNFalpha, regulates IL-33 expression in murine hepatocytes during acute hepatitis. *Hepatology* **56**:2353-62.
3. Arshad, M. I., M. Rauch, A. L’Helgoualc’h, V. Julia, M. C. Leite-de-Moraes, C. Lucas-Clerc, C. Piquet-Pellorce, and M. Samson. 2011. NKT cells are required to induce high IL-33

expression in hepatocytes during ConA-induced acute hepatitis. *Eur J Immunol* **41**:2341-8.

4. **Baekkevold, E. S., M. Roussigne, T. Yamanaka, F. E. Johansen, F. L. Jahnsen, F. Amalric, P. Brandtzaeg, M. Erard, G. Haraldsen, and J. P. Girard.** 2003. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol* **163**:69-79.

5. **Beltran, C. J., L. E. Nunez, D. Diaz-Jimenez, N. Farfan, E. Candia, C. Heine, F. Lopez, M. J. Gonzalez, R. Quera, and M. A. Hermoso.** 2010. Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **16**:1097-107.

6. **Donaghy, L., F. Cabillic, A. Corlu, O. Rostan, O. Toutirais, C. Guguen-Guillouzo, C. Guiguen, and J. P. Gangneux.** 2010. Immunostimulatory properties of dendritic cells after *Leishmania donovani* infection using an in vitro model of liver microenvironment. *PLoS Negl Trop Dis* **4**:e703.

7. **Duarte, M. I., and C. E. Corbett.** 1987. Histopathological patterns of the liver involvement in visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **29**:131-6.

8. **Elshafie, A. I., E. Hlin, L. D. Hakansson, G. Elghazali, S. H. Safi, J. Ronnelid, and P. Venge.** 2011. Activity and turnover of eosinophil and neutrophil granulocytes are altered in visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol* **41**:463-9.

9. **Engwerda, C. R., and P. M. Kaye.** 2000. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol Today* **21**:73-8.

10. **Gangneux, J. P., L. Donaghy, and P. Marty.** 2006. [Liver involvement during visceral leishmaniasis]. *Gastroenterol Clin Biol* **30**:1027-32.

11. **Ghalib, H. W., J. A. Whittle, M. Kubin, F. A. Hashim, A. M. el-Hassan, K. H. Grabstein, G. Trinchieri, and S. G. Reed.** 1995. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. *J Immunol* **154**:4623-9.

12. **Goodbourn, S.** 1990. The regulation of beta-interferon gene expression. *Semin Cancer Biol* **1**:89-95.

13. **Gregory, D. J., M. Godbout, I. Contreras, G. Forget, and M. Olivier.** 2008. A novel form of NF-kappaB is induced by *Leishmania* infection: involvement in macrophage gene expression. *Eur J Immunol* **38**:1071-81.

14. **Hazlett, L. D., S. A. McClellan, R. P. Barrett, X. Huang, Y. Zhang, M. Wu, N. van Rooijen, and E. Szliter.** 2010. IL-33 shifts macrophage polarization, promoting resistance against *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**:1524-32.

15. **Homma, Y., S. Cao, X. Shi, and X. Ma.** 2007. The Th2 transcription factor c-Maf inhibits IL-12p35 gene expression in activated macrophages by

targeting NF-kappaB nuclear translocation. *J Interferon Cytokine Res* **27**:799-808.

16. **Humphreys, N. E., D. Xu, M. R. Hepworth, F. Y. Liew, and R. K. Grencis.** 2008. IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *J Immunol* **180**:2443-9.

17. **Jones, L. A., F. Roberts, M. B. Nickdel, F. Brombacher, A. N. McKenzie, F. L. Henriquez, J. Alexander, and C. W. Roberts.** 2010. IL-33 receptor (T1/ST2) signalling is necessary to prevent the development of encephalitis in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Eur J Immunol* **40**:426-36.

18. **Kakkar, R., and R. T. Lee.** 2008. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov* **7**:827-40.

19. **Kim, Y. H., T. Y. Yang, C. S. Park, S. H. Ahn, B. K. Son, J. H. Kim, D. H. Lim, and T. Y. Jang.** 2012. Anti-IL-33 antibody has a therapeutic effect in a murine model of allergic rhinitis. *Allergy* **67**:183-90.

20. **Kropf, P., Q. Bickle, S. Herath, R. Klemenz, and I. Muller.** 2002. Organ-specific distribution of CD4+ T1/ST2+ Th2 cells in *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol* **32**:2450-9.

21. **Kropf, P., S. Herath, R. Klemenz, and I. Muller.** 2003. Signaling through the T1/ST2 molecule is not necessary for Th2 differentiation but is important for the regulation of type 1 responses in nonhealing *Leishmania major* infection. *Infect Immun* **71**:1961-71.

22. **Kunes, P., Z. Holubcova, M. Kolackova, and J. Krejsek.** 2010. Interleukin-33, a novel member of the IL-1/IL-18 cytokine family, in cardiology and cardiac surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* **58**:443-9.

23. **Kurowska-Stolarska, M., A. Hueber, B. Stolarski, and I. B. McInnes.** 2011. Interleukin-33: a novel mediator with a role in distinct disease pathologies. *J Intern Med* **269**:29-35.

24. **Kurowska-Stolarska, M., P. Kewin, G. Murphy, R. C. Russo, B. Stolarski, C. C. Garcia, M. Komai-Koma, N. Pitman, Y. Li, W. Niedbala, A. N. McKenzie, M. M. Teixeira, F. Y. Liew, and D. Xu.** 2008. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol* **181**:4780-90.

25. **Le, H. T., V. G. Tran, W. Kim, J. Kim, H. R. Cho, and B. Kwon.** 2012. IL-33 priming regulates multiple steps of the neutrophil-mediated anti-*Candida albicans* response by modulating TLR and dectin-1 signals. *J Immunol* **189**:287-95.

26. **Liew, F. Y.** 2012. IL-33: a Janus cytokine. *Ann Rheum Dis* **71 Suppl 2**:i101-4.

27. **Liew, F. Y., N. I. Pitman, and I. B. McInnes.** 2010. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol* **10**:103-10.

28. **Locksley, R. M., F. P. Heinzel, M. D. Sadick, B. J. Holaday, and K. D. Gardner, Jr.** 1987. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann Inst Pasteur Immunol* **138**:744-9.
29. **Mansueto, P., G. Vitale, G. Di Lorenzo, G. B. Rini, S. Mansueto, and E. Cillari.** 2007. Immunopathology of leishmaniasis: an update. *Int J Immunopathol Pharmacol* **20**:435-45.
30. **Marvie, P., M. Lisbonne, A. L'Helgoualc'h, M. Rauch, B. Turlin, L. Preisser, K. Bourd-Boittin, N. Theret, H. Gascan, C. Piquet-Pellorce, and M. Samson.** 2010. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *J Cell Mol Med* **14**:1726-39.
31. **Maxwell, P. J., R. Gallagher, A. Seaton, C. Wilson, P. Scullin, J. Pettigrew, I. J. Stratford, K. J. Williams, P. G. Johnston, and D. J. Waugh.** 2007. HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells. *Oncogene* **26**:7333-45.
32. **Mehrotra, S., M. Fakiola, J. Oommen, S. E. Jamieson, A. Mishra, M. Sudarshan, P. Tiwary, D. S. Rani, K. Thangaraj, M. Rai, S. Sundar, and J. M. Blackwell.** 2011. Genetic and functional evaluation of the role of CXCR1 and CXCR2 in susceptibility to visceral leishmaniasis in north-east India. *BMC Med Genet* **12**:162.
33. **Miller, A. M., D. L. Asquith, A. J. Hueber, L. A. Anderson, W. M. Holmes, A. N. McKenzie, D. Xu, N. Sattar, I. B. McInnes, and F. Y. Liew.** 2010. Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. *Circ Res* **107**:650-8.
34. **Miller, A. M., and F. Y. Liew.** 2011. The IL-33/ST2 pathway--A new therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* **131**:179-86.
35. **Miller, A. M., D. Xu, D. L. Asquith, L. Denby, Y. Li, N. Sattar, A. H. Baker, I. B. McInnes, and F. Y. Liew.** 2008. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med* **205**:339-46.
36. **Milovanovic, M., V. Volarevic, G. Radosavljevic, I. Jovanovic, N. Pejnovic, N. Arsenijevic, and M. L. Lukic.** 2012. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol Res* **52**:89-99.
37. **Mirchandani, A. S., R. J. Salmond, and F. Y. Liew.** 2012. Interleukin-33 and the function of innate lymphoid cells. *Trends Immunol* **33**:389-96.
38. **Moussion, C., N. Ortega, and J. P. Girard.** 2008. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One* **3**:e3331.
39. **Murphy, T. L., M. G. Cleveland, P. Kulesza, J. Magram, and K. M. Murphy.** 1995. Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. *Mol Cell Biol* **15**:5258-67.
40. **Murray, H. W.** 2000. Mononuclear cell recruitment, granuloma assembly, and response to treatment in experimental visceral leishmaniasis: intracellular adhesion molecule 1-dependent and -independent regulation. *Infect Immun* **68**:6294-9.
41. **Oboki, K., T. Ohno, N. Kajiwara, H. Saito, and S. Nakae.** 2010. IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. *Allergol Int* **59**:143-60.
42. **Ohmori, Y., S. Fukumoto, and T. A. Hamilton.** 1995. Two structurally distinct kappa B sequence motifs cooperatively control LPS-induced KC gene transcription in mouse macrophages. *J Immunol* **155**:3593-600.
43. **Palmer, G., and C. Gabay.** 2011. Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. *Nat Rev Rheumatol* **7**:321-9.
44. **Palmer, G., D. Talabot-Ayer, C. Lamacchia, D. Toy, C. A. Seemayer, S. Viatte, A. Finckh, D. E. Smith, and C. Gabay.** 2009. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum* **60**:738-49.
45. **Piehler, D., A. Grahner, M. Eschke, T. Richter, G. Kohler, W. Stenzel, and G. Alber.** 2012. T1/ST2 promotes T helper 2 cell activation and polyfunctionality in bronchopulmonary mycosis. *Mucosal Immunol*.
46. **Robert-Gangneux, F., A. S. Drogoul, O. Rostan, C. Piquet-Pellorce, J. Cayon, M. Lisbonne, A. Herbelin, H. Gascan, C. Guiguen, M. Samson, and J. P. Gangneux.** 2012. Invariant NKT cells drive hepatic cytokinetic microenvironment favoring efficient granuloma formation and early control of *Leishmania donovani* infection. *PLoS One* **7**:e33413.
47. **Saha, S., S. Mondal, A. Banerjee, J. Ghose, S. Bhowmick, and N. Ali.** 2006. Immune responses in kala-azar. *Indian J Med Res* **123**:245-66.
48. **Sakai, N., H. L. Van Sweringen, R. C. Quillin, R. Schuster, J. Blanchard, J. M. Burns, A. D. Tevar, M. J. Edwards, and A. B. Lentsch.** 2012. Interleukin-33 is hepatoprotective during liver ischemia/reperfusion in mice. *Hepatology* **56**:1468-78.
49. **Sanada, S., D. Hakuno, L. J. Higgins, E. R. Schreiter, A. N. McKenzie, and R. T. Lee.** 2007. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest* **117**:1538-49.
50. **Schmitz, J., A. Owyang, E. Oldham, Y. Song, E. Murphy, T. K. McClanahan, G. Zurawski, M. Moshrefi, J. Qin, X. Li, D. M. Gorman, J. F. Bazan, and R. A. Kastelein.** 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T

helper type 2-associated cytokines. *Immunity* **23**:479-90.

51. **Seidelin, J. B., G. Rogler, and O. H. Nielsen.** 2011. A role for interleukin-33 in T(H)2-polarized intestinal inflammation? *Mucosal Immunol* **4**:496-502.

52. **Singh, V. K., S. Balaraman, P. Tewary, and R. Madhubala.** 2004. *Leishmania donovani* activates nuclear transcription factor-kappaB in macrophages through reactive oxygen intermediates. *Biochem Biophys Res Commun* **322**:1086-95.

53. **Smelt, S. C., S. E. Cotterell, C. R. Engwerda, and P. M. Kaye.** 2000. B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *J Immunol* **164**:3681-8.

54. **Stager, S., J. Alexander, K. C. Carter, F. Brombacher, and P. M. Kaye.** 2003. Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. *Infect Immun* **71**:4804-7.

55. **Sun, P., Q. Ben, S. Tu, W. Dong, X. Qi, and Y. Wu.** 2011. Serum interleukin-33 levels in patients with gastric cancer. *Dig Dis Sci* **56**:3596-601.

56. **Townsend, M. J., P. G. Fallon, D. J. Matthews, H. E. Jolin, and A. N. McKenzie.** 2000.

T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med* **191**:1069-76.

57. **Trajkovic, V., M. J. Sweet, and D. Xu.** 2004. T1/ST2--an IL-1 receptor-like modulator of immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**:87-95.

58. **Ueda, A., K. Okuda, S. Ohno, A. Shirai, T. Igarashi, K. Matsunaga, J. Fukushima, S. Kawamoto, Y. Ishigatsubo, and T. Okubo.** 1994. NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J Immunol* **153**:2052-63.

59. **Widmer, U., K. R. Manogue, A. Cerami, and B. Sherry.** 1993. Genomic cloning and promoter analysis of macrophage inflammatory protein (MIP)-2, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, members of the chemokine superfamily of proinflammatory cytokines. *J Immunol* **150**:4996-5012.

60. **Xu, D., H. R. Jiang, P. Kewin, Y. Li, R. Mu, A. R. Fraser, N. Pitman, M. Kurowska-Stolarska, A. N. McKenzie, I. B. McInnes, and F. Y. Liew.** 2008. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:10913-8.

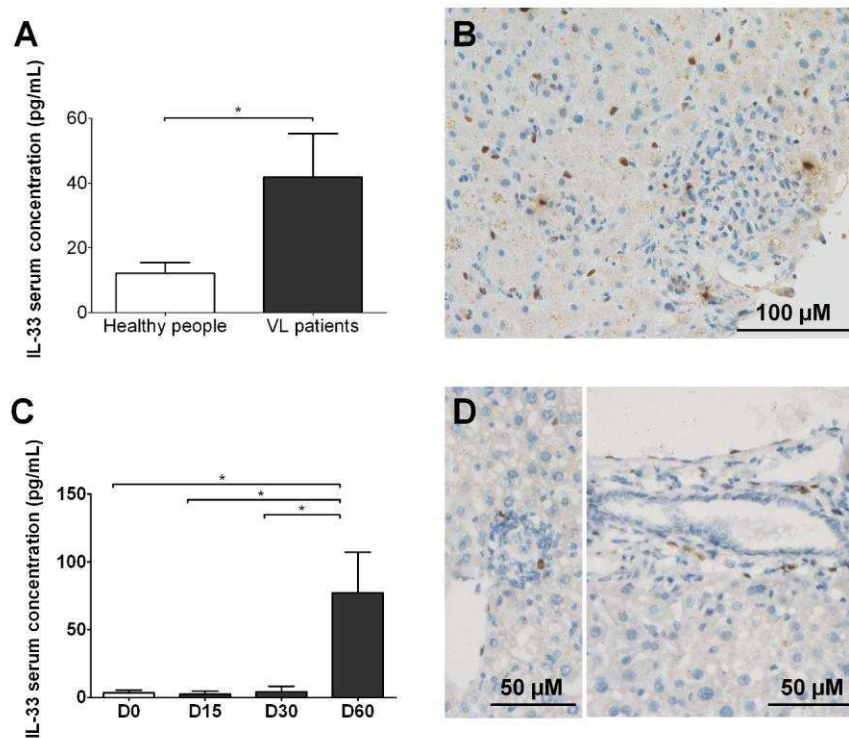


Figure 1: Dosage of serum IL-33 and IL-33 hepatic expression in patients with visceral leishmaniasis and in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. IL-33 was quantified by ELISA in the serum of VL patients compared with healthy donors (A). IL-33 expression was detected by immunohistochemistry in the liver of a VL patient; picture was acquired at a x400 magnification (B). IL-33 was quantified by ELISA in the serum of BALB/c mice infected with *L. donovani* after 15, 30 or 60 days post-infection (D15, D30 and D60) compared with non infected mice (D0) (C). IL-33 expressing cells were detected by immunohistochemistry on liver section of infected BALB/c mice (D60); picture was acquired at a x400 magnification (D).

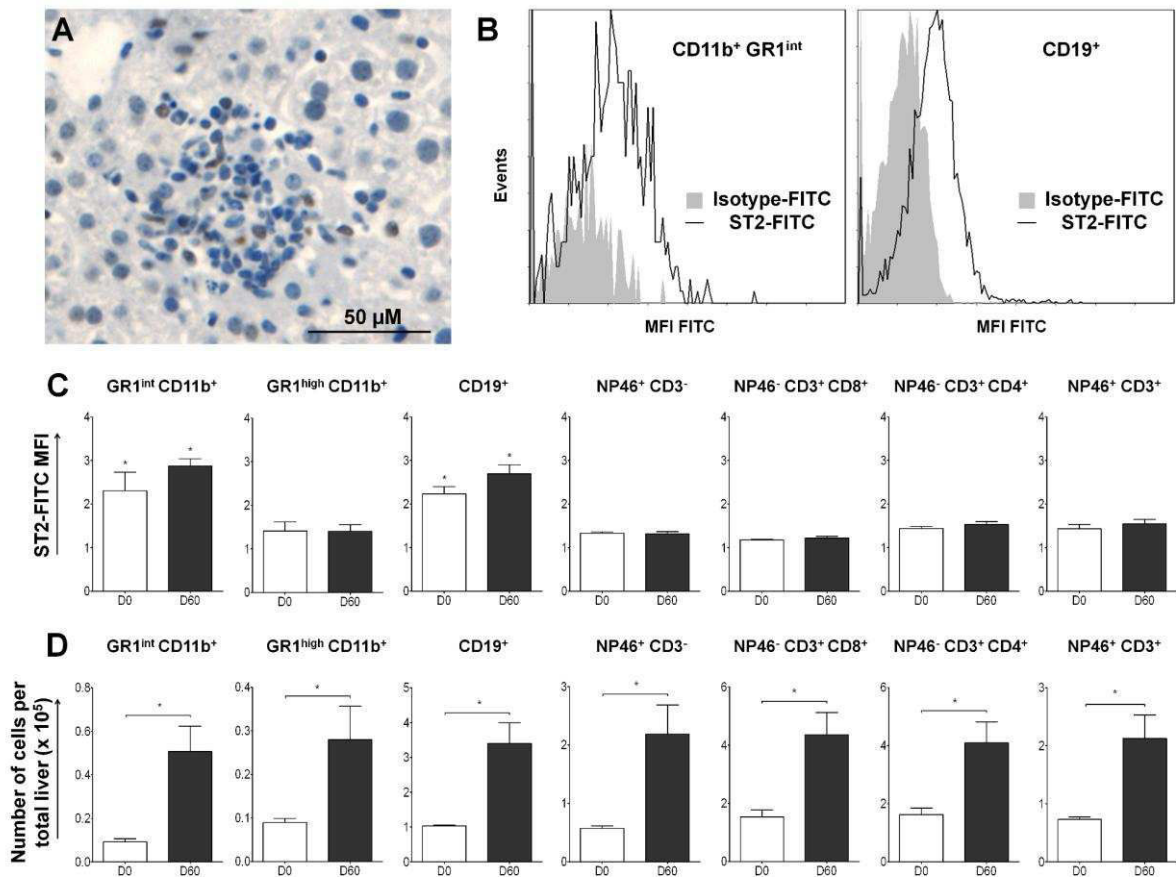


Figure 2: ST2 hepatic in the liver of BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. ST2 expression was detected by immunohistochemistry in the liver of infected BALB/c mice (D60); picture was acquired at a x400 magnification (A) The immune cells in the total liver of BALB/c mice were characterized and quantified by a flow cytometry analysis as explained in the materials and methods section in non infected (D0) or infected mice at 60 days post-infection (D60). ST2 was detected in GR1^{int} CD11b⁺ cells and CD19⁺ cells; grey curve represents the control isotype; black transparent curve represents the specific ST2 staining. This panel is representative of 3-4 mice per group (B). The expression of ST2 receptor was quantified in each characterized cell types; ST2 expression was expressed by the ratio of ST2/control Ig-FITC mean fluorescence intensities (MFI). The ratio was annotated * when significantly higher than 1 (C). The number of infiltrating cells in the total liver of mice was quantified by flow cytometry at D0 and D60 (D).

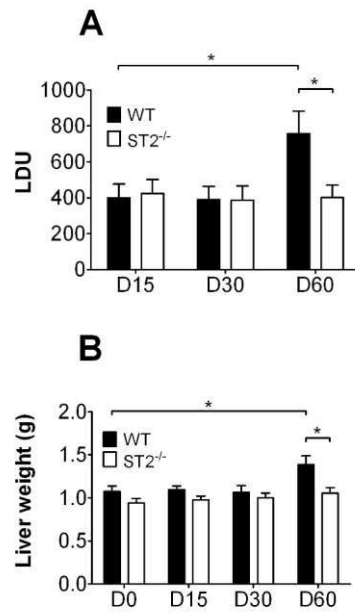


Figure 3: Hepatic parasite burden and liver weight in BALB/c WT and ST2^{-/-} mice after infection with *Leishmania donovani*. Liver parasite burden was determined on day 15, day 30, and day 60 post-infection (D15, D30 and D60) by microscopic counting of Giemsa-stained tissue sections, and expressed as LDU (number of parasites/1000 nuclei x liver weight (mg)) (A). The liver was weighed over the course of infection in WT and ST2^{-/-} mice from three independent experiments (B). Data are the mean \pm SEM for each group of mice (7-13 mice per group from three independent experiments).

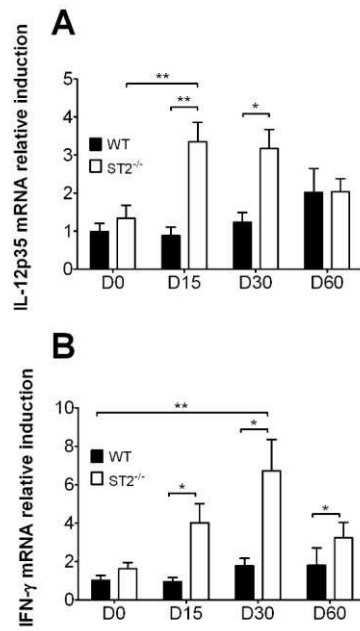


Figure 4: Kinetics of hepatic mRNA induction and expression of IL-4, IL-12 and IFN- γ in WT and ST2^{-/-} mice infected with *Leishmania donovani*. mRNA induction of IL-12 (A) and IFN- γ (B) were quantified by quantitative PCR in liver extracts at various time points after infection and normalized by comparison to 18S mRNA. Data are the mean \pm SEM for each group of mice (7-13 mice per group from three independent experiments).

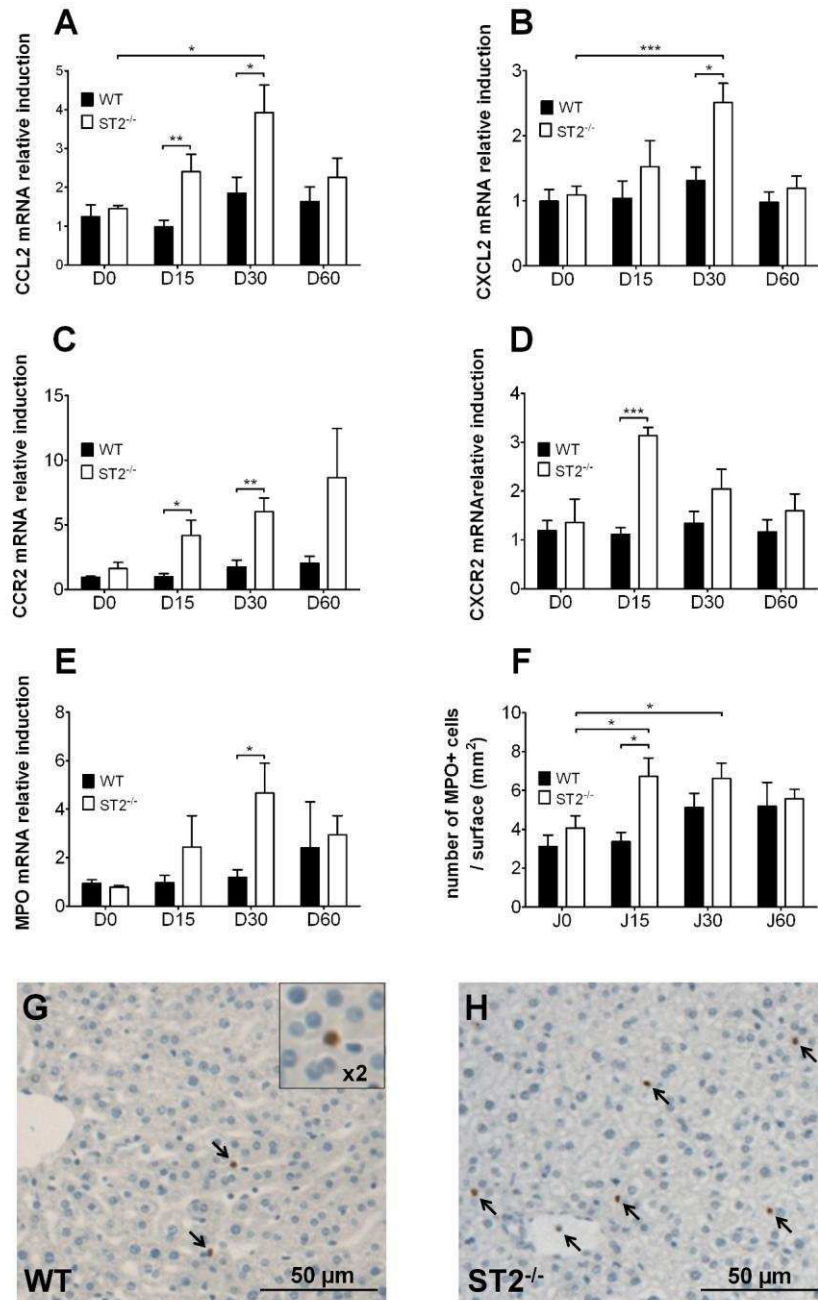


Figure 5: Recruitment of polymorphonuclear neutrophils and monocytes in the liver of WT and ST2^{-/-} mice infected with *Leishmania donovani*. Expression and induction of CCL2 (A), CXCL2 (B), their receptors CCR2 (C) and CXCR2 (D) and MPO (E) were quantified by quantitative PCR at various time points after infection and normalized by comparison to 18S mRNA. MPO⁺ cells were stained by immunohistochemistry and counted per mm² of liver section during the course of the disease in infected WT and ST2^{-/-} mice (F). Data are expressed as mean ± SEM for each group of mice (7-13 mice per group from three independent experiments). Representative field of MPO⁺ staining by immunohistochemistry at 15 days post-infection in WT (G) or ST2^{-/-} mice (H), at a x100 magnification. MPO⁺ cells are pointed with black arrows.

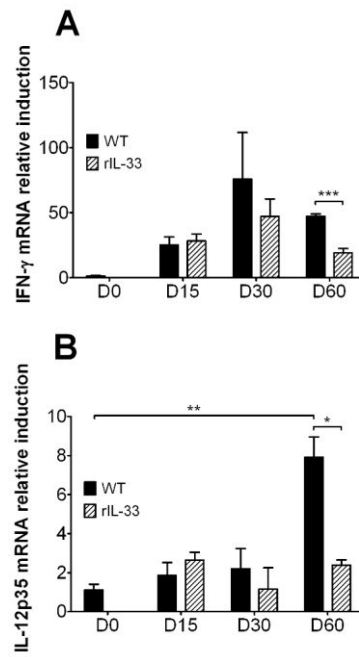


Figure 6: Kinetics of hepatic mRNA induction and expression of IL-12 and IFN- γ in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani* and treated with recombinant IL-33 (rIL-33) or non treated (NT). mRNA induction of IL-12 (A) and IFN- γ (B) were quantified by quantitative PCR in liver extracts at various time points after infection and normalized by comparison to 18S mRNA. Data are the mean \pm SEM for each group of mice (7-13 mice per group from three independent experiments).

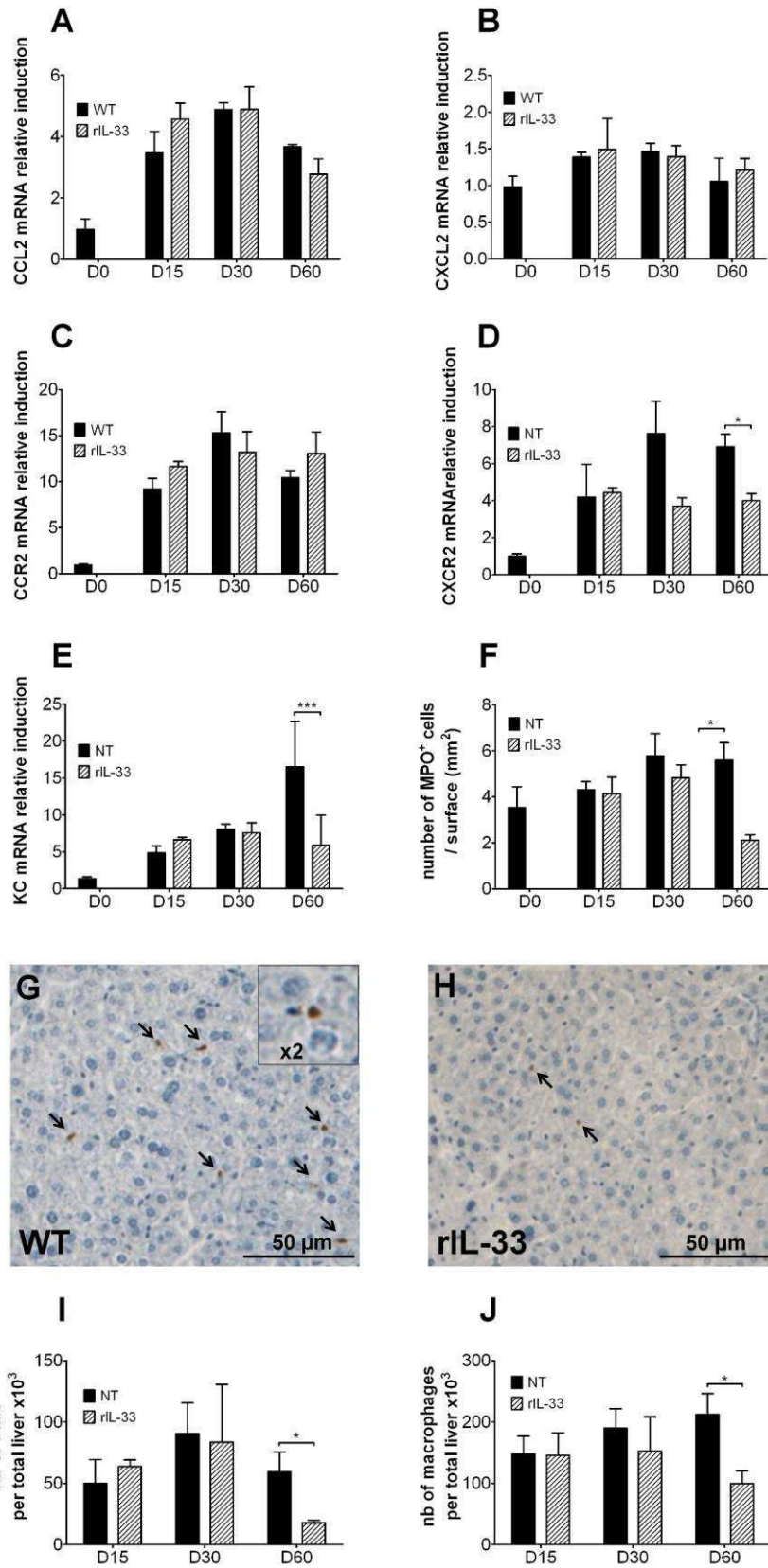


Figure 7: Recruitment of polymorphonuclear neutrophils and monocytes in the liver of BALB/c mice infected with *Leishmania donovani* and treated with recombinant IL-33 (rIL-33) or non treated (NT).

Legend to figure 7: Recruitment of polymorphonuclear neutrophils and monocytes in the liver of BALB/c mice infected with *Leishmania donovani* and treated with recombinant IL-33 (rIL-33) or non treated (NT). Expression and induction of CCL2 (A), CXCL2 (B), their receptors CCR2 (C) and CXCR2 (D) and KC (E) were quantified by quantitative PCR at various time points after infection and normalized by comparison to 18S mRNA. MPO⁺ cells were stained by immunochemistry and counted per mm² of liver section during the course of the disease in infected NT and rIL-33 treated mice (F). Data are expressed as mean \pm SEM for each group of mice (7-13 mice per group from three independent experiments). MPO⁺ cells are pointed with black arrows. Representative field of MPO⁺ staining by immunohistochemistry at 60 days post-infection in WT (G) or ST2^{-/-} mice (H), at a x100 magnification. MPO⁺ cells are pointed with black arrows. A flow cytometry analysis was performed to quantify polymorphonuclear neutrophils (PMN, CD11b⁺ GR1^{high}) (I) and macrophages (CD11b⁺ GR1^{int}) (J) in the total liver of NT or rIL-33 treated mice, as described in materials and methods section.

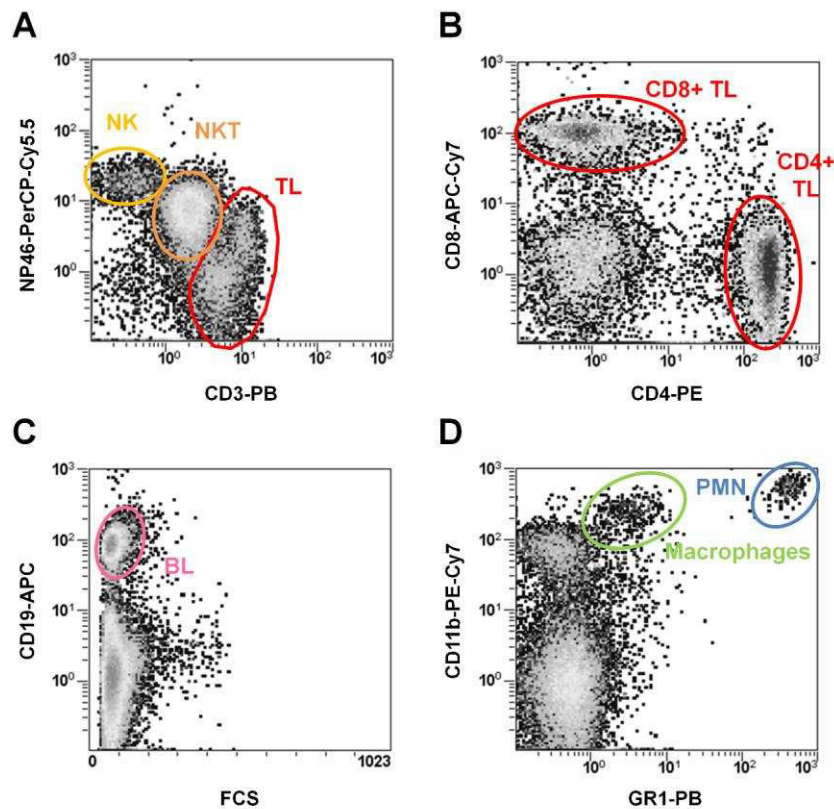


Figure S1: Flow cytometry gating strategy. Different immune cell types were identified and gated as follows: NK cells were NP46⁺ CD3⁻, NKT cells were NP46⁺ CD3⁺ and T lymphocytes (TL) were NP46⁻ CD3⁺ (A). T lymphocytes were separated regarding their expression of CD8 and CD4 (B). B lymphocytes (BL) were CD19⁺ (C). Polymorphonuclear neutrophils (PMN) were GR1^{high} CD11b⁺, macrophages were GR1^{int} CD11b⁺ (D).

Human hepatic stellate cells in primary culture are safe targets for *Leishmania donovani*

O. ROSTAN¹, F. ROBERT-GANGNEUX^{1,2}, M. LAMBERT³, M. SAMSON¹
and J. P. GANGNEUX^{1,2*}

¹INSERM U1085, IRSET, Université Rennes 1, 2 avenue du Professeur Léon Bernard, F-35043 Rennes, France

²Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, 2 avenue du Professeur Léon Bernard, F-35033 Rennes, France

³SFR Biosit UMS 3480–U 018, Plateforme IBiSA MRic-Photonics, 2 avenue du Professeur Léon Bernard, F-35043 Rennes, France, 35043 Rennes Cedex, France

(Received 13 July 2012; revised 28 September and 16 October 2012; accepted 17 October 2012; first published online 20 December 2012)

SUMMARY

Leishmania parasites can escape the immune response by invading cell types lacking leishmanicidal mechanisms. Silent persistence of *Leishmania* parasites in the host organism is responsible for asymptomatic carriage and relapses after cured leishmaniasis. Here, we studied the interaction between Hepatic Stellate Cells (HSC) and *Leishmania*. An original model of human HSC in primary culture infected with *L. donovani* was developed. The presence of intracellular parasites was studied and quantified using optical and confocal microscopy. HSC characteristics were studied using microscopy, methylene blue assay, long-term cultures and qPCR. We showed for the first time that human HSC are permissive to *L. donovani* infection, with no modification of HSC survival, growth rate and proinflammatory and fibrogenic characteristics. Intracellular parasites did not replicate but HSC had no effect on their survival. Indeed, after a 40-day culture, infected HSC cultures transferred on NNN medium yielded new promastigotes that were able to proliferate and efficiently infect new cells. HSC are permissive to *L. donovani*, with neither parasite killing nor apparent cell damage. Thus, HSC could act as potent sanctuary cells for *Leishmania* in the liver, which could partially explain parasite reactivation after an asymptomatic carriage or a cured visceral leishmaniasis.

Key words: *Leishmania donovani*, visceral leishmaniasis, liver, hepatic stellate cells, sanctuary cells, asymptomatic carriage, relapses.

INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL) is a vector-borne systemic disease, caused by *Leishmania* protozoans, especially *L. donovani* and *L. infantum* (*L. chagasi*). More than 500 000 VL cases per year are reported worldwide (Desjeux, 2004). Following promastigote inoculation by sandflies, parasites are passively phagocytosed by competent cells and disseminate through the blood flow towards target organs, i.e. bone marrow, spleen and liver. The main symptoms of VL are anarctic fever, hepatosplenomegaly, substantial weight loss, and finally death if left untreated. Efficient chemotherapy usually leads to a life-long immune response and allows clearance of *Leishmania* intracellular amastigotes and patient recovery. However, relapse or reactivation episodes frequently occur in seriously immunocompromised patients such as HIV-positive patients (Alvar *et al.* 1997, 2008), but also in organ transplant patients

(Basset *et al.* 2005) and occasionally in other patients who are apparently immunocompetent (Dereure *et al.* 2003; Gorski *et al.* 2010; Kajaia *et al.* 2011). Reactivation can occur after several years of residence in a non-endemic area and despite a well conducted therapy. Moreover, after *L. infantum* (*L. chagasi*) infection, it is now admitted that a great number of infections can remain asymptomatic and the disease can develop later on (Michel *et al.* 2011).

Leishmania parasites have developed various strategies to escape from the host immune system, which have been extensively reviewed (Zambrano-Villa *et al.* 2002; Antoine *et al.* 2004; Olivier *et al.* 2005; Kima, 2007; Bogdan, 2008). Intracellular amastigotes are characterized by having a high resistance against low pH, hydrogen peroxide (H₂O₂), nitric oxide (NO) and lysosomal enzymes (Mauel, 1996; Miller *et al.* 2000). Then, amastigotes are able to initiate an inappropriate immune response with reduced interleukin (IL-12) that allows parasite survival (Reiner *et al.* 1994). Finally, *Leishmania* parasites can evade the immune response, by invading cell types lacking leishmanicidal effector mechanisms, using them as sanctuary cells where they can persist in a latent stage until their further release

* Corresponding author: Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine, 2 Avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes, France. Tel.: 00332 23 23 44 90; Fax: 00332 23 23 46 29. E-mail address: jean-pierre.gangneux@univ-rennes1.fr

(Rittig and Bogdan, 2000). Limited data are available on potential sanctuary cells in deep sites during VL, such as the spleen or the liver.

During VL, Kupffer cells (KC) are target cells for *Leishmania* in the liver and allow the formation of inflammatory granulomas that lead to parasite clearance (Murray, 2001; Kaye *et al.* 2004). Hepatocytes which are not professional phagocytic cells, were shown to be permissive to *L. donovani in vitro* (Gangneux *et al.* 2005). Hepatic stellate cells (HSC) are another important cell type in the liver. They are localized in the Disse's spaces and account for approximately one third of the non-parenchymal cell population (Friedman, 2008b). HSC are at a quiescent stage in the healthy liver but can become activated in the setting of chronic hepatic inflammation. Once activated, HSC proliferate and acquire a myofibroblast-like phenotype (Friedman, 2008a). They can secrete pro-fibrotic cytokines such as TGF- β , IL-6 and IL-33 (Gressner *et al.* 2002; Thirunavukkarasu *et al.* 2006; Marvie *et al.* 2010), and contribute to hepatic fibrosis through production of collagen fibres and structural glycoproteins (Tsukada *et al.* 2006), and inhibition of matrix degradation (Arthur, 2000). Interestingly, an increase of the number of HSC, the deposition of collagen fibres and the enlargement of the Disse's spaces were demonstrated in 35 out of 47 biopsies or necropsies from VL patients (Duarte and Corbett, 1987). Whereas skin and lymph node fibroblasts have been shown to be permissive to *L. major*, no data are available about the interaction of HSC and *Leishmania donovani*. Skin fibroblasts were proposed to be safe targets for *L. major* during cutaneous leishmaniasis (CL), which could explain life-long parasite persistence and patient relapses after efficient chemotherapy (Bogdan *et al.* 2000). In this work, using human HSC in primary culture infected with *L. donovani*, we analysed the complex interplay between this particular cell type and *L. donovani*. We showed that quiescent, as well as activated HSC, are permissive to *L. donovani*, with no apparent impact on HSC functional characteristics following the cell exposure to parasites. Conversely, HSC had no impact on intracellular parasite survival and infection capability, indicating that these cells could be another sanctuary cell type for the parasite.

MATERIALS AND METHODS

Parasite culture

Leishmania donovani strain MHOM/SD/97/LEM3427 Zym MON-18 was isolated from a patient with VL and cryopreserved at the WHO collaborative centre of Montpellier (French Reference Center for *Leishmania*). This strain is regularly passed in mouse to recover promastigotes from the amastigotes of the spleen or the liver, and then it is grown *in vitro*

on Novy-McNeal-Nicolle (NNN) blood Agar. Prior to infection, amplification of promastigotes was carried out by culture in Schneider's *Drosophila* medium (Gibco, Invitrogen) supplemented with 10% FCS, penicillin 200 IU/ml and streptomycin 200 μ g/ml for 6 days, until they reached the infective stationary phase. The infectivity of *L. donovani* promastigotes was assessed by efficient infection of THP-1 driven macrophages and mice.

Cell culture

Human HSC were isolated as previously described from histologically normal biopsy specimens after partial hepatectomy in adult patients from both sexes undergoing hepatic resection for liver metastases (Le Pabic *et al.* 2005; Bourd-Boittin *et al.* 2008; Marvie *et al.* 2010). Access to the biopsy material was in agreement with French laws and satisfied the requirements of the Ethics Committee of the institution. Dissociation of the liver was performed by perfusion with a pronase and collagenase solution by the company Biopredic International (Rennes, France). HSC purification was performed from the first supernatant of liver perfusion enriched in non-parenchymal cells after hepatocyte isolation. It relies on particular properties of HSC naturally rich in vitamin-A, which allow their purification by a single-step density-gradient centrifugation with Nycodenz (Sigma-Aldrich®). For this, the supernatant was centrifuged and the pellet was re-suspended with 7 ml of final volume of cold Gey's balanced salt solution (GBSS), and added with 5 ml of calcium-free GBSS Nycodenz 29%. After mixing of the tube, 1 ml of calcium-free GBSS BSA 0.3% was gently placed on the cell suspension surface. The tube was then centrifuged for 15 min at 1400 *g*, to allow HSC collection at the interface between Nycodenz and BSA, whereas other residual cell types fell to the bottom of the tube. Finally, HSC were washed once in GBSS and seeded on tissue-culture dishes treated by vacuum gas plasma (BD Falcon™, USA) in DMEM GlutaMAX™ containing glucose 1 g/l and completed with 10% FCS, penicillin 200 IU/ml and streptomycin 200 μ g/ml. HSC primary cultures were maintained at 37 °C with 5% CO₂ with a passage every 5–10 days. Purification and culture on plastic dishes is known to spontaneously initiate HSC activation (Friedman, 2008b), so that quiescent HSC are only available for a few days. HSC purity was assessed using a Cy3 mouse monoclonal antibody that specifically targets human α -Smooth Muscle Actin (α SMA) (Sigma-Aldrich®). Labelling of the HSC cytoskeleton showed that activated HSC obtained after the first passage and maintained until passage 8 were 100% α SMA positive.

THP-1 macrophage cells were propagated in RPMI medium containing 10% FCS, penicillin 200 IU/ml and streptomycin 200 μ g/ml.

Cell infection

Freshly purified quiescent HSC were seeded the day before their exposure to *L. donovani*. Activated HSC were seeded in similar conditions. Prior to infection, THP-1 cells were plated in the bottom of culture wells in RPMI supplemented with 2 μ M phorbol 12-myristate-13-acetate (Sigma-Aldrich®). In all cases, the medium was removed after overnight exposure to *L. donovani* (ratio cell/parasites: 1/10) and the wells were thoroughly washed to remove free promastigotes. At the end-point of each experiment, cells were stained with May-Grünwald Giemsa (MGG). The percentage of infected cells and the mean number of parasites per infected cell were recorded after microscopic examination of at least 100 cells per condition with a Zeiss Primostar microscope (magnification:1000X). Pictures were obtained with a Nikon 80i optical microscope (magnification: 600X) equipped with a numerical camera. Each experiment was repeated 3–4 times.

Fluorescent staining and confocal microscopy

Approximately 10^7 *L. donovani* promastigotes were labelled with 2 μ M of PKH-26 (Sigma-Aldrich®) or carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl Ester (CFSE) (Invitrogen) during 5 min following the manufacturer's instructions. The labelled promastigotes were incubated overnight with activated HSC, directly seeded on a FlexiPERM® glass slide (Sigma-Aldrich®) (ratio cell/parasites: 1/10). The slide was vigorously washed 3 times in PBS, fixed with PBS4% formaldehyde, washed and dried. Cells were permeabilized using PBS and 0.5% Triton X-100. Then, we used the fluorescent membrane and Golgi apparatus marker AlexaFluor488-labelled wheat germ agglutinin (WGA) (Molecular Probe®, Invitrogen) or a Cy3 mouse monoclonal antibody anti-human α SMA (Sigma-Aldrich) to highlight HSC shapes, in the presence of a 100-fold excess of mouse immunoglobulins to avoid non-specific background. The cell and parasite nuclei were stained with DRAQ5 (Alexis® Biochemicals, Enzo Life Sciences). Cell slides were submitted to confocal analysis in 200 nm thick planes using a Leica TCS SP5 microscope (Leica Microsystems). Images were processed using LAS-AF software (Leica Microsystems) and images analyses were performed using ImageJ software.

HSC viability test

The viability of HSC exposed to *L. donovani* promastigotes was assessed by a methylene blue colourimetric assay as previously described (Meurette *et al.* 2005). Briefly, activated HSC were seeded in 96-well flat-bottomed plates at a density of 10^5 cells per well and exposed overnight to

L. donovani promastigotes at different cell/parasites ratios (1/5, 1/10 or 1/20). Cells were then thoroughly washed to remove promastigotes and maintained during 1, 3 or 7 days. At each endpoint, cells were washed twice with PBS, and fixed with absolute ethanol for 30 min. Following removal of ethanol, fixed cells were dried and stained for 5 min in methylene blue. After 3 washes with tap water, 100 μ l of 0.1 M HCl per well were added. Plates were analysed using a spectrophotometer (VersaMAX™, Molecular devices) at 620 nm. The percentage of viable cells was calculated by the following formula: (optical density values of HSC exposed to *L. donovani*/optical density values of control HSC) \times 100. HSC treated overnight with H₂O₂ 30% or staurosporine 1 μ M in complete DMEM medium were used as the cell death positive control. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test to compare the viability of HSC exposed to parasites or toxic treatments compared to control uninfected and untreated HSC at each endpoint. A *P*-value <0.05 was considered significant and annotated *.

Long-term follow-up of infected HSC

Approximately 10^5 HSC from 3 different donor patients were exposed to *L. donovani* promastigotes (ratio cell/parasites: 1/10). The following day, the medium was changed and cells were washed with Ca²⁺- and Mg²⁺-free PBS to remove free promastigotes. The 3 cell cultures were maintained in parallel with their non-infected controls during 40 days. The medium was changed every 2 or 3 days and a passage with cell counting was performed every 10 days to quantify cell growth. A detailed observation under an inverted microscope showed the absence of free residual promastigotes in the medium before the first passage. After the fourth passage, cells were centrifuged. The cell pellet obtained from each culture was seeded in NNN blood agar, a culture medium usually used for parasite isolation from human specimens, which favours the propagation of amastigotes and their differentiation into mobile promastigotes. After several passages on NNN medium, promastigotes were recovered and amplified in Schneider's *Drosophila* medium and used to infect THP-1 cells as described above (Fig. 1).

Quantification of gene expression by real-time quantitative PCR (qPCR)

Total cellular RNA was extracted and purified using a NucleoSpin®RNAII Kit (Macherey-Nagel) and reverse transcribed with a High Capacity cDNA Reverse transcription kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Real-time qPCR was performed in 96-well optical plates with

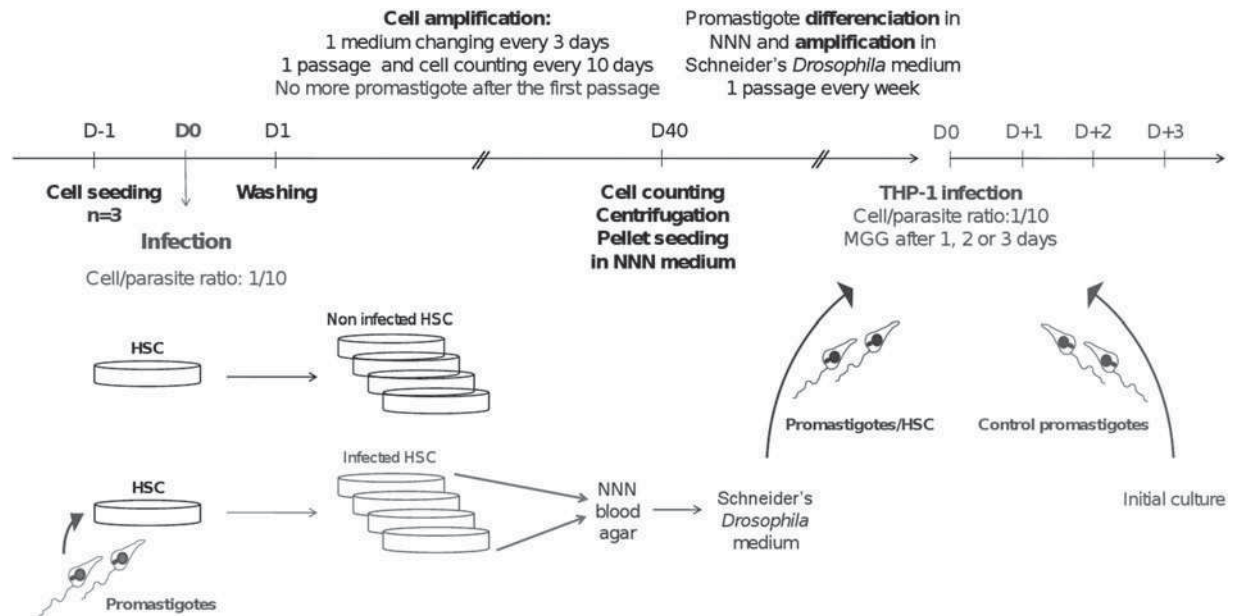


Fig. 1. Long-term monitoring of hepatic stellate cells (HSC) after overnight exposure to *Leishmania donovani*. HSC from 3 different patients were infected with *L. donovani* promastigotes. The following day, the medium was changed and cells were washed to remove free promastigotes. The 3 cell cultures were maintained in parallel with their non-infected controls until 40 days post-infection (D40), with a medium change every 2 or 3 days and a passage and total cell count performed every 10 days. At D40, the cells were centrifuged. The pellet obtained from each culture was seeded in NNN blood agar in order to reactivate intracellular parasites. After 1 month, the mobile promastigotes obtained were amplified in Schneider's *Drosophila* medium and used to infect THP-1 cells for 1, 2 or 3 days, in parallel to control promastigotes from the initial culture. Infection rates were quantified after MGG colouration.

Table 1. Primer sequences for qPCR analyses

Genes	Forward primers	Reverse primers
TGF- β	TGCGCTTGAGATCTTCAAACA	GGGCTAGTCGCACAGACCTC
TNF- α	AACCTCCTCTGCCATCAA	AACCTCCTCTGCCATCAA
IL-6	AGGCACTGGCAGAAAACAAC	TTTTACCAGGCAAGTCTCC
IL-33	AATCAGGTGACGCTGTTG	ACACTCCAGGATCAGTCTTG
IL-1 β	GGGCCTCAAGGAAAAGAATC	TTCTGCTTGAGAGGTGCTGA
MMP-2	TACTGAGTGGCCGTGTTTGC	AGGGAGCAGAGATTTCGGACTT
TIMP-1	ACCCACAGACGGCCTTCT	CTTCTGGTGTCCCCACGAACTT
iNOS	ATGCTCAGCTCATCCGCTAT	CGATGCACAGCTGAGTGAAT
18S	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTACG

Power SYBR[®] green PCR MasterMix (Applied Biosystems), 300 nM primers and cDNA corresponding to 30 ng of total RNA input in a final volume of 20 μ l using the 7300 sequence detection system ABIPrism (Applied Biosystems). Each sample was tested in duplicate in at least 3 independent experiments, to analyse different genes using primers whose sequences are presented in Table 1. The 18S mRNA level was used for normalization of gene expression and induction was calculated by comparison to a 1-day culture of non-infected HSC. The use of 18S as a housekeeping gene for data normalization was validated using SDHA and GAPDH as other control genes (data not shown). A Mann-Whitney statistical analysis was performed to compare the gene expression between

HSC exposed to parasites and control HSC at each endpoint.

RESULT

HSC are permissive to Leishmania donovani

Human activated HSC from 4 different patients were plated on slides and infected overnight with *L. donovani* promastigotes. Then, the medium was removed to eliminate free promastigotes, and the culture was stopped (Day 1) or fresh medium was added for 1 or 2 more day(s) (Day 2 and Day 3). After MGG staining, the presence of intracellular amastigotes was easily recognizable by their 2–5 μ m flagellum-free ovoid shape, from the first day after

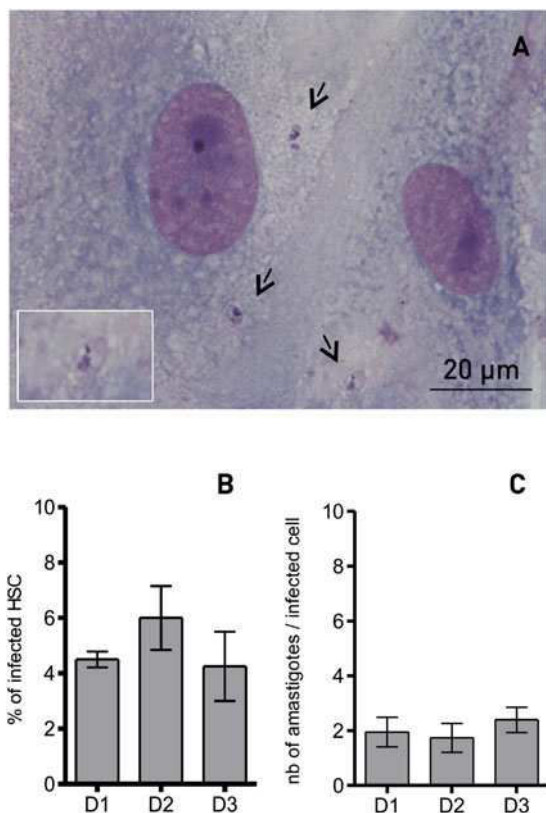


Fig. 2. Analysis of activated hepatic stellate cell (HSC) permissivity to *Leishmania donovani* using optical microscopy. Activated HSC were infected with *L. donovani* promastigotes overnight. After a 1-, 2- or 3-day culture, slides were stained with MGG and examined under optical microscopy. (A) Representative slide of infected HSC (magnification: 600X). (B) Percentage of infected cells over time. (C) Mean number of parasites per infected cell. Arrows indicate intracellular parasites. Results are expressed as mean \pm S.E.M. of at least 3 independent experiments.

cell exposure to *L. donovani* (Fig. 2A). The mean percentage of amastigote-carrying cells was $4.6 \pm 0.3\%$, $6.0 \pm 1.2\%$, and $4.3 \pm 1.3\%$ at Day 1, Day 2 and Day 3, respectively (Fig. 2B). The mean number of parasites per cell was low and stable during the experiment and reached 1.9 ± 0.5 at Day 1, 1.7 ± 0.5 at Day 2 and 2.1 ± 0.6 at Day 3 (Fig. 2C). It was also unchanged after 1 week (data not shown), suggesting that intracellular *Leishmania* were not able to significantly proliferate inside activated HSC.

In order to demonstrate that human HSC are definitely permissive to *L. donovani*, we performed a confocal microscopy analysis. Activated HSC were exposed overnight to PKH-26- labelled *L. donovani* promastigotes and analysed by confocal microscopy in a 200 nm focal plane, after a DRAQ5 nucleus staining and an Alexa488 WGA staining (Fig. 3A–D). We observed that *Leishmania* parasites (red label) were actually inside HSC (green label). To ascertain this observation despite the HSC autofluorescence level, HSC were then infected with promastigotes labelled with CFSE (green label) and stained with a

Cy3 antibody that target α SMA (red label) which is a specific HSC activation marker. This second staining protocol confirmed the presence of amastigotes inside the cells (Fig. 3E–H). Moreover, specific labelling also indicated that infected cells were indeed HSC and not potential residual macrophages, since the Cy3 anti- α SMA antibody did not stain the cytoskeleton of human macrophages in primary culture (data not shown).

To assess to what the extent the HSC are in a quiescent state in a normal liver before parasite infection *in vivo*, we verified whether quiescent human HSC were also permissive to *L. donovani* (Fig. 4A). Using freshly purified quiescent HSC, we quantified approximately 5% of infected cells after MGG colouration, with no obvious parasite proliferation (data not shown). Interestingly, the presence of intracellular parasites in quiescent HSC does not prevent their progressive activation, which is morphologically characterized by cell spreading with loss of lipidic droplets and cytoskeleton densification the week following their purification (Fig. 4A–C).

Leishmania donovani does not affect HSC functional characteristics

In order to determine whether *L. donovani* can affect HSC viability, a methylene blue assay was performed on activated HSC isolated from 4 liver biopsy donors, at different time-points following overnight exposure to promastigotes and at different cell/parasite ratios. No cell toxicity due to *L. donovani* was observed during the 7-day period of observation, whatever the cell/parasite ratio, indicating that human activated HSC are able to survive despite cell interactions or infection with *L. donovani*, whereas control HSC treated with H_2O_2 or staurosporine displayed approximately 70% mortality (Fig. 5A–C).

Because VL is a chronic disease characterized by life-long parasite persistence, we performed a prolonged follow-up of HSC growth after serial passages during 40 days (Fig. 1). No difference in terms of cellular proliferation was observed between infected and non-infected HSC cultures (Fig. 5D).

During chronic liver injury, HSC become progressively activated, then proliferate and acquire a myofibroblast-like fibrogenic phenotype. To better understand the impact of *L. donovani* on HSC differentiation and functions, we quantified by real-time qPCR the expression of pro-inflammatory and fibrogenic genes known to be induced in HSC and/or to be involved in the hepatic immune response during VL. No statistically significant difference was observed in the expression of the important pro-inflammatory and/or pro-fibrotic cytokines TGF- β , IL-6, TNF- α , IL-33 and IL-1 β , as well as of matrix degradation regulators MMP-2 and TIMP-1 between activated HSC exposed or not to *L. donovani* (Table 2).

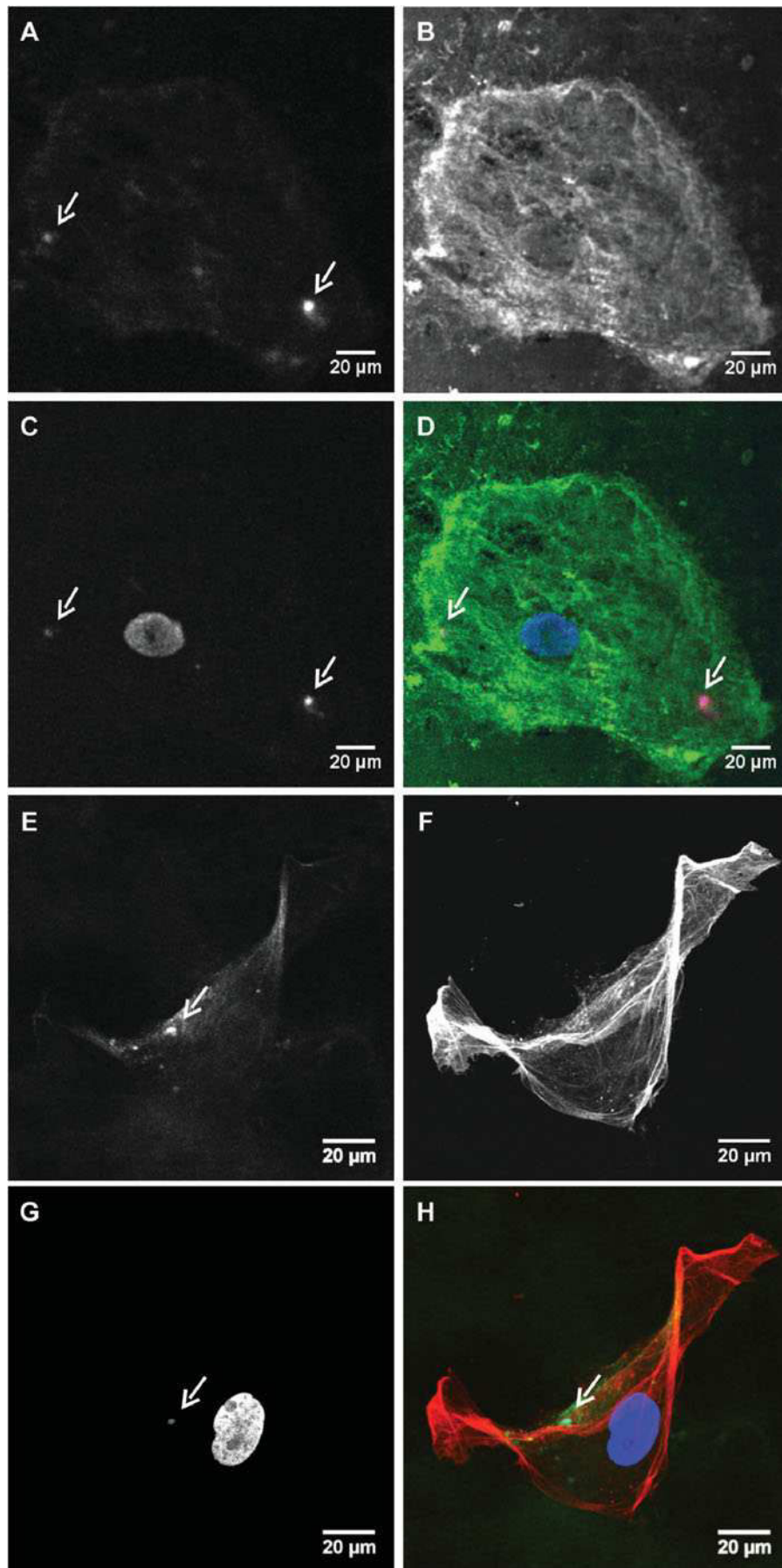


Fig. 3. Analysis of hepatic stellate cell (HSC) permissivity to *Leishmania donovani* using confocal microscopy. PKH-26 or CFSE labelled promastigotes were used to infect activated HSC. One day after infection, the cell shapes were

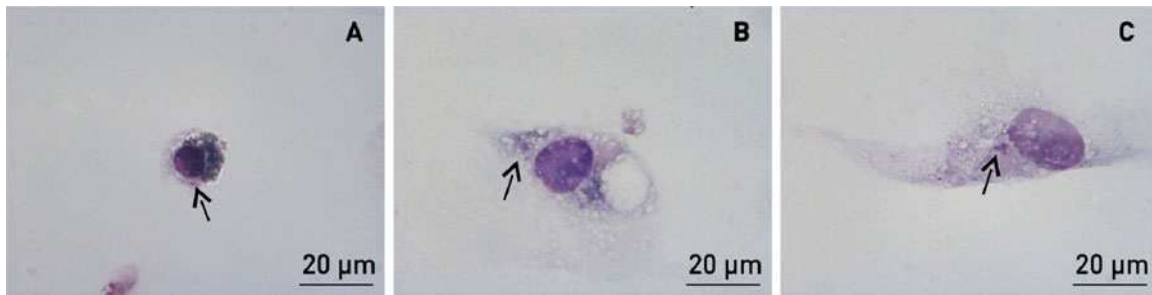


Fig. 4. Observation of hepatic stellate cells (HSC) activation after *Leishmania donovani* infection using optical microscopy. Freshly purified quiescent HSC were infected with *L. donovani* promastigotes overnight. After a 1-day (A), 3-day (B) or 5-day (C) culture, slides were stained with MGG and examined under optical microscopy (magnification: 600X). Arrows show intracellular parasites.

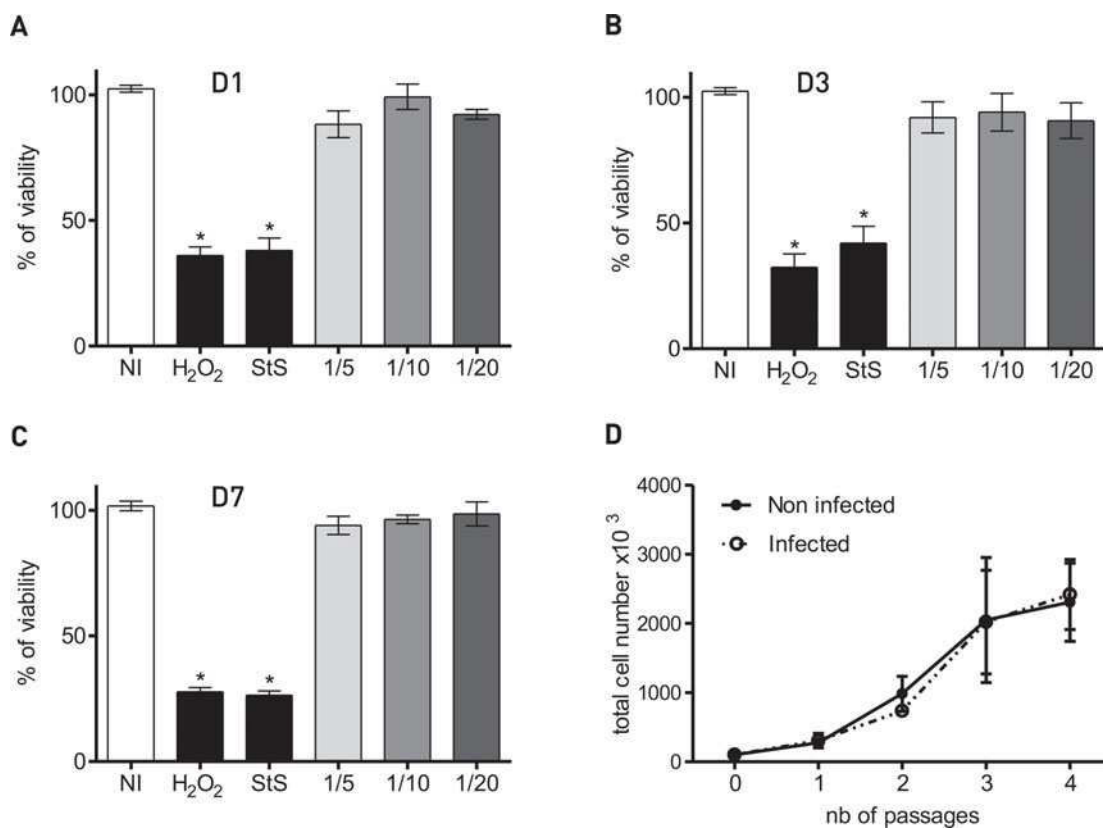


Fig. 5. Quantification of viability and proliferation of hepatic stellate cells (HSC) exposed to *Leishmania donovani*. Human HSC were exposed overnight to *L. donovani* promastigotes with different cell/parasites ratio (1/5, 1/10 and 1/20). Viability was assessed after 1 day (A), 3 days (B) or 7 days (C) using a methylene blue viability test. Non-infected cells were used as the 100% viability control, and overnight treatments with H₂O₂ 30% or 1 µM staurosporine (StS) were used as positive cell death controls. Results are expressed as mean ± s.e.m. of HSC viability from 4 different patients (**P* < 0.05). Human activated HSC from 3 different patients were infected overnight with *L. donovani* promastigotes and maintained in parallel with non-infected cells during 40 days, with a passage and cell count performed every 10 days, as described in Fig. 6. (D) Growth curve of infected and non-infected HSC cultures. Results are expressed as mean ± s.e.m.

highlighted using Alexa488 WGA or a Texas red anti- α SMA antibody, respectively. Nuclei were stained using DRAQ5. Examination was performed by confocal microscopy in a 200 nm thick plane. (A) PKH-26 amastigote labelling. (B) Alexa488 WGA cell staining. (C) DRAQ5 nucleus staining. (D) Overlay of PKH-26 (red), Alexa488 WGA (green) and DRAQ5 (blue) labelling. (E) CFSE parasite labelling. (F) Cy3 α SMA labelling. (G) DRAQ5 nucleus staining. (H) Overlay of CFSE (green), Cy3- α SMA (red) and DRAQ5 (blue) labelling. White arrows show fluorescent parasites.

Table 2. Quantification of pro-inflammatory and fibrogenic gene expression of hepatic stellate cells (HSC) after overnight exposure to *Leishmania donovani*

(Human activated HSC from at least 3 different patients were infected with *L. donovani* promastigotes, then culture was continued until 1, 2 or 3 days (D1, D2 and D3), before real-time qPCR analysis of pro-inflammatory and fibrogenic genes expression. Relative induction level of each gene was normalized with 18S mRNA and compared to its expression in D1 non-infected control cells. Results are expressed as mean \pm s.e.m. The *P*-value represents the result of statistical analysis using the Mann-Whitney test to compare infected and non-infected conditions at each time-point.)

Genes	Days	Exposure to parasites	No exposure	<i>P</i> -value
TGF- β	D1	1.00 \pm 0.00	0.85 \pm 0.28	0.75
	D2	1.56 \pm 1.04	1.01 \pm 0.43	0.80
	D3	0.63 \pm 0.51	0.30 \pm 0.18	0.80
TNF- α	D1	1.00 \pm 0.00	1.94 \pm 1.78	1.00
	D2	0.56 \pm 0.07	1.50 \pm 1.35	1.00
	D3	0.86 \pm 0.30	1.11 \pm 0.94	1.00
IL-6	D1	1.00 \pm 0.00	4.02 \pm 2.64	0.50
	D2	4.10 \pm 1.63	4.79 \pm 3.41	1.00
	D3	3.42 \pm 1.55	3.97 \pm 2.46	1.00
IL-33	D1	1.00 \pm 0.00	1.26 \pm 0.70	1.00
	D2	1.04 \pm 0.40	1.08 \pm 0.35	1.00
	D3	0.56 \pm 0.17	0.78 \pm 0.15	0.70
IL-1 β	D1	1.00 \pm 0.00	4.33 \pm 3.20	1.00
	D2	1.94 \pm 0.26	2.07 \pm 1.07	1.00
	D3	0.89 \pm 0.33	1.08 \pm 0.13	1.00
MMP-2	D1	1.00 \pm 0.00	1.37 \pm 0.87	1.00
	D2	1.17 \pm 0.31	1.54 \pm 0.70	1.00
	D3	1.37 \pm 0.40	1.82 \pm 0.40	0.70
TIMP-1	D1	1.00 \pm 0.00	1.34 \pm 0.87	1.00
	D2	0.67 \pm 0.36	0.99 \pm 0.53	1.00
	D3	0.63 \pm 0.30	0.81 \pm 0.27	1.00

HSC do not affect *L. donovani* viability and cell infection capability

In order to determine whether intracellular *L. donovani* were able to survive in HSC, HSC from 3 different donor patients were exposed overnight to promastigotes and maintained in culture for 40 days. After inoculation in NNN blood agar medium maintained at 27 °C for 4 weeks (Fig. 1), mobile promastigotes in 2 of 3 cultures were observed after 1 and 2 weekly passages, respectively.

To analyse whether HSC could exert phagocytic cell functions, inducible NO synthase (iNOS) expression was analysed by real-time qPCR. A 2-fold lower expression of iNOS was observed in activated HSC compared to plated THP-1. Overnight HSC exposure to *L. donovani* had no effect on iNOS expression level (Fig. 6A).

Finally, to determine whether HSC can alter the virulence of *L. donovani* promastigotes collected from long-term cultured HSC, parasites were amplified by

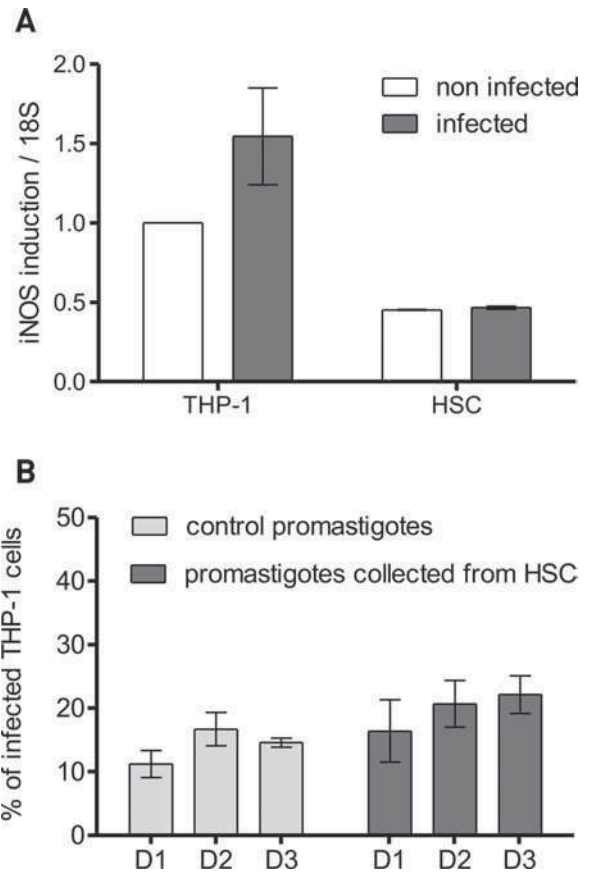


Fig. 6. Lack of leishmanicidal effects of human hepatic stellate cells (HSC). (A) Induction rates of iNOS mRNA in HSC, compared to non-infected control THP-1. Human activated HSC from 3 donors and THP-1 cells were infected overnight with *Leishmania donovani* promastigotes. Real-time qPCR analysis of iNOS mRNA expression was performed after 1, 2 or 3 days and normalized with 18S mRNA expression. Results are expressed as mean \pm s.e.m. (B) Infection rate of THP-1 cells by promastigotes recovered from long-term cultured of human activated HSC transferred on NNN medium. THP-1 cells infected with promastigotes from the initial culture were used as controls. Results are expressed as the percentage of infected cells after microscopic examination of slides stained with MGG and are mean \pm s.e.m. of 3 independent experiments.

subculture in Schneider's *Drosophila* medium and inoculated onto plated THP-1 cells. The infection rates of THP-1 cells were quantified after 1, 2 or 3 days and compared to that obtained with control promastigotes. The infection rate of THP-1 infected with control promastigotes was 11.2 \pm 2.1% at Day 1, 19.1 \pm 2.2% at Day 2 and 13.9 \pm 0.2% at Day 3, whereas it was 16.4 \pm 9% at Day 1, 20.6 \pm 3.6% at Day 2 and 19.3 \pm 1.2% for THP-1 infected with promastigotes collected from HSC (*P*=ns) (Fig. 6B)

DISCUSSION

During visceral leishmaniasis (VL), Kupffer cells (KC) are acknowledged as pivotal phagocytic cells in

the host defence against *Leishmania donovani* infection in the liver (Murray, 2001), whereas little is known on HSC, which play a major role in the fibrotic process (Friedman, 2008a,b) complicating some infectious diseases (Bartley *et al.* 2006; Chang *et al.* 2006; Tomanovic *et al.* 2009) and commonly observed in human VL (Duarte and Corbett, 1987; Corbett *et al.* 1993; el Hag *et al.* 1994). Hepatic fibrosis due to HSC activation was shown to be correlated with the progression of VL and to regress after clinical cure of the disease (Corbett *et al.* 1993; Duarte and Corbett, 1987). Similarly, canine VL is associated with collagen, fibronectin and laminin deposition in the liver, and there is a correlation between fibrosis and parasite loads or severity of the disease in dogs naturally infected with *L. chagasi* (Melo *et al.* 2009). Despite these clinical observations, the *Leishmania*-HSC interaction has never been studied.

In this work, we developed an original model of *L. donovani* infection of HSC in primary culture. For the first time, we provide evidence that human HSC in primary culture are permissive to *L. donovani* promastigotes using confocal microscopy. In order to bypass the autofluorescence level of HSC (Friedman, 2008b), 2 complementary staining protocols of parasites and cells using different fluorescent dyes were performed. In both cases, *Leishmania* parasites were localized inside the cells, clearly demonstrating their permissivity to *L. donovani*, thus raising the question of how the parasite can enter these cells. Several studies have shown that HSC can express surface markers, such as members of the HLA family (MHC-I and MHC-II), lipid presenting molecules (CD1b and CD1c), co-stimulatory proteins (CD80, CD40) and proteins involved in antigen trafficking (CD68). They can otherwise phagocytose latex bead particles, they closely interact with lymphocytes in Disse's spaces, and stimulate T-cell proliferation, suggesting that they share features of antigen presenting cells (Vinas *et al.* 2003; Muhanna *et al.* 2007). Therefore, HSC could phagocytose *Leishmania* promastigotes like professional phagocytic cells.

In our model, the cell infection rate reached 6%, both in activated HSC and in quiescent HSC freshly purified from human liver donors. No effect on activated HSC survival and proliferation was noticed after cell exposure to parasites, showing that contact or infection with promastigotes does not induce cell death or cell cycle disruption. During our study, we analysed the pro-inflammatory and fibrogenic phenotype of activated HSC exposed overnight to the parasite. Unfortunately, it was not possible to analyse separately the mRNA expression of infected cells, because of specific technical limitations: (i) strong and wide-length autofluorescence of HSC limiting phenotype analysis by flow cytometry, and (ii) lack of availability of a cell sorter operating in a negative

pressure environment adapted to sorting of living cells infected with *L. donovani*. Nevertheless, whole HSC exposure to parasites resulting both in a low percentage of infected cells but also in overall contacts and exposure to excreted/secreted antigens even without infection, did not disturb the HSC phenotype. Indeed, the expression of key genes which are the hallmark of HSC activation and hepatic fibrosis, such as TGF- β , IL-6, TNF- α , IL-33, IL-1 β , MMP-2 and TIMP-1 (Gressner *et al.* 2002; Friedman, 2008b; Marvie *et al.* 2010; Thirunavukkarasu *et al.* 2006), was not modified. Furthermore, the spontaneous activation of quiescent HSC, normally observed after several days of *ex vivo* culture (Friedman, 2008b) was never altered following infection with *L. donovani*. These data suggest that the parasite itself has neither the capacity to stimulate HSC fibrogenic phenotype, nor the ability to contribute to the expansion of extracellular matrix and fibrosis through induction of HSC proliferation. Thus, *L. donovani* itself is unlikely to be directly involved in the hepatic fibrogenesis process during VL, but could induce the onset of sustained cytokine responses favouring long-term fibrosis. Indeed, HSC are indirectly modulated by the liver micro-environment via cell-to-cell interactions or more likely via paracrine or cytokine pathways. During VL, it was shown that hypertrophic KC intensively express TGF- β that activates HSC cells for extracellular matrix production (Duarte *et al.* 2009). Thus our results spread a new light on the complex interplay between HSC and KC, which needs to be further explored to better understand the regulation of HSC proliferation and its consequences on liver injuries and hepatic fibrosis during VL.

The absence of modification in functional characteristics of infected HSC raises the hypothesis that they could be sanctuary cells for persisting *L. donovani* parasites. In this work, it was shown that HSC were able to harbour parasites during long-term primary culture (>1 month) and survive without killing parasites. This inability to get rid of *Leishmania* parasites could be explained by their low iNOS expression level compared to THP-1 cells. Indeed this key enzyme is essential for efficient phagocytic function, and is strongly induced in professional phagocytic cells (Green *et al.* 1991; James, 1995). This lack of iNOS induction probably contributes to make these cells a safe target for *L. donovani*. After a 40-day culture and serial passages of HSC, intracellular parasites were able to reactivate in Novy-Nicolle-McNeal (NNN) medium and to convert into promastigotes, for which the infectivity for THP-1 cells was not altered. This observation demonstrates that *L. donovani* can persist in a latent intracellular stage inside HSC until their further release. The sensitivity to leishmanicidal drugs of these latent intracellular parasites could be an interesting aspect to explore.

Sanctuary cells have been described as immune privileged safe targets for pathogens such as *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major* or herpes virus, that contribute to life-long pathogen persistence even after efficient chemotherapies (Bogdan, 2008). During cutaneous leishmaniasis (CL), immature myeloid precursor cells have been described as safe targets for *L. major* (Mirkovich *et al.* 1986), as well as skin and lymph node fibroblasts (Bogdan *et al.* 2000). During VL, a few cell types were postulated to function as safe targets, especially sialoadhesin-positive stromal macrophages of the bone marrow (Leclercq *et al.* 1996; Cotterell *et al.* 2000) and hepatocytes which show a low permissivity level and limited cell damage (Gangneux *et al.* 2005). Interestingly, Bogdan and co-workers reported that persisting *L. major* parasites were largely associated with skin and lymph node fibroblasts lacking leishmanicidal effectors (Bogdan *et al.* 2000). Our results suggest that quiescent and activated myofibroblast-like HSC are able to phagocytose viscerotropic *Leishmania* parasites during VL and to behave in a similar way as fibroblasts during CL. This could be an evading mechanism for *Leishmania* parasites that may explain patient relapses after a cured VL episode. Furthermore, we observed that HSC were permissive to *L. infantum* (data not shown), suggesting that this phenomenon could occur whatever the parasite species involved and explain asymptomatic carriage frequently observed in endemic areas (Michel *et al.* 2011). As KCs regulate HSC growth during VL through TGF- β synthesis (Duarte *et al.* 2009), they could contribute to amplify the number of safe targets cells for *Leishmania* parasites.

In conclusion, human HSC in our model can harbour persisting *L. donovani* parasites and could be a sanctuary cell subset in the liver during VL, which opens new insights into the patho-physiology of immune evasion, asymptomatic carriage and clinical relapse after treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Katia Bourd-Boittin, Dr Sandrine Jouan-Lanhouet, Christelle Manuel, Annie L'Helgoualc'h, Nicolas Vu and Dr Tiphaine Mergey for punctual technical assistance. We thank the Rennes Human Biological Resource Center (CHRU Pontchaillou, Biosit, CNRS UMS 3480, Inserm US 18) and Jacques Le Seyec for contribution to human tissue sampling. We thank Dr Stephanie Dutertre from Biosit platform IBSA MRic-Photonics for assistance for confocal microscopy. We thank the Biosit Histopathology platform H2P2 of Faculté de Médecine for use of their histology facilities. We thank Cindy Nikolic for her contribution to the artwork of the figures.

FINANCIAL SUPPORT

OR was granted by the 'Ministere de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche'. This work was supported by

the 'Institut de Parasitologie de l'Ouest' and a grant from the CPER Bretagne – 360b 2007-2013/ European funding FEDER.

REFERENCES

- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Ter Horst, R., Lopez-Velez, R. and Moreno, J. (2008). The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews* **21**, 334–359. doi: 10.1128/CMR.00061-07.
- Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jimenez, M., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Molina, R. and Moreno, J. (1997). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clinical Microbiology Reviews* **10**, 298–319.
- Antoine, J. C., Prina, E., Courret, N. and Lang, T. (2004). *Leishmania* spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. *Advances in Parasitology*, **58**, 1–68. doi: S0065308X04580016 [pii] 10.1016/S0065-308X(04)58001-6.
- Arthur, M. J. (2000). Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* **279**, G245–249.
- Bartley, P. B., Ramm, G. A., Jones, M. K., Ruddell, R. G., Li, Y. and McManus, D. P. (2006). A contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of *Schistosoma japonicum* egg-induced fibrosis. *International Journal for Parasitology* **36**, 993–1001. doi: S0020-7519(06)00151-2 [pii] 10.1016/j.ijpara.2006.04.015.
- Basset, D., Faraut, F., Marty, P., Dereure, J., Rosenthal, E., Mary, C., Pratlong, F., Lachaud, L., Bastien, P. and Dedet, J. P. (2005). Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. *Microbes and Infection* **7**, 1370–1375. doi: S1286-4579(05)00191-7 [pii] 10.1016/j.micinf.2005.06.002.
- Bogdan, C. (2008). Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cellular Microbiology* **10**, 1221–1234. doi: CMI1146 [pii] 10.1111/j.1462-5822.2008.01146.x.
- Bogdan, C., Donhauser, N., Doring, R., Rollinghoff, M., Diefenbach, A. and Rittig, M. G. (2000). Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *Journal of Experimental Medicine* **191**, 2121–2130.
- Bourd-Boittin, K., Le Pabic, H., Bonnier, D., L'Helgoualc'h, A. and Theret, N. (2008). RACK1, a new ADAM12 interacting protein. Contribution to liver fibrogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 26000–26009. doi: M709829200 [pii] 10.1074/jbc.M709829200.
- Chang, D., Ramalho, L. N., Ramalho, F. S., Martinelli, A. L. and Zucoloto, S. (2006). Hepatic stellate cells in human schistosomiasis *mansonii*: a comparative immunohistochemical study with liver cirrhosis. *Acta Tropica* **97**, 318–323. doi: S0001-706X(06)00006-4 [pii] 10.1016/j.actatropica.2005.12.006.
- Corbett, C. E., Duarte, M. I. and Bustamante, S. E. (1993). Regression of diffuse intralobular liver fibrosis associated with visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **49**, 616–624.
- Cotterell, S. E., Engwerda, C. R. and Kaye, P. M. (2000). *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF- α . *Blood* **95**, 1642–1651.
- Dereure, J., Duong Thanh, H., Lavabre-Bertrand, T., Cartron, G., Bastides, F., Richard-Lenoble, D. and Dedet, J. P. (2003). Visceral leishmaniasis. Persistence of parasites in lymph nodes after clinical cure. *Journal of Infection* **47**, 77–81. doi: S0163445303000021 [pii].
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* **27**, 305–318. doi: 10.1016/j.cimid.2004.03.004 S0147-9571(04)00023-2 [pii].
- Duarte, M. I. and Corbett, C. E. (1987). Histopathological patterns of the liver involvement in visceral leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* **29**, 131–136.
- Duarte, M. I., de Andrade, H. F., Jr., Takamura, C. F., Sesso, A. and Tuon, F. F. (2009). TGF- β and mesenchymal hepatic involvement after visceral leishmaniasis. *Parasitology Research* **104**, 1129–1136. doi: 10.1007/s00436-008-1298-4.
- el Hag, I. A., Hashim, F. A., el Toum, I. A., Homeida, M., el Kalifa, M. and el Hassan, A. M. (1994). Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). *Journal of Clinical Pathology* **47**, 547–551.
- Friedman, S. L. (2008a). Hepatic fibrosis – overview. *Toxicology* **254**, 120–129. doi: S0300-483X(08)00286-2 [pii] 10.1016/j.tox.2008.06.013.
- Friedman, S. L. (2008b). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological Reviews* **88**, 125–172. doi: 88/1/125 [pii]10.1152/physrev.00013.2007.

- Gangneux, J. P., Lemenand, O., Reinhard, Y., Guiguen, C., Guguen-Guillouzo, C. and Gripon, P. (2005). In vitro and ex vivo permissivity of hepatocytes for *Leishmania donovani*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **52**, 489–491. doi: JEU05-3377 [pii] 10.1111/j.1550-7408.2005.00055.x.
- Gorski, S., Collin, S. M., Ritmeijer, K., Keus, K., Gatluak, F., Mueller, M. and Davidson, R. N. (2010). Visceral leishmaniasis relapse in Southern Sudan (1999–2007): a retrospective study of risk factors and trends. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **4**, e705. doi: 10.1371/journal.pntd.0000705.
- Green, S. J., Nacy, C. A. and Meltzer, M. S. (1991). Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. *Journal of Leukocyte Biology* **50**, 93–103.
- Gressner, A. M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K. and Dooley, S. (2002). Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Frontiers in Bioscience* **7**, d793–807.
- James, S. L. (1995). Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiological Reviews* **59**, 533–547.
- Kajaia, M., Morse, D. L., Kamkamidze, G., Butsashvili, M., Chubabria, G., Zenaishvili, O., Kokaia, N. and McNutt, L. A. (2011). Risk factors for relapse of visceral leishmaniasis in Georgia. *Tropical Medicine and International Health* **16**, 186–192. doi: 10.1111/j.1365-3156.2010.02694.x.
- Kaye, P. M., Svensson, M., Ato, M., Maroof, A., Polley, R., Stager, S., Zubairi, S. and Engwerda, C. R. (2004). The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunological Reviews* **201**, 239–253. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00188.x IMR188 [pii].
- Kim, P. E. (2007). The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *International Journal of Parasitology* **37**, 1087–1096. doi: S0020-7519(07)00131-2 [pii] 10.1016/j.ijpara.2007.04.007.
- Le Pabic, H., L'Helgoualc'h, A., Coutant, A., Wewer, U. M., Baffet, G., Clement, B. and Theret, N. (2005). Involvement of the serine/threonine p70S6 kinase in TGF-beta1-induced ADAM12 expression in cultured human hepatic stellate cells. *Journal of Hepatology* **43**, 1038–1044. doi: S0168-8278(05)00421-6 [pii] 10.1016/j.jhep.2005.05.025.
- Leclercq, V., Lebastard, M., Belkaid, Y., Louis, J. and Milon, G. (1996). The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. *Journal of Immunology* **157**, 4537–4545.
- Marvie, P., Lisbonne, M., L'Helgoualc'h, A., Rauch, M., Turlin, B., Preisser, L., Bourd-Boittin, K., Theret, N., Gascan, H., Piquet-Pellorce, C. and Samson, M. (2010). Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **14**, 1726–1739. doi: JCM1801 [pii] 10.1111/j.1582-4934.2009.00801.x.
- Mauel, J. (1996). Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *Advances in Parasitology* **38**, 1–51.
- Melo, F. A., Moura, E. P., Ribeiro, R. R., Alves, C. F., Caliari, M. V., Tafuri, W. L. and Calabrese, K. S. (2009). Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *International Journal of Experimental Pathology* **90**, 538–548. doi: IEP681 [pii] 10.1111/j.1365-2613.2009.00681.x.
- Meurette, O., Lefevre-Orfila, L., Rebillard, A., Lagadic-Gossman, D. and Dimanche-Boitrel, M. T. (2005). Role of intracellular glutathione in cell sensitivity to the apoptosis induced by tumor necrosis factor {alpha}-related apoptosis-inducing ligand/anticancer drug combinations. *Clinical Cancer Research* **11**, 3075–3083. doi: 11/8/3075 [pii] 10.1158/1078-0432.CCR-04-1764.
- Michel, G., Pomares, C., Ferrua, B. and Marty, P. (2011). Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum (L. chagasi)* in human. *Acta Tropica* **119**, 69–75. doi: S0001-706X(11)00176-8 [pii] 10.1016/j.actatropica.2011.05.012.
- Miller, M. A., McGowan, S. E., Gantt, K. R., Champion, M., Novick, S. L., Andersen, K. A., Bacchi, C. J., Yarlett, N., Britigan, B. E. and Wilson, M. E. (2000). Inducible resistance to oxidant stress in the protozoan *Leishmania chagasi*. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 33883–33889. doi: 10.1074/jbc.M003671200 M003671200 [pii].
- Mirkovich, A. M., Galelli, A., Allison, A. C. and Modabber, F. Z. (1986). Increased myelopoiesis during *Leishmania major* infection in mice: generation of 'safe targets', a possible way to evade the effector immune mechanism. *Clinical & Experimental Immunology* **64**, 1–7.
- Muhanna, N., Horani, A., Doron, S. and Safadi, R. (2007). Lymphocyte-hepatic stellate cell proximity suggests a direct interaction. *Clinical & Experimental Immunology* **148**, 338–347. doi: CEI3353 [pii] 10.1111/j.1365-2249.2007.03353.x.
- Murray, H. W. (2001). Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *International Journal of Experimental Pathology* **82**, 249–267. doi: 199 [pii].
- Olivier, M., Gregory, D. J. and Forget, G. (2005). Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical Microbiology Reviews* **18**, 293–305. doi: 18/2/293 [pii] 10.1128/CMR.18.2.293-305.2005.
- Reiner, S. L., Zheng, S., Wang, Z. E., Stowring, L. and Locksley, R. M. (1994). *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *Journal of Experimental Medicine* **179**, 447–456.
- Rittig, M. G. and Bogdan, C. (2000). *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitology Today* **16**, 292–297. doi: S0169-4758(00)01692-6 [pii].
- Thirunavukkarasu, C., Watkins, S. C. and Gandhi, C. R. (2006). Mechanisms of endotoxin-induced NO, IL-6, and TNF-alpha production in activated rat hepatic stellate cells: role of p38 MAPK. *Hepatology* **44**, 389–398. doi: 10.1002/hep.21254.
- Tomanovic, N. R., Boricic, I. V., Brasanac, D. C., Stojic, Z. M., Delic, D. S. and Brmbolic, B. J. (2009). Activated liver stellate cells in chronic viral C hepatitis: histopathological and immunohistochemical study. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* **18**, 163–167. doi: 5 [pii].
- Tsukada, S., Parsons, C. J. and Rippe, R. A. (2006). Mechanisms of liver fibrosis. *Clinica Chimica Acta* **364**, 33–60. doi: S0009-8981(05)00479-1 [pii] 10.1016/j.cca.2005.06.014.
- Vinas, O., Bataller, R., Sancho-Bru, P., Gines, P., Berenguer, C., Enrich, C., Nicolas, J. M., Ercilla, G., Gallart, T., Vives, J., Arroyo, V. and Rodes, J. (2003). Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* **38**, 919–929. doi: 10.1053/jhep.2003.50392 S0270913903006979 [pii].
- Zambrano-Villa, S., Rosales-Borjas, D., Carrero, J. C. and Ortiz-Ortiz, L. (2002). How protozoan parasites evade the immune response. *Trends in Parasitology* **18**, 272–278. doi: S1471492202022894 [pii].

Invariant NKT Cells Drive Hepatic Cytokinic Microenvironment Favoring Efficient Granuloma Formation and Early Control of *Leishmania donovani* Infection

Florence Robert-Gangneux^{1,2*}, Anne-Sophie Drogoul^{1,2}, Octavie Rostan², Claire Piquet-Pellorce², Jérôme Cayon³, Mariette Lisbonne², André Herbelin⁴, Hugues Gascan³, Claude Guiguen¹, Michel Samson², Jean-Pierre Gangneux^{1,2}

1 Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Laboratoire de Parasitologie, Rennes, France, **2** INSERM U1085, IRSET (Institut de Recherche en Santé Environnement Travail), Université Rennes 1, Rennes, France, **3** INSERM U564, Université d'Angers, Angers, France, **4** INSERM U935, Université Paris-Sud 11, Villejuif, France

Abstract

The development of inflammatory granulomas around infected Kupffer cells is necessary for hepatic parasite clearance during visceral leishmaniasis. Invariant NKT (iNKT) cells are predominant T cells in the mouse liver and can synthesize large quantities of IL-4 and IFN- γ , two cytokines involved in granuloma formation. This study analyzed the role of iNKT cells in the hepatic immune response during *Leishmania donovani* infection, using a murine model of wild-type (WT) and iNKT cell-deficient ($J\alpha 18^{-/-}$) C57BL/6 mice sacrificed 15, 30 or 60 days post-infection. We recorded hepatic parasite loads, cytokine expression, and analyzed granulomatous response by immunohistochemistry and hepatic immune cell infiltration by flow cytometry. Whereas WT animals rapidly controlled the infection and developed an inflammatory response associated with a massive influx of iNKT cells observed by flow cytometry, $J\alpha 18^{-/-}$ mice had significantly higher parasitic loads on all time points. This lack of control of parasite burden was associated with a delay in granuloma maturation (28.1% of large granulomas at day 60 versus 50.7% in WT). Cytokine transcriptome analysis showed that mRNA of 90/101 genes encoding chemokines, cytokines and their receptors, was underexpressed in $J\alpha 18^{-/-}$ mice. Detection of IL-4 and TNF- α by ELISA in liver extracts was also significantly lower in $J\alpha 18^{-/-}$ mice. Consistent with flow cytometry analysis, cytokinome profile in WT mice showed a bias of expression towards T cell-chemoattractant chemokines on D15, and displayed a switch towards expression of granulocytes and/or monocytes-chemoattractant chemokines on D60. In $J\alpha 18^{-/-}$ mice, the significantly lower expression of CXCL5, MIP-2 and CCL2 mRNA was correlated with a defect in myeloperoxidase positive-cell attraction observed by immunohistochemistry and with a lower granulocyte and monocyte infiltration in the liver, as shown by flow cytometry. These data indicate that iNKT cells play a role in early and sustained pro-inflammatory cytokine response warranting efficient organization of hepatic granulomas and parasite clearance.

Citation: Robert-Gangneux F, Drogoul A-S, Rostan O, Piquet-Pellorce C, Cayon J, et al. (2012) Invariant NKT Cells Drive Hepatic Cytokinic Microenvironment Favoring Efficient Granuloma Formation and Early Control of *Leishmania donovani* Infection. PLoS ONE 7(3): e33413. doi:10.1371/journal.pone.0033413

Editor: Laurent Rénia, Agency for Science, Technology and Research - Singapore Immunology Network, Singapore

Received: October 12, 2011; **Accepted:** February 8, 2012; **Published:** March 22, 2012

Copyright: © 2012 Robert-Gangneux et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by a grant from the Faculté de Médecine, Université Rennes 1 (COREC 2007) and by a grant from the CPER Bretagne - 360b 2007–2013/ European funding FEDER. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: florence.robert-gangneux@univ-rennes1.fr

Introduction

The liver is a target organ in a number of infectious diseases and its own particular way of both tolerating antigens and clearing blood borne pathogens determines the outcome of infection. During visceral leishmaniasis, the tissue microenvironment influences the control of infection, which is organ-specific [1]. In the liver of mice, experimentally infected with the protozoan parasite *Leishmania donovani*, acquisition of resistance is associated with a hepatic granulomatous response [2,3]. As in other infections with intracellular microorganisms, granulomas are presumed to represent tissue expression of a successful T cell-dependent immune response [2,4,5], leading to attraction of different cell types around infected Kupffer cells [6] and potentialization of their microbicidal activity involving reactive oxygen and nitrogen

intermediates [7]. It has been shown that IL-12, IL-4, IFN- γ and TNF- α play a key role in the control of parasite multiplication and liver granuloma formation [8,9,10,11,12,13]. Concerning cell effectors, blood monocyte influx is necessary for functional granuloma formation [14] and CD4 and CD8 T cell subsets are crucial for chemokine and cytokine synthesis supporting successful granuloma assembly and function [15,16,17]. Polymorphonuclear neutrophils (PMN) have also been shown to play a key role in the early control of hepatic parasite burden in mice [1,18].

More recently, the role of a peculiar subset of T cells, known as natural killer T (NKT) cells, was described in other models of chronic microbial infection involving granulomatous reactions, such as *Mycobacterium* infection [19,20,21]. This unique subset of T cells harbors both NK surface markers such as NK1.1 and $\alpha\beta$ T cell receptors capable of recognizing only lipid or glycolipid antigens,

either endogenous or exogenous (α -galactosylceramide (α -GalCer)) presented by the MHC class Ib molecule CD1d. Two subtypes of NKT cells can be distinguished: i) invariant NKT (iNKT, or type I) cells, which express a semi-invariant TCR consisting, in mice, of an invariant V α 14J α 18 chain paired with a limited repertoire of β chains mostly biased towards V β 8, V β 7 or V β 2; and ii) the less abundant type II NKT cells, with more diverse TCR expression. In mice, iNKT cells represent a major lymphocyte subtype in the liver [22,23]. The fact that these cells can be stimulated by glycolipid antigens makes them key candidate effector cells in the early immune response against *Leishmania*, whose main surface components are comprised of glycoinositol phospholipids and liposphoglycan (LPG) [24]. It was indeed recently shown that glycosphingophospholipid antigens of *L. donovani* can bind to CD1d [25], and that LPG can activate iNKT cells efficiently [26]. Once activated, iNKT cells rapidly produce large amounts of IFN- γ and IL-4 [27], and various other cytokines promoting either Th-1 or Th-2 immune responses, and modulate a wide range of immune phenomena, whether anti-tumoral, or anti-microbial, or even exacerbating inflammatory responses and tissue damage [28,29]. Indeed, a consistent body of evidence indicates that iNKT cells may have contrasting roles depending on the initial stimulus and subsequent modulation of other cell types [28,30,31,32,33]. The iNKT cell subset was shown to play a protective role in cutaneous leishmaniasis in a murine model infected with *L. major* [34,35], but data are scarce in the field of visceral leishmaniasis. Recently, it has been reported that *L. donovani*-induced expression of signal regulatory protein α on Kupffer cells enhances iNKT cell activation and IFN- γ production in the first day after infection, suggesting early interaction between the parasite and these cells [36]. Amprey *et al.* [26] previously pointed to a role of the whole NKT cell subset in anti-leishmanial protective immunity, using CD1d $^{-/-}$ BALB/c mice, whereas Stanley *et al.* found no improvement of the disease after α -GalCer activation of iNKT cells in mice with previously established or concomitant *L. donovani* infection [33].

In the present study, we investigated selectively the role of the iNKT cell subset, using iNKT cell-deficient C57BL/6 mice (J α 18 $^{-/-}$), by examining their potency to contribute or not to a favorable hepatic microenvironment warranting parasite clearance. Using a large scale approach of cytokine transcriptome, coupled to hepatic histology and flow cytometry analysis of liver homogenates, we aimed to finely dissect the role of iNKT cells in the early orientation of the hepatic immune response to *L. donovani* and their long-term effect on the histological response. Our results indicate that iNKT cells participate in the establishment of a sustained cytokine synthesis network, involved in cell attraction within liver granulomas and contribute to enhanced phagocytic functions and parasite clearance.

Results

iNKT cells contribute to early control of *L. donovani* burden in the liver

Comparison of the course of liver infection between wild-type (WT) and J α 18 $^{-/-}$ mice for 60 days after challenge revealed that the parasite burden was higher in iNKT cell-deficient mice at all time points. At D15 post-infection, the liver parasite burden was 4.5-fold higher in J α 18 $^{-/-}$ mice (37 ± 11.6 LDU) compared to WT mice (8.3 ± 0.9 LDU, $p < 0.05$) (Figure 1A). At D30 post-infection, the liver parasite burden was still 3-fold higher in J α 18 $^{-/-}$ mice (60.5 ± 22.7 LDU vs 18.1 ± 2.3 in WT mice, $p < 0.01$). At D60 post-infection, the hepatic parasite load decreased in both groups, reaching a residual level of 24.9 ± 7.2 LDU and 7.8 ± 2.9 , in J α 18 $^{-/-}$ mice and WT mice, respectively ($p < 0.05$).

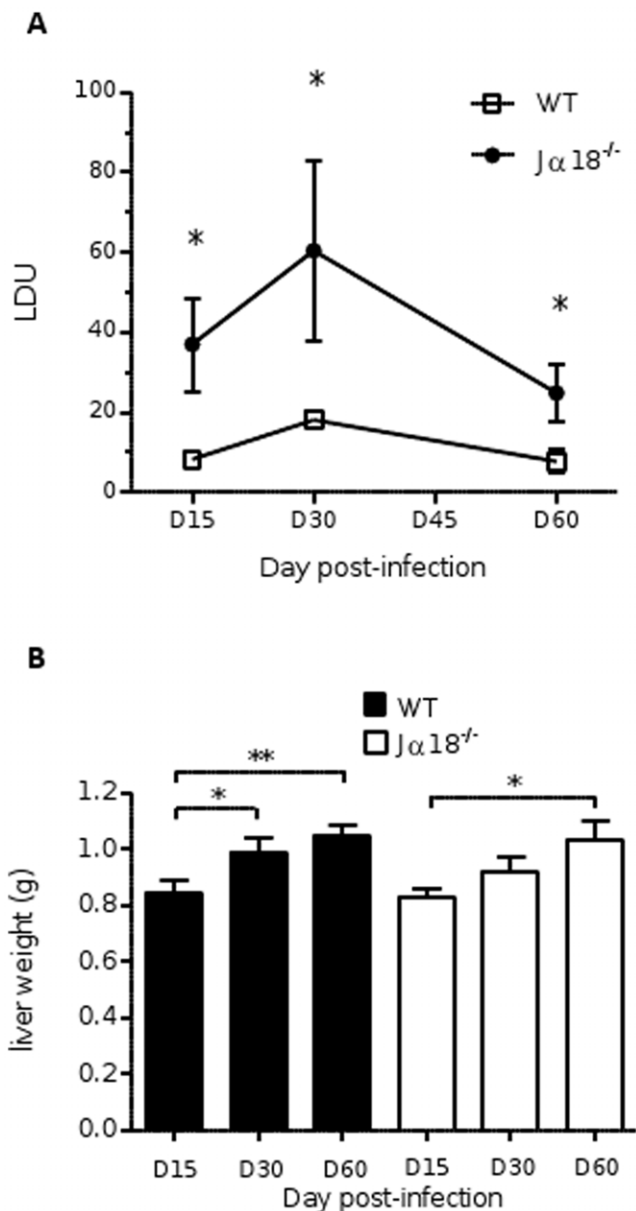


Figure 1. Hepatic parasite burden and liver weight in C57BL/6 WT and J α 18 $^{-/-}$ mice after infection with *Leishmania donovani*. (A) Liver parasite burden determined on day 15, day 30, and day 60 post-infection by microscopic counting of Giemsa-stained tissue sections, and expressed as LDU (number of parasites/1000 nuclei \times liver weight (mg)). (B) Change in liver weight over the course of infection in WT and J α 18 $^{-/-}$ mice. Pooled data from two independent experiments (8–10 mice per group). doi:10.1371/journal.pone.0033413.g001

Hepato-splenomegaly is a common feature of visceral leishmaniasis. An increase in liver weight was observed in both groups of infected mice, but the weight of the livers obtained from age-matched WT and J α 18 $^{-/-}$ mice did not differ significantly (Figure 1B).

J α 18 $^{-/-}$ mice display an impaired hepatic granulomatous response

In experimental visceral leishmaniasis, resistance to *L. donovani* depends on T cell-mediated formation of tissue granulomas, which

are assembled around a core of fused, parasitized resident macrophages. The liver histological response to *Leishmania* infection was quantified by microscopic examination of tissue sections stained with HES (Figure 2A–D). The total number of granulomas in 100 consecutive fields ($\times 400$) increased over time post-infection in both groups of mice ($p < 0.001$ in WT) but did not differ quantitatively between the two groups at each time point (Figure 2E). Granulomas were classified into two categories based on their size (i.e. < 25 or > 25 cells attracted to the foci) and maturation stage, and counted in 100 microscopic fields. The total number of small inflammatory foci was not significantly altered in $J\alpha 18^{-/-}$ mice (not shown). However, when we focused on large-sized (> 25 cells) or mature granulomas, that guarantee an effective immune response, it appeared that the mean percentage of large granulomas was almost 2-fold higher in WT compared to $J\alpha 18^{-/-}$ mice, with a significant difference on D60 ($50.7 \pm 4.8\%$ and $28.1 \pm 6\%$, respectively; $p < 0.05$) (Figure 2F). Similarly, mature well-organized granulomas were more frequently observed in WT mice ($54.3 \pm 3\%$ versus $36.1 \pm 2.6\%$ in $J\alpha 18^{-/-}$ mice at D60; $p < 0.01$) (Figure 2G). In WT mice only, the number of granulomas was negatively correlated with the liver parasite burden (Spearman $r = -0.53$, $p < 0.05$), suggesting that in WT mice, a stronger granulomatous tissue response was associated with more efficient parasite clearance, whereas in $J\alpha 18^{-/-}$ mice, impaired granuloma maturation could account for enhanced parasite multiplication.

iNKT cells are recruited early during hepatic *Leishmania* infection in wild-type mice

In the aim to understand the cellular factors contributing to a more efficient and earlier parasite control in WT mice, we undertook the quantification of immune cell populations in the liver of WT and $J\alpha 18^{-/-}$ mice 15 days after infection, using flow cytometry. The total amount of NKT cells was quantified using an anti-CD3-PB and an anti-NK1.1-PerCP-Cy-5.5, and showed that this cell subset was more abundant in WT mice than in $J\alpha 18^{-/-}$ mice ($13.57 \pm 2.6\%$ versus 7.92 ± 0.77 , $p < 0.05$), as expected in iNKT-cell deficient mice (Figure 3A). The proportion of iNKT cells among the NKT cell subset was estimated using a tetramer-CD1d/ α GalCer-PE antibody which showed that iNKT cells account for 75–85% of the NKT cell subset in WT animals, whether infected or not (Figure 3B). Whereas NKT cells (CD3⁺/NK1.1⁺ subset) were massively recruited in the liver of WT animals with a nearly 3-fold increase (0.22 ± 0.02 to $0.62 \pm 0.09 \times 10^6$ cells per liver, $p < 0.05$) 15 days after infection, this cell subset raised only mildly in $J\alpha 18^{-/-}$ mice (0.16 ± 0.01 to $0.27 \pm 0.003 \times 10^6$ cells per liver). Instead, the lack of iNKT cells in $J\alpha 18^{-/-}$ mice was mainly compensated by T lymphocytes (CD3⁺/NK1.1⁻ subset) which increased from 0.46 ± 0.02 to $1.14 \pm 0.06 \times 10^6$ cells per liver, $p < 0.05$ and, to a lesser extent, by NK cells (CD3⁻/NK1.1⁺ subset) which increased from 0.29 ± 0.01 to $0.48 \pm 0.03 \times 10^6$ cells in $J\alpha 18^{-/-}$ mice ($p < 0.05$) (Figure 3A). The major part of NKT cells in the liver of WT animals were CD4⁺ ($p < 0.05$). Double negative (CD4⁻/CD8⁻) NKT cells was enhanced after infection in both groups of mice ($p < 0.05$, Figure 3C). T cell (NK1.1⁻/CD3⁺) infiltration in the liver of $J\alpha 18^{-/-}$ mice was a mix of CD8⁺ and CD4⁺ T cells ($p < 0.05$ for both subsets) (Figure 3D). In the aim to confirm the predominant role of iNKT cells in the hepatic response to infection, a fine characterization of the T cell subsets was undertaken in WT mice, using an 8-colour antibody panel (Figure 4). It confirmed that iNKT cells (TCR β ⁺/CD1d-TT⁺) account for about 80% of CD3⁺/NK1.1⁺ cells. Besides, nearly 7% of TCR β ⁺/CD1d-TT⁺ are NK1.1⁻, suggesting that iNKT cell subset is somewhat underestimated when estimating their amount by gating on CD3⁺/NK1.1⁺ cells (Figure 4A). Furthermore, using

an anti- $\gamma\delta$ TCR antibody, we could show that the CD3⁺/NK1.1⁺ cell subset is only mildly contaminated by $\gamma\delta$ T cells, since only 2–3% of $\gamma\delta$ TCR⁺/CD3⁺ were found in this gate (Figure 4B). The percentage of these minor subsets, as well as the non invariant NKT cell subset, did not vary after infection. As already shown on the NK1.1⁺/CD3⁺ cell subset, iNKT cells were mostly CD4⁺ (Figure 4C), and the proportion of CD4⁺ iNKT, and CD4⁻/CD8⁻ iNKT subsets remained nearly stable after infection. The dramatic increase in the total amount of CD4⁺ iNKT cells (Figure 3) is explained by the high proportion of these cells (about 80% of all iNKT cells), but as the percentage of all subsets did not vary (Figure 4B), it can be assumed that minor NKT cell subsets were recruited in similar proportion.

Myeloid cells showed slight differences between both genetic backgrounds, but at this stage of infection they represented less than 10% of all hepatic immune cells, and infection did not significantly modify their amount at this time point (data not shown). Taken together, flow cytometry analysis showed that CD4⁺ iNKT cells are strongly attracted in the liver of WT mice, and that the lack of this cell subset is quantitatively compensated in $J\alpha 18^{-/-}$ mice by T lymphocytes and NK cells.

$J\alpha 18^{-/-}$ mice display an impaired transcriptome of soluble immune effectors

In an attempt to characterize the soluble factors involved in the differential cell recruitment observed in the liver of both groups of mice, we used a high-throughput qPCR approach for quantification of mRNA induction of a large panel of cytokines and chemokines genes (Table S1). Overall, compared to housekeeping genes, high expression levels of genes encoding a number of chemokines and their receptors were observed, whatever the group of mice, probably related to the C57BL/6 background (Figure S1). However, when computing a ratio of relative gene induction between WT and $J\alpha 18^{-/-}$ mice, it revealed that $J\alpha 18^{-/-}$ mice had an overall impaired induction of most cytokines as a result of their individual background (day 0) as well as after infection. Indeed, in Figure 5 most data points (90/101) are located below the curve, indicating a preferential induction in WT animals at a basal level (Figure 5A), as well as after infection with *L. donovani* at any time point (Figure 5B–D). Of these 90 genes, 33 were induced at an at least 2-fold higher rate in WT than in $J\alpha 18^{-/-}$ mice (Figure S2). This stronger gene induction in WT mice probably reflects the deployment of immune effectors participating to anti-parasite defense.

Interestingly, the most significantly under-expressed genes on D15 in $J\alpha 18^{-/-}$ mice encode chemokines or receptors for chemokines involved in activated T cell attraction, i.e. CCL19, CCL27, CXCL16, CCR9, as well as the pan-chemoattractant chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 (Figure S2). Other chemokines were highly induced in both backgrounds (though to a lesser extent in $J\alpha 18^{-/-}$), such as CXCL9, CXCL10, CCL25 and CCL9 and the receptors CCR2, CCR5, CXCR3, CX3CR1 and CXCR6, that could explain the attraction of T cells and NK cells observed by flow cytometry analysis in the liver of $J\alpha 18^{-/-}$ mice (Figure 3). Individual analysis of mRNA induction showed a significant increase of CCL19 and CXCL16 in WT mice at D15 ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) (Figure 5E–F), as well as a higher basal expression level of chemokines capable of attracting iNKT cells, i.e. CXCL9 (3.8-fold), CXCL10 (2.2-fold) and CCL2 (2-fold) (Figure S1), that could explain the early recruitment of iNKT cells observed by flow cytometry at D15. In agreement with this hypothesis, flow cytometry analysis on D15 showed an increase of CXCR3⁺ cells in WT mice, with a predominant recruitment of CXCR3⁺ iNKT cells after infection, this

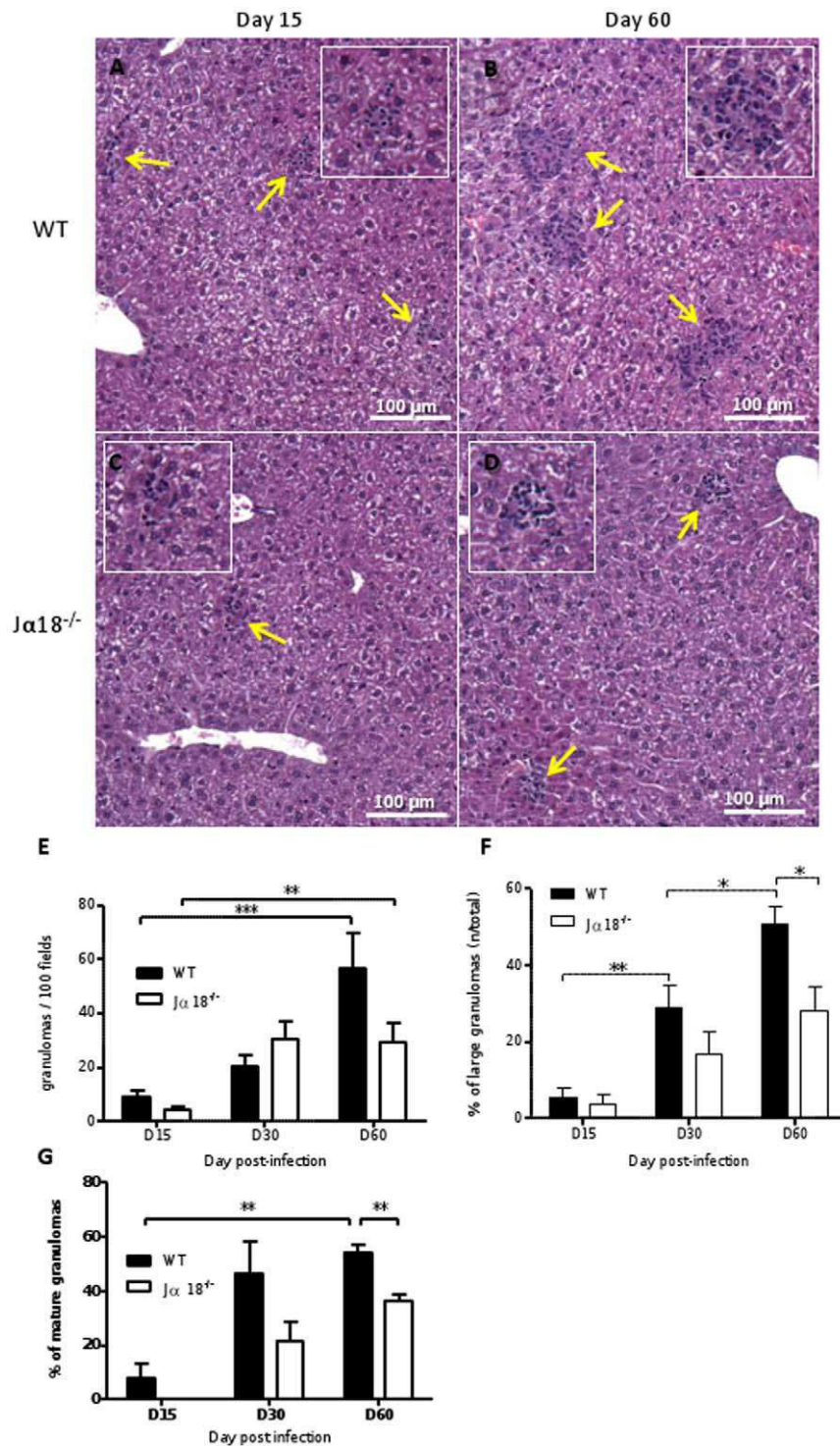


Figure 2. *Jα18^{-/-}* mice display a qualitatively and quantitatively impaired hepatic granulomatous response after infection with *L. donovani*. Quantification of granuloma formation in the liver of *L. donovani* infected WT and *Jα18^{-/-}* mice by microscopic examination of tissue sections stained with HES, at D15, D30 and D60 post-infection. Representative granuloma foci from WT mice at D15 (A) and D60 (B), and from *Jα18^{-/-}* mice at D15 (C) and D60 (D) ($\times 100$ magnification). (E) Total number of granulomas in 100 microscopic fields ($\times 400$) at various time points. (F) Relative percentage of large granulomas (>25 cells) detected in each group of mice. (G) Relative percentage of mature granulomas detected in each group of mice. doi:10.1371/journal.pone.0033413.g002

lymphocyte cell subset being obviously the main CXCR3⁺ cell subset in the liver with about 90% of positive cells (Figure S3). Together with iNKT cells though to a far lesser extent, CXCR3-

positive T cells and NK cells were also recruited in WT mice (Figure S3), and could partly explain the T and NK cell attraction observed in *Jα18^{-/-}* mice.

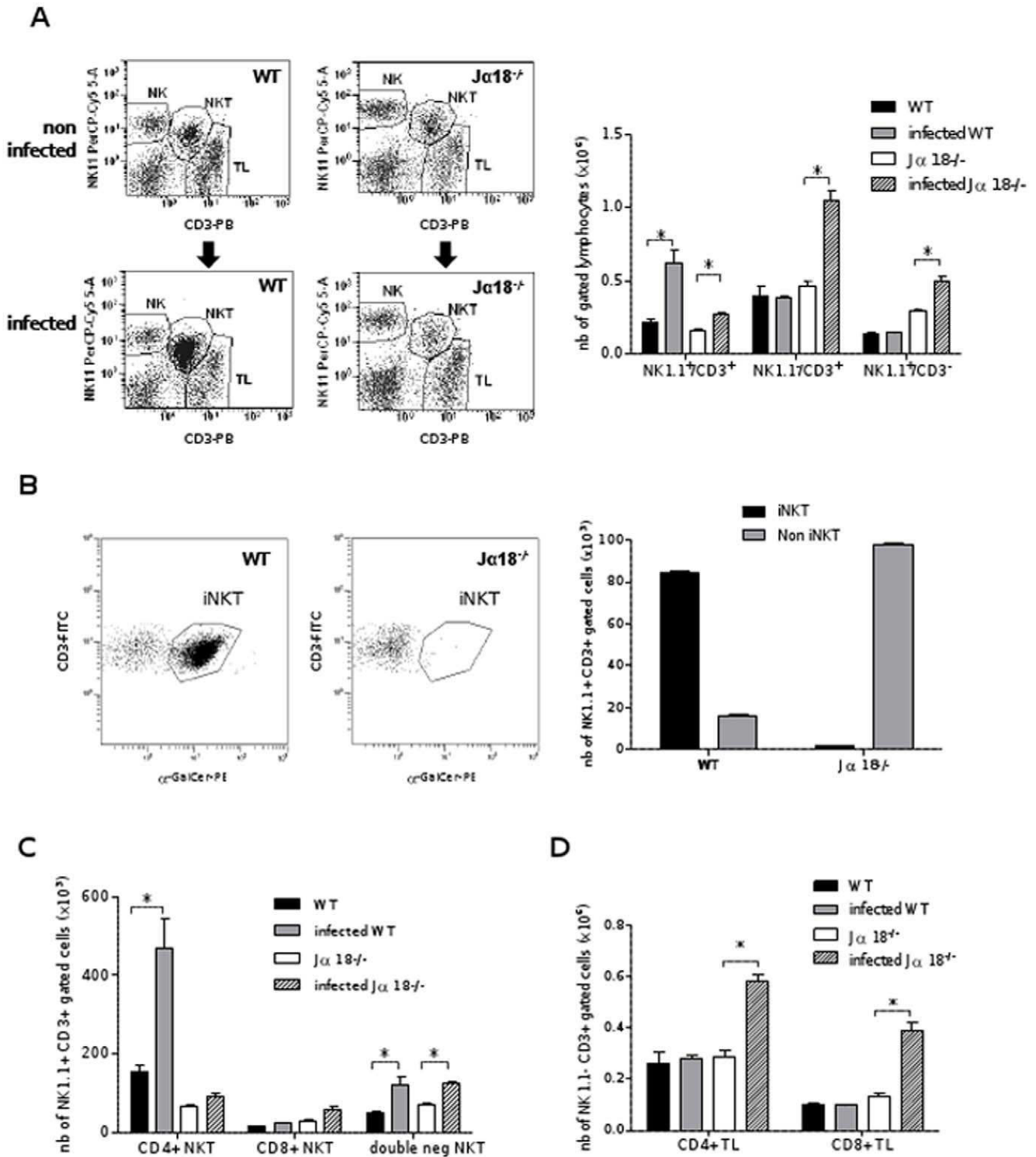


Figure 3. iNKT cells are recruited in the liver of WT mice on D15 after infection with *L. donovani*. Hepatic cell infiltration of C57BL/6 WT and *Jα18^{-/-}* mice was analyzed by flow cytometry 15 days after infection with *L. donovani*, using an anti-Gr1-FITC, anti-CD11b-PE-Cy7, anti-CD11c-APC, anti-CD4-PB, anti-CD3-FITC, anti-NK1.1-PerCP-Cy-5.5, and anti-CD8-APC-Cy7, and αGalCer-tetramer-PE. (A) Absolute quantification of hepatic NK (NK1.1⁺/CD3⁻), NKT (NK1.1⁺/CD3⁺), and TL (NK1.1⁻/CD3⁺) cell subsets in lymphocyte gated cells. (B) proportion of iNKT and non iNKT cell subsets in each group of mice in CD3⁺/NK1.1⁺ gated cells. (C) Absolute quantification of CD4⁺ and CD8⁺ cell subsets in gated NKT cells (CD3⁺/NK1.1⁺). (D) Absolute quantification of CD4⁺ and CD8⁺ cells in gated T lymphocytes (CD3⁺/NK1.1⁻). 10⁶ cells of liver homogenates were labeled and data were analyzed on 50,000 events. Data are the mean ± SEM of four mice per group. doi:10.1371/journal.pone.0033413.g003

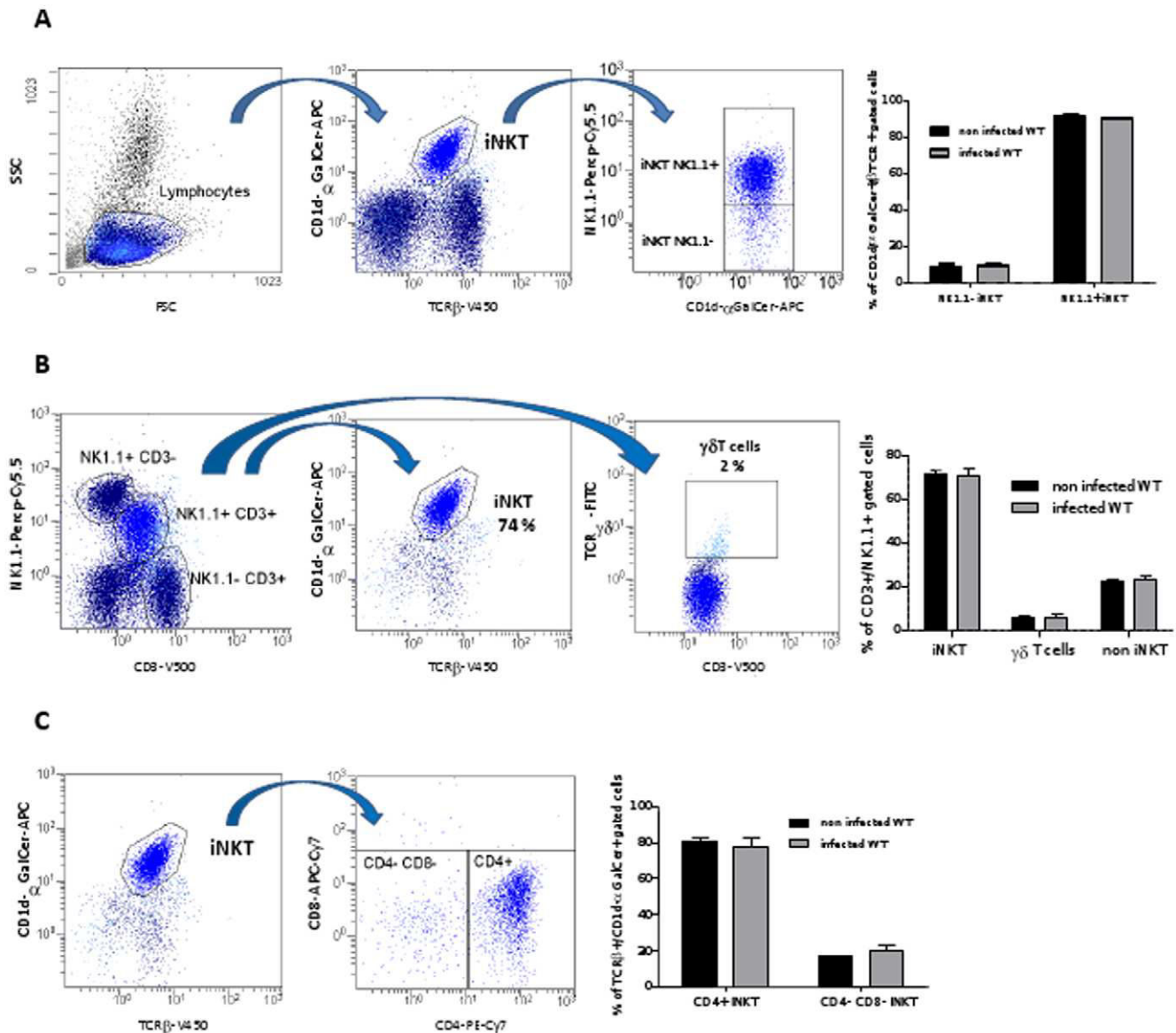


Figure 4. Phenotypic characterization of the iNKT cell infiltrate in the liver of WT mice on day 15 after infection with *L. donovani*. Hepatic cell infiltration of C57BL/6 WT was analyzed by flow cytometry using anti-CD3-V500, anti-NK1.1-PerCP-Cy-5.5, anti-TCR β -V450, anti TCR $\gamma\delta$ -FITC, and α GalCer/CD1d tetramer-APC, anti-CD4-PE-Cy7, anti-CD8-APC-Cy7. (A) Gating strategy allowing to estimate the low percentage of NK1.1- and NK1.1+ cells among TCR β +/ α GalCer/CD1d tetramer+ cells. (B) Gating strategy and evaluation of the percentage of $\gamma\delta$ -T cells and non iNKT cells among CD3+/NK1.1+. (C) Percentage of CD4+ and CD4-/CD8- cells among iNKT cells (TCR β +/ α GalCer/CD1d tetramer+). This panel is representative of three independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0033413.g004

Pro-inflammatory cytokines are correlated with granuloma formation and are less expressed in *J α 18^{-/-}* mice

As efficient granuloma formation is under the control of key pro-inflammatory cytokines, such as IFN- γ , IL-12, and TNF- α [10,12,13], we focused on individual analysis of mRNA expression of these genes. All three cytokines increased significantly during the course of the infection in WT mice, reaching a maximal expression level on D60 ($p < 0.05$, $p < 0.001$, and $p < 0.001$, respectively). In *J α 18^{-/-}* mice, IFN- γ and TNF- α , but not IL-12, were also induced at significant levels on D60 compared to D15 ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively, Figure 6A–C). Although the mean induction rate was higher for all three cytokines in WT mice on D60, this difference did not reach statistical significance when compared to *J α 18^{-/-}* mice. Overall, the number of granulomas was highly correlated with

mRNA induction of IFN- γ ($r = 0.82$, $p < 0.0001$) and TNF- α ($r = 0.83$, $p < 0.0001$). In addition, TNF- α was highly correlated with the number of large granulomas ($r = 0.85$, $p < 0.0001$) (Table 1).

In liver extracts, TNF- α was detected by ELISA at higher concentrations in WT mice at all time points ($p < 0.05$ on D15 and D30, and $p < 0.01$ on D60), but the level of hepatic IFN- γ did not differ significantly between the two groups of mice, although it was higher at all time points in WT (Figure 6D–E).

IL-4 detection is higher in the liver of wild-type mice and its induction is reduced in *J α 18^{-/-}* mice

A striking difference in the expression and induction of IL-4 was observed between the two groups of mice. IL-4 induction increased over time in WT mice only ($p < 0.05$) (Figure 6F),

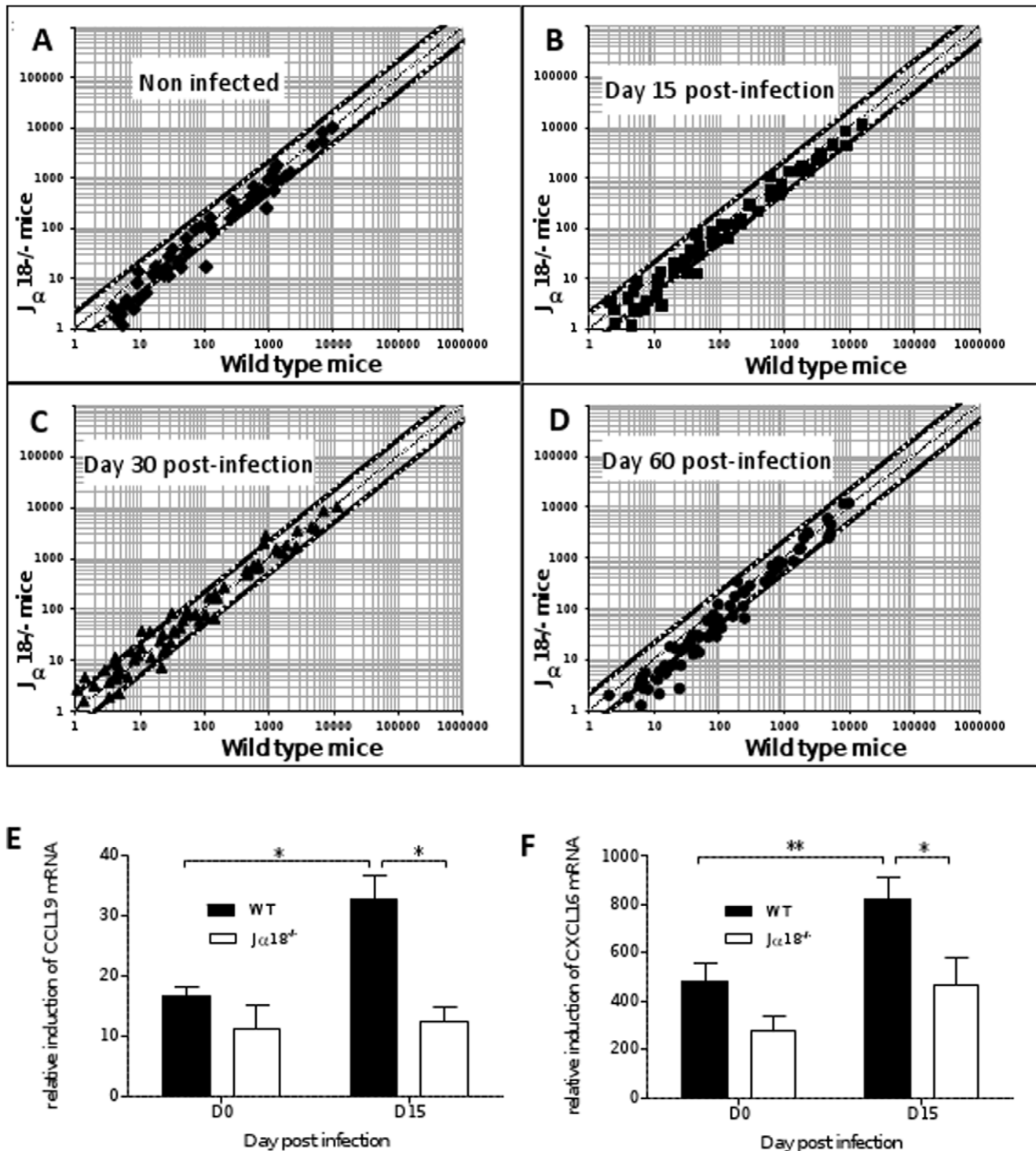


Figure 5. Hepatic transcriptome of cytokines and receptors is altered in $J\alpha 18^{-/-}$ mice. Graphs represent the ratio of genes induction in $J\alpha 18^{-/-}$ mice compared to WT, after normalization on three housekeeping genes, at day 0 (non infected) (A), day 15 (B), day 30 (C) or day 60 (D) after infection, with the central 45° angle line indicating a same level of induction in both backgrounds of mice and the two border lines corresponding to a 2-fold induction in one or the other group of mice. Data are the mean \pm SEM of triplicate samples pooled from 8 to 10 mice from two independent experiments. Quantification of mRNA of the T cell-chemoattractant chemokines CCL19 (E) and CXCL16 (F) in liver extracts of naïve WT and $J\alpha 18^{-/-}$ mice, 15 days after infection. Data represent mRNA induction normalized on three housekeeping genes, and are the mean \pm SEM for each group of mice (8–10 mice per group from two independent experiments). doi:10.1371/journal.pone.0033413.g005

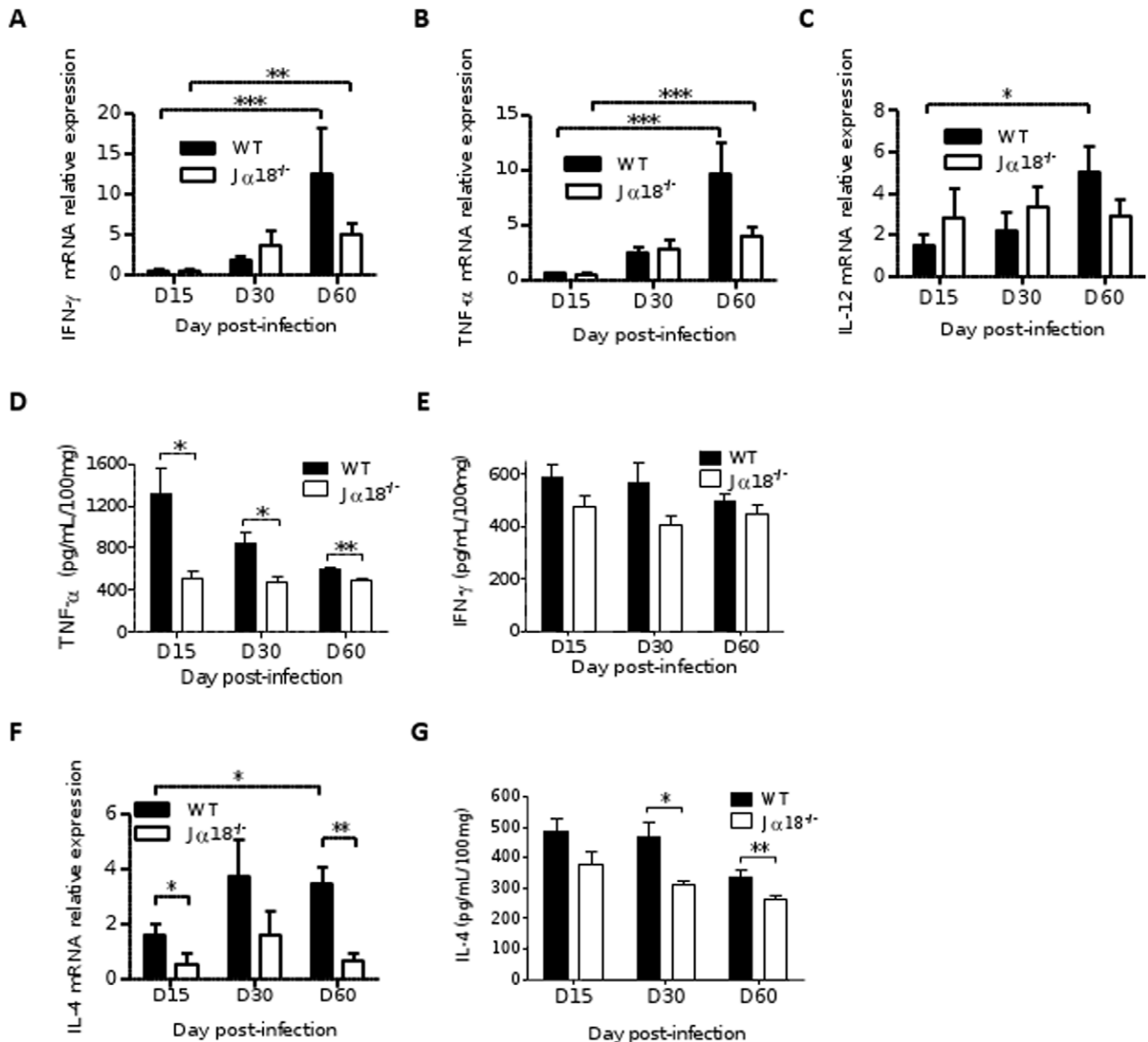


Figure 6. Kinetics of hepatic mRNA induction and expression of key cytokines in WT and $J\alpha 18^{-/-}$ mice infected with *L. donovani*. Quantification of mRNA induction of IFN- γ (A), TNF- α (B), and IL-12 (C). Quantitative PCR was performed in liver extracts at various time points after infection and normalized by comparison to 18S mRNA. (D) Detection of TNF- α by ELISA in liver extracts. (E) Quantification of mRNA induction of IL-4. (F) Detection of IL-4 by ELISA in liver extracts. Data are the mean \pm SEM for each group of mice (8–10 mice per group from two independent experiments). doi:10.1371/journal.pone.0033413.g006

whereas it was usually absent in $J\alpha 18^{-/-}$ mice, which displayed induction indices at lower levels than in control non-infected mice. IL-4 mRNA induction was highly correlated to IL-12 induction in WT ($r = 0.72$, $p < 0.0001$). The detection of IL-4 in the liver tissue by ELISA was also significantly higher in WT mice compared to $J\alpha 18^{-/-}$ mice on D30 ($p < 0.05$) and D60 post-infection ($p < 0.01$) (Figure 6G).

Chemokine mRNA expression is sustained and raises over time in WT mice

As chemokines are powerful chemoattractants for several cell types known to contribute to granuloma assembly, the transcriptional approach used at early time points (Table S1) was also

applied on late time points. It appeared that expression of most chemokines was sustained over time in WT animals and peaked at D60. By contrast, 11/13 chemokines and 6/7 receptors for chemokines were under-expressed in $J\alpha 18^{-/-}$ mice at D60 compared to WT mice, as shown in Figure S2, which displays the most significant differences of gene expression (i.e. differences in mRNA induction of at least 2-fold between the two groups of mice).

Quantification of gene expression of some of the most expressed chemokines (compared to housekeeping genes) was made after individual analysis of cDNA from all mice. Whereas the T cell and NK-chemoattractant chemokines CXCL9 and CXCL10 were strongly induced over time in both groups of mice, the induction of

Table 1. Spearman's correlation rank between variables.

	Granulomas	Large granulomas	MPO ⁺ cells /100 fields	TNF- α mRNA	MPO mRNA	iNOS mRNA
IFN- γ mRNA	0.82****	-	NS	-	-	-
TNF- α mRNA	0.83****	0.85****	0.71****	-	-	-
CCL2 mRNA	0.84****	0.82****	0.74****	-	-	0.90****
MIP-2 mRNA	0.67****	0.63****	0.71****	-	-	0.85****
iNOS mRNA	0.78****	-	-	-	-	-
MPO ⁺ cells	0.85****	0.84****	-	0.71****	0.68****	-
IL-4 mRNA	0.61****	-	-	-	-	-
MPO mRNA	0.65****	-	0.68****	-	-	-
IL-10 mRNA	0.52****	-	-	-	-	-
KC mRNA	0.52****	-	0.38**	-	-	-
KC ELISA	0.47***	-	0.38**	-	-	0.74****
IL-12 mRNA	0.4** ^a	-	-	-	-	-
Liver weight	0.47***	0.53****	-	-	-	-
LDU	NS ^b	NS	-0.32* ^c	-	-0.49*** ^d	NS ^e

NS, not significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

^aNS in *J α 18^{-/-}* individual analysis.

^b-0.53 ($p < 0.05$) in WT, NS in *J α 18^{-/-}* mice.

^c-0.52 ($p < 0.01$) in WT, NS in *J α 18^{-/-}* mic.

^d-0.74 ($p < 0.0001$) in WT.

^e-0.41 ($p < 0.05$) in WT.

doi:10.1371/journal.pone.0033413.t001

their receptor CXCR3 was higher in WT mice ($p < 0.05$, Figure7A), which is consistent with the data obtained by flow cytometry analysis. The neutrophil-chemoattractant chemokines MIP-2/CXCL2 and CXCL5 [37], as well as their receptor CXCR2 were strongly induced on D60 in WT mice only (Figure7B). Similarly, CCL2/MCP-1 and its receptor CCR2 were also higher on D60 in WT mice than in *J α 18^{-/-}* ($p < 0.05$) (Figure7C). There was a strong correlation between mRNA induction of CCL2 and MIP-2 and the number of granulomas ($r = 0.84$, and $r = 0.67$, respectively; $p < 0.0001$). Similarly, CXCL1/KC induction was also correlated, to a lesser degree, with the number of granulomas ($r = 0.52$, $p < 0.0001$) (Table1).

Myeloid cell infiltration is strongly reduced in the liver of infected *J α 18^{-/-}* mice

Since striking differences in expression were observed for chemokines attractant for neutrophils (CXCL1, MIP-2/CXCL2, CXCL5) or monocytes (CCL2/MCP-1) on late time points [37,38], we quantified these cells within granuloma by immunohistochemistry using an anti-myeloperoxidase (MPO) antibody which mainly stains PMN cells (Figure8A). Not surprisingly, we obtained contrasting data between WT and *J α 18^{-/-}* mice, with higher proportion of MPO-positive cells within the granulomas of WT mice, whatever the size of granulomas ($p < 0.01$) (Figure8B).

Consistent with chemokines expression data, the absolute number of intra-granuloma MPO-positive cells counted in 100 consecutive microscopic fields ($\times 400$) increased during the 60-day follow-up ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, for WT and *J α 18^{-/-}* mice, respectively) (Figure8C). Moreover, this cell attraction was correlated with the total number of granulomas ($r = 0.85$; $p < 0.0001$) (Table1). MPO-positive cell number was about 2-fold higher in WT mice compared to *J α 18^{-/-}* mice on D60 (144 ± 23 and 70 ± 20 , respectively; $p < 0.05$) and 5-fold higher on D15 (28 ± 9 vs 5 ± 1 , respectively; $p < 0.05$) (Figure8C).

The level of MPO-positive cell infiltration was highly correlated with mRNA induction of MIP-2 and CCL2 chemokines (Spearman $r = 0.71$ and $r = 0.74$, respectively; $p < 0.0001$), and to a lesser extent to mRNA induction of CXCL1/KC (Spearman $r = 0.38$; $p < 0.01$) (Table1). When performing the statistical analysis on each individual group of mice, induction of CXCL1/KC was correlated with the number of MPO-positive cells in WT mice ($r = 0.58$; $p < 0.01$) but not in *J α 18^{-/-}* mice.

Immunohistological findings were confirmed by flow cytometry analysis of hepatic immune cells on D60, which clearly demonstrated that PMN cells (GR-1^{hi}/CD11b⁺ panel) were present in larger amounts in WT than in *J α 18^{-/-}* mice ($180 \pm 25 \times 10^3$ versus $54 \pm 16 \times 10^3$ cells; $p < 0.05$) representing more than half of the myeloid cell population at that time (Figure 87D–E). Macrophage cells (GR-1^{int}/CD11b⁺ subset, which matched with F4/80⁺ cells) accounted for about 18% of myeloid cells and did not rise significantly (Figure8D–E). An increase in monocyte cell counts (GR-1^{low}/CD11b⁺ subset) was also observed on D60 ($p < 0.01$) in WT mice, reaching about 23% of the amount of myeloid cells (Figure8D). By contrast, no significant change in the amount of myeloid cell subsets was noted in *J α 18^{-/-}* mice, which is consistent with the defect in chemokines observed in these mice.

Concomitant analysis of lymphoid cell subsets revealed also a sustained attraction of all three subsets, i.e. NKT cells, T lymphocytes and NK cells ($p < 0.05$) from D15 to D60 in WT, with a large predominance of T lymphocytes, whether CD4⁺ or CD8⁺ (Figure9A–B). These results are indeed in accordance with a progressive maturation of granulomas.

Phagocytic enzymatic effectors are reduced in *J α 18^{-/-}* mice

The final step of granuloma maturation in the liver is the potentiation of phagocytic cells to eliminate the parasite through ROI and RNI intermediates. The induction of inducible nitric

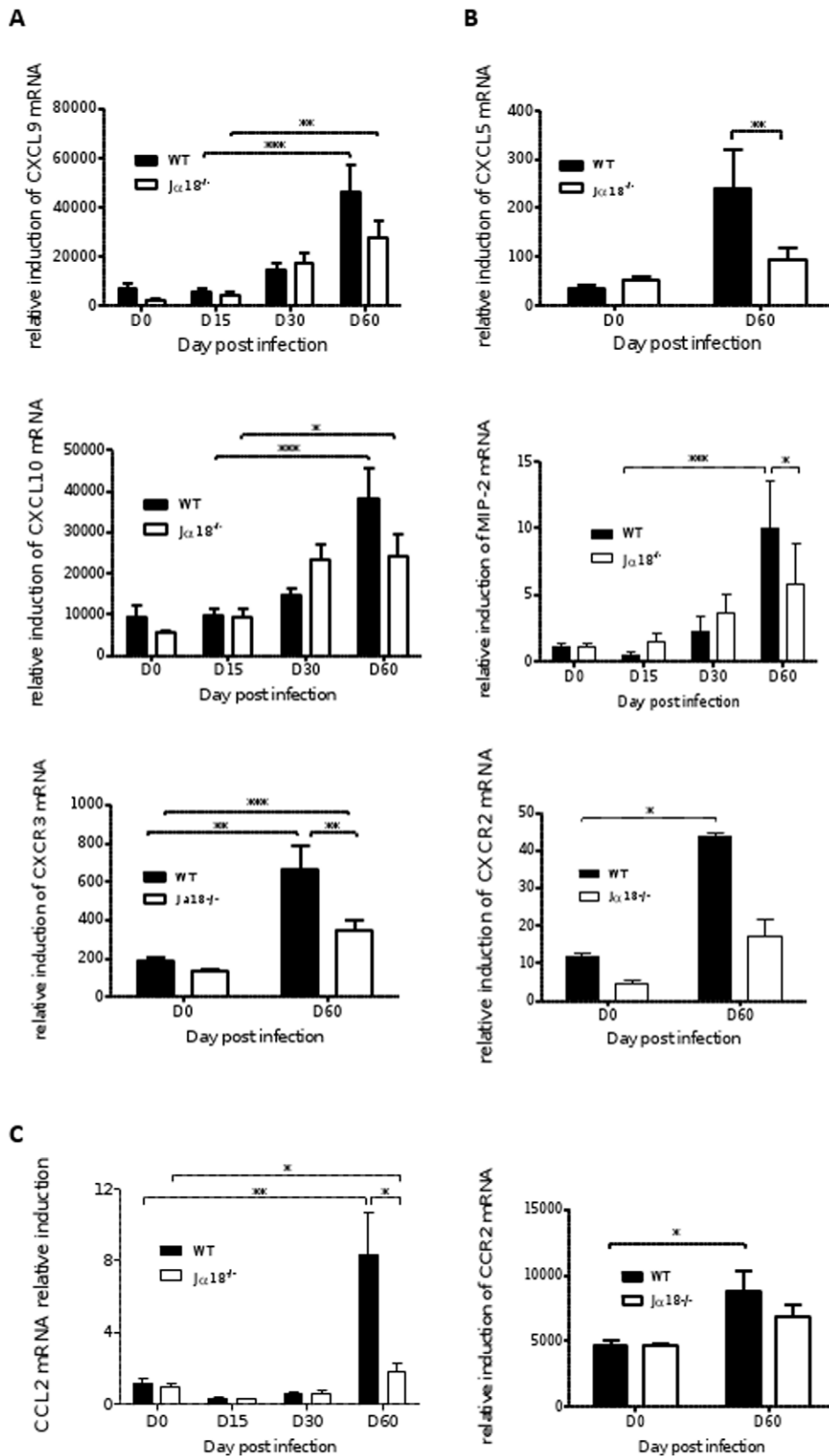


Figure 7. Kinetics of selected chemokine and related chemokine receptors expression in liver extracts from WT and *Jα18^{-/-}* mice. mRNA expression of selected chemokines and their receptors was quantified by qPCR in liver extracts at various time points after infection. Quantification of mRNA for the T and NK cell-chemoattractant chemokines CXCL9, CXCL10 and their receptor CXCR3 (A), quantification of the PMN-chemoattractant chemokines MIP-2 and CXCL5 and their receptor CXCR2 (B) and of CCL2 and its receptor CCR2 (C). Data are the mean \pm SEM of 8 to 10 mice per group from two independent experiments and normalized on the expression of three housekeeping genes. doi:10.1371/journal.pone.0033413.g007

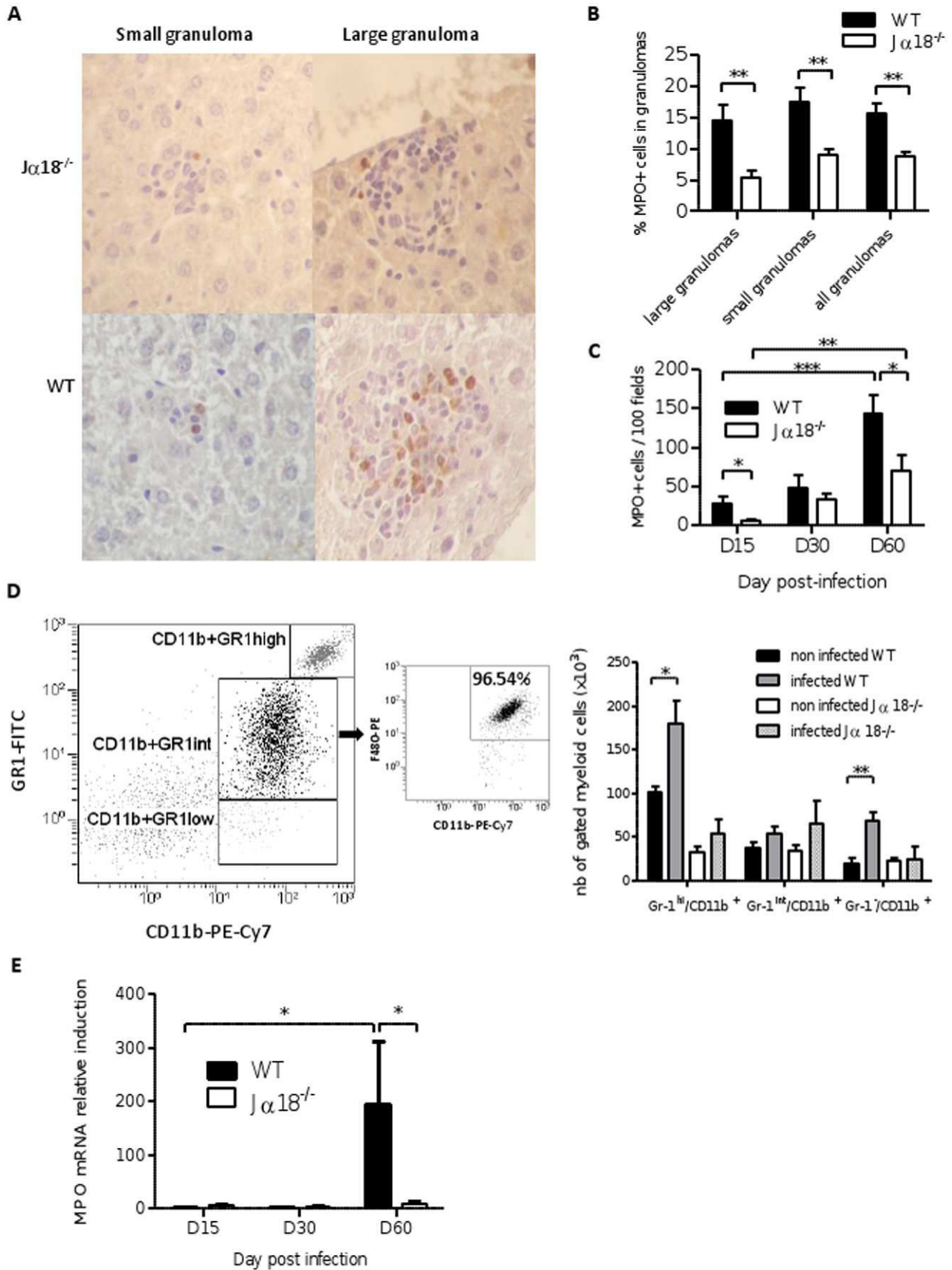


Figure 8. Quantification of myeloid cells in the liver of wild-type and $J\alpha 18^{-/-}$ mice. (A) Representative slides of small (Day 15) and large (Day 60) hepatic granulomas labeled by immunohistochemistry using an anti-MPO antibody, in WT and $J\alpha 18^{-/-}$ mice. (B) Proportion of MPO⁺ cells in granulomas, according to the size of the foci (i.e. small granulomas of <25 cells, and large granulomas >25 cells). (C) Quantification of the absolute number of MPO⁺ cells in granulomas in 100 consecutive microscopic fields ($\times 400$) at various time points. Data are the mean \pm SEM for each group of mice (8–10 mice per group from two independent experiments). (D) Absolute quantification of myeloid cell infiltration in the liver of C57BL/6 WT and $J\alpha 18^{-/-}$ by flow cytometry on D60 after infection with *L. donovani*, using an anti-Gr1-FITC, anti-CD11b-PE-Cy7, and anti-F4/80-PE. Analysis was done on live cells after excluding lymphocyte cells. 10^6 cells of liver homogenates were labeled and data were analyzed on 50,000 events. Data are the mean \pm SEM of four mice per group. (E) Quantification of MPO mRNA expression in the liver of WT and $J\alpha 18^{-/-}$ mice. Data are the mean \pm SEM for each group of mice (8–10 mice per group from two independent experiments).
doi:10.1371/journal.pone.0033413.g008

oxide synthase (iNOS) and of MPO genes was measured in liver extracts. MPO induction increased throughout the infection in WT mice ($p < 0.05$ between D15 and D60) but not in $J\alpha 18^{-/-}$ mice (Figure 8F). The induction of MPO mRNA was correlated with MPO-positive cell infiltration and with the number of granulomas (Spearman $r = 0.68$ and $r = 0.65$, respectively, $p < 0.0001$), and

inversely correlated with hepatic parasite burden (Spearman $r = -0.49$, $p < 0.001$), this correlation being stronger in WT (Table 1). The induction of iNOS was also correlated with the granuloma tissue response (Spearman $r = 0.78$, $p < 0.0001$), and was higher on D60 compared to D15 post-infection ($p < 0.01$). Like other markers, iNOS induction was highly correlated with MIP-2 and CCL2 induction ($r = 0.85$ and 0.90 , respectively; $p < 0.0001$), as well as with CXCL1/KC ($r = 0.74$; $p < 0.0001$). Moreover, iNOS induction was correlated to parasite clearance in WT mice only (Table 1).

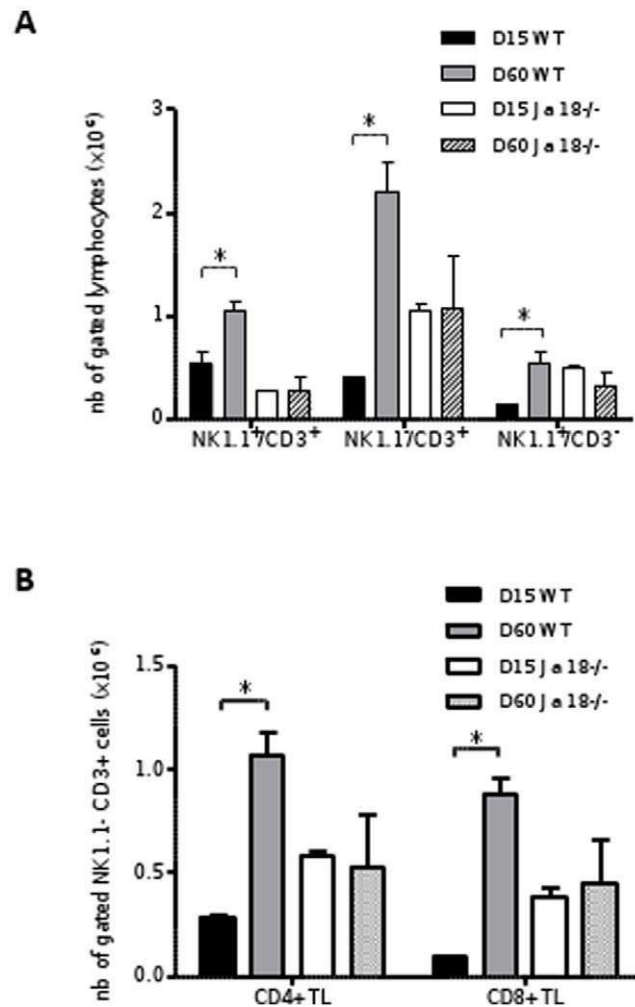


Figure 9. Hepatic lymphoid cell infiltration in wild-type and $J\alpha 18^{-/-}$ mice at day 60 of infection. Quantification of lymphoid cells in the liver of C57BL/6 WT and $J\alpha 18^{-/-}$ mice after infection with *L. donovani*, using anti-CD4-PE, anti-CD3-Pacific Blue, anti-NK1.1-PerCP-Cy-5.5, and anti-CD8-APC-Cy7. 10^6 cells of liver homogenates were labeled and data were analyzed on 50,000 events. Absolute quantification of hepatic NK (NK1.1⁺/CD3⁺), NKT (NK1.1⁺/CD3⁺), and TL (NK1.1⁻/CD3⁺) cell subsets (A), absolute quantification of CD4⁺ and CD8⁺ cell subsets in gated TL (B). Data are the mean \pm SEM of four mice per group.
doi:10.1371/journal.pone.0033413.g009

Discussion

NKT cells together with dendritic cells are pivotal cell subsets involved in the link between innate and adaptive immune response against microorganisms. A role for NKT cells in the defense against *Leishmania donovani* infection was pointed previously by Amprey *et al.* [26], who showed that liver granuloma formation was impaired and parasite burdens were higher in the absence of NKT cells, using a model of BALB/c CD1d^{-/-} mice. However the genetic background is known to influence the capacity of mice to control *Leishmania* infection [39], and BALB/c mice which display a biased Th2 immune response, express a different susceptibility profile to infection. Moreover, among NKT cells, the precise role of the iNKT cell subset, the main T cell subset in the mouse liver, needed to be confirmed, since contradictory data were reported by Stanley *et al.* [33]. In the aim to display robust conclusions about the requirement of these cells for parasite control in the liver, we used a model of iNKT cell-deficient mice on a C57BL/6 genetic background, a more resistant genetic background due to its capacity to produce more IFN- γ than BALB/c mice [40]. Hence, enhanced susceptibility in the absence of iNKT cells would strongly suggest that these cells actively participate to mouse resistance. We showed effectively that WT mice drove efficient parasite clearance after infection. Conversely, parasite proliferation was significantly higher in the liver of $J\alpha 18^{-/-}$ mice at all time points post-infection. Our model of intraperitoneal inoculation of promastigotes yielded lower parasite burdens in the liver than those reported in other studies using amastigotes by intravenous route, but we speculate that the intraperitoneal route is closer from the natural inoculation of promastigotes by sand flies. In their study, Stanley *et al.* [33] also found higher parasite loads in the liver of $J\alpha 18^{-/-}$ mice on late time points (D56) after infection with *L. donovani*. However, the authors concluded to a minor physiological role in the protection during murine *Leishmania* infection, since cell stimulation by injection of α -GalCer prior or concomitantly to mouse infection did not concur to improve disease resolution, but even led to enhanced parasite burdens [33]. In our opinion, this observation, under non physiological conditions, should warn on the possible risk of a paradoxical effect during NKT cell activation, but cannot allow to draw definitive conclusions about the role of iNKT cells during the natural course of infection. In other models, activation of iNKT cells with α -GalCer led to contradictory results, suggesting that

over-stimulation does not reflect the fine regulation of these cells *in vivo* in the context of physiological activation, since it does not reproduce exactly the microenvironment associated with antigen presentation. For example, in the work of Osman *et al.* [41] activation of hepatic NKT cells with α -GalCer induces liver injury, whereas this cell subset is protective against acute hepatitis in another study [42]. Another important point is that strong activation of iNKT cells with α -GalCer can lead to a profound anergy of these cells and a down-regulation of CD1d [43], which renders them refractory to subsequent activation, and could explain the exacerbation of *Leishmania* infection observed by Stanley *et al.* [33].

The better control of parasite burdens observed as soon as day 15 in WT mice was associated with a massive iNKT cell infiltration detected by flow cytometry in the liver. Indeed, the TCR β + / CD1d- α GalCer-TT+ cell subset accounted for the dramatic increase of CD3+ / NK1.1+ cells in WT mice, whereas other minor subsets remained almost stable (Figure 4). In addition, iNKT cells supported most of the CXCR3 and CD69 expression in lymphoid cells (Figure S3 and data not shown), suggesting that they are the activated T cell main subset recruited at this time point. A recent Indian study conducted in Human patients infected with *L. donovani* pointed to an increased amount of iNKT cells both in peripheral blood and bone marrow compared to healthy controls [44], as well as an increased proportion of the whole CD69+ NKT cell subset in the bone marrow from patients with visceral leishmaniasis [45], suggesting a role in the defense against the parasite. The proportion of iNKT cells returned to basal levels after treatment [44]. The CD4+ iNKT cell subset was the predominant infiltrating subset in WT mice; this cell subset was previously reported to be crucial in the control of parasite burdens in lymph nodes from C57BL/6 mice during the first week following infection with *L. major* [34,46]. We also showed the presence of a NK1.1- / CD1d- α GalCer-TT+ iNKT cell subset, which role remains to be determined. However, its proportion was unchanged after infection.

The higher levels of hepatic parasite burdens in J α 18^{-/-} mice were associated with a defect in the process of tissue granuloma formation. The results observed during our two-month follow-up of WT and J α 18^{-/-} infected mice suggest that iNKT cells contribute to a favorable cytokinic/chemokinic environment that allows an efficient lymphoid response at early steps, but also influence late steps of the granuloma maturation process. We postulate that iNKT cells are the conductor of a progressive orchestration of synchronized actors through progressive and sustained chemokines synthesis, modulating the recruitment and function of various cell types. It is long known that pro-inflammatory cytokines play a key role during the course of infection. TNF- α , was detected by ELISA at significantly higher concentrations in the liver of WT mice at all time points. These data are consistent with a sustained hepatic impregnation with TNF- α , reflecting the greater amount and stronger responsiveness of inflammatory cells in WT animal. TNF- α has previously been shown to play a pivotal role in T cell and monocyte recruitment [5], and Murray *et al.* [12] observed in TNF- α knock-out (KO) mice, that the absence of granuloma assembly on D15 post-infection was correlated with a higher liver parasite burden. Both IL-12 and IFN- γ are also required for resistance to *Leishmania* infection and granuloma assembly, as demonstrated in studies using KO mice [47,48] or anti-IFN- γ or anti-IL-12 injections [8,10]. In the present study, IL-12 induction increased significantly between D15 and D60 post-infection, and was correlated with the number of granulomas in WT mice only. Murray [3] reported that there was a defect in granuloma formation in IL-12 and IFN- γ

KO mice, with a “no structure-no function” relationship, extended to the later stage of infection. Thus, the partial deficiency of IL-12, IFN- γ , and TNF- α induction in J α 18^{-/-} mice could be responsible for a similar mechanism, since the granulomas observed in these mice were less abundant and less well-organized than in WT mice. Interestingly, IFN- γ expression increased throughout the infection and was strongly correlated to the number of granulomas, irrespective of the type of mice, despite higher levels of induction in WT mice. This observation raises the possibility of partial compensatory mechanisms for IFN- γ production in J α 18^{-/-} mice, probably through T cells or NK cells, but inadequate to drive efficient chemokines pathways. A recent study suggests that maximal activation of NK cells would result from a cross-talk between NK and iNKT cells, thus would be observed only in WT mice. Indeed, it was shown that iNKT activation by α -GalCer results in a high speed transactivation of NK cells in a model of C57BL/6 mice, as well as a delayed activation of B cells and T cells [49].

Recently, Uemura *et al.* [50] demonstrated that stimulation of iNKT cells by their specific ligand α -GalCer modifies the IL-12p70/IL-23 balance in favor of enhanced IL-12p70 production by dendritic cells; the down-regulation of IL-23 was markedly associated with IL-4 and IL-10 production by iNKT cells. These data corroborate our results, since we detected significantly higher levels of IL-4 by ELISA and mRNA in WT than in J α 18^{-/-} mice, together with a significant induction of IL-12 in WT mice only, both cytokines being highly correlated in these mice ($r=0.71$, $p<0.0001$). These observations are also consistent with the data of Zhu *et al.* [29], who showed that in a model of T cell mediated hepatitis, the capacity of iNKT cells to produce IL-4 was directly influenced by IL-12. Altogether, these data could point iNKT cells as a major hepatic source of IL-4, contributing to the peculiar hepatic microenvironment and involved in the development of efficient granuloma maturation [13].

Granuloma maturation is indeed a complex process depending on efficient attraction of competent cells in the aim to help infected cells to get rid of parasites. To explain the strong and sustained attraction of immune cells in the liver of infected mice all along the infection process, we investigated large scale chemokine expression, and found that WT mice were more likely able to produce most chemokines, particularly Th1 chemokines, and to induce their receptors than J α 18^{-/-} mice. In particular, we showed that IFN- γ -dependent chemokines (CXCL9/10) were strongly induced, as shown by others [51], and increased during the course of infection, as well as their receptor CXCR3. The role of NKT cells in the homing of CXCR3+ cells in the liver was described in a recent paper [52], but in our model iNKT cells themselves represent the main proportion of CXCR3+ cells infiltrating the liver. Here we also show that numerous other chemokines were generally more strongly induced in WT compared to J α 18^{-/-} mice. Whereas lymphoid cells-attracting chemokines (CCL19, CCL27, CXCL16, CCL9, CCL25) were significantly induced at early time points, myeloid cells-attracting chemokines are mostly induced on D60. Among them, we observed in WT animals a marked expression of the PMN-attractant chemokines MIP-2/CXCL2 and CXCL5, and of the monocyte-attractant chemokine CCL2/MCP-1, as well as of their receptors CXCR2 and CCR2, respectively. This strong induction was correlated with the number of granulomas and in particular with mature granulomas, therefore is supposed to help resolving infection. In cutaneous leishmaniasis, a number of chemokines were shown to be expressed in Humans, of which CCL2, CCL19 and CCL17 [53]. An essential role for CCL2 in the defense against intracellular pathogens, was also described for *Listeria* [54].

Consistent with expression data, flow cytometry analysis of liver immune cell populations assessed the presence of significantly higher amounts of granulocytes and monocytes in WT animals on D60. Histological data definitely confirmed the progressive and stronger attraction of MPO-labeled cells within the hepatic granulomas of WT mice. Finally, we demonstrated the higher induction of enzymes of the oxidative burst, iNOS and MPO, in WT mice, and their correlation to the efficient control of parasite burdens. MPO activity is mostly due to neutrophils, whereas iNOS is associated to phagocytic potency of monocytes-macrophage cells which are target cells for *Leishmania* parasites and display enhanced phagocytic activity after activation. Recent data have shown that neutrophils contribute to efficient protective immune response during *L. donovani* infection of BALB/c mice, since in neutrophil-depleted mice, parasite burdens were higher and granuloma formation was impaired [55]. In Human, the lack of neutrophils recruitment is a histopathologic feature of diffuse cutaneous leishmaniasis, by contrast to local cutaneous leishmaniasis [53], which is also an indirect argument pleading for a beneficial role of these cells. Another recent paper [56] is in accordance with our observations, since it claims that activation of iNKT cells ameliorates listeriosis by accelerating infiltration of Gr-1⁺ cells into the liver. However, the role of neutrophils in the late stage of hepatic infection with *L. donovani* and the accurate link between iNKT cells and neutrophil attraction in the liver are poorly explored, and should be revisited in the light of these results.

Many chemokines were shown to be induced in the liver of WT mice in our study. They probably have intricate and redundant actions and because of the long term follow-up of this study design, it was not possible to dissect their role independently, as it can be made in early steps of infection. However, this large scale descriptive study offers an overview of chemokine expression and provides new insights on the complex pathophysiology of granuloma assembly in the liver. Finally, our data are consistent with a role of iNKT cells in the efficient host response and early control of *L. donovani* proliferation.

Materials and Methods

Ethics statement

This study was carried out in accordance with the French institutional guidelines (Direction des Services Vétérinaires, agreement number 35–86), and with the EC directive #86/609/CEE. The use of $\text{J}\alpha 18^{-/-}$ mice in our animal facilities was approved by the Commission Génétique (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, agreement number 5387-CA-1).

Mice

Female C57BL/6 wild-type mice were purchased from Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France) and acclimatized for at least 10 days before challenge. C57BL/6 iNKT cell-deficient ($\text{J}\alpha 18^{-/-}$) mice were generated and provided by M. Taniguchi (Chiba University, Japan) and were backcrossed for at least 10 generations. Mice were bred and housed in our animal facilities under pathogen-free conditions. Mice were 7–10-weeks-old when challenged with *L. donovani*. Naïve congenic mice, matched according to age, were used as non-infected controls.

Parasites and infection of mice

The *L. donovani* strain (MHOM/SD/97/LEM3427, typed as Zym MON-18 by the Centre National de Référence des Leishmanioses, Montpellier, France) was maintained *in vivo* by serial murine passages and grown *in vitro* on NNN (Novy-McNeal-

Nicolle) blood agar at 27°C. Prior to infection, amplification of promastigotes was carried out by culture in Schneider's *Drosophila* medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, for 6 days at 27°C, until they reached stationary phase. Animals were infected on day 0 (D0) by intraperitoneal injection of 10⁸ promastigotes, and groups of 4–6 mice were sacrificed on D15, D30, or D60. Prior to sacrifice, blood was collected by retro-orbital puncture, and the serum was stored at –80°C. The liver was recovered and weighed, then cut into pieces, formalin-fixed and paraffin-embedded or snap frozen in isopentane/liquid nitrogen for mRNA and protein extraction.

Quantification of liver parasitic burden

Parasite burden was determined by microscopic examination of Giemsa-stained smears, with the results expressed as Leishman Donovan Units (LDU) (i.e. number of amastigotes per 1000 cell nuclei × liver weight in mg).

Quantification of granulomas in liver tissue

The histological response to infection was evaluated quantitatively after microscopic examination of paraffin-embedded liver sections stained with H&E. Granulomas were classified into two categories based on the number of cells: i) <25 cells; ii) ≥25 cells. The type of granuloma assembly was also recorded, i.e. mature granuloma foci displaying a well-organized peripheral ring of lymphocytes surrounding a Kupffer cell core, or poorly organized granuloma foci.

Immunohistochemical characterization of liver granulomas

The attraction of some effector cells to granulomas was quantified after immunohistochemical staining. T lymphocytes were stained using an anti-CD3 rabbit monoclonal antibody diluted 1/200 (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA) and PMN were stained using a polyclonal rabbit anti-myeloperoxidase (MPO) antibody diluted 1/2000 and a Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Peterborough, UK), according to the manufacturer's instructions. The sections were counterstained with hematoxylin.

RNA isolation and analysis of hepatic gene expression

Total cellular RNA was extracted and purified from liver samples using Trizol reagent (Invitrogen), then treated with DNase (10 U DNase I/µg total RNA) and reverse transcribed with SuperScriptTM II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. A screening of a large panel of cytokines and chemokines and their receptors was analyzed (listed in Table S1) using a large-scale qPCR approach to analyze the global response of liver cells to infection. PCR amplification reactions were carried out in triplicate with iQ-SYBR Green Supermix (Bio-Rad) in a 15µl reaction volume containing 200 nM primers and 5 ng of pooled cDNA from each time point and group of mice, using a Chromo4TM System (Bio-Rad). Primers were designed using Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3www.cgi>) and the corresponding sequences will be available upon request. The ΔCt method was retained for quantification and GAPDH, HPRT1 and HSPCB housekeeping genes used for multiple normalization as described previously [57].

Quantitative analysis of expression of selected genes was performed using the StepOne plus system (Applied Biosystems, Cergy-Pontoise, France) in 96-well optical plates with Power SYBR[®]green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 3 µM primers and cDNA corresponding to 30 ng of total RNA input

in a final volume of 20 μ L. Samples were analyzed in duplicate and expression levels of target genes were normalized to expression of 18S rRNA. Results were expressed as $2^{-\Delta\Delta C_t}$ referred as fold induction in relation to the mean C_t obtained with non-infected WT mice. The PCR primers were designed using Primer express 3 software and synthesized by Qiagen or Sigma-Aldrich (Lyon, France).

Tissue cytokine assay

For the measurement of hepatic IL-4, TNF- α , and IFN- γ expression, liver samples (200 mg) were homogenized individually using a disperser (Ultra-Thurax T25; Janke & Kunkel, Labor-technik, Germany) in 0.5 ml of ice-cold PBS containing complete protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Meylan, France). Homogenates were centrifuged for 15 min at 10,000 rpm at 4°C. The supernatants were recovered and submitted to a second centrifugation. All lysates were equalized with complement-free FCS to a 10% concentration, and tested whole and diluted 1:2 in 10% complement-free FCS. The different cytokines were quantified using DuoSet ELISA development systems for mouse IL-4, TNF- α , and IFN- γ (R&D Systems), according to the manufacturer's instructions, except for the reveal step in which orthophenyl-dianizidine was used instead of tetramethylbenzidine. Absorbance was determined at 490 nm using a spectrophotometer, and the results were determined from a seven-point standard curve, and expressed as pg/mL/100 mg of tissue.

Flow cytometric analyses

For flow cytometric analyses, livers were perfused with PBS to remove blood cell contamination prior to dissection. After homogenization of liver tissue and elimination of hepatocytes by sedimentation, immune cells were purified using 35% Percoll (GE healthcare) and red blood cells were lysed. 10^6 leucocytes were incubated with anti-CD16/32 (BD Pharmingen) to block non-specific binding and washed. The cells were then incubated with appropriate dilutions of anti-Gr1-FITC, anti-CD11b-PE-Cy7, anti-CD11c-APC, anti-CD4-PECy7 or anti-CD4-PB, anti-CD3-PB or FITC, anti-NK1.1-PerCP-Cy-5.5, anti-F4/80-PE, and anti-CD8-APC-Cy7 antibodies, all purchased from BD Pharmingen. Other antibody panels associating CD3-V500, anti-TCR β -V450, anti-TCR $\gamma\delta$ -FITC and CD69-PE or CXCR3-PE were used for accurate phenotyping of lymphoid cells. Invariant NKT cells were characterized using α GalCer-tetramer-PE or APC, provided by the NIH tetramer facility (Atlanta, GA). The cells were washed, fixed in PBS containing 2% FCS, 0.01 M sodium azide and 2% formaldehyde. The stained cells were analyzed on a FACS Aria II® flow cytometer using BD FACS Diva software (BD Bioscience) and the data were processed using CXP software (Beckman Coulter). Dead cells and doublet cells were excluded on the basis of forward and side scatter.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM for each group of mice (8–10 mice per group from two independent experiments). Differences between groups were analyzed using non-parametric tests (Mann-Whitney test). Correlations between variables were evaluated using the Spearman rank correlation test. Paired statistical

analysis of mRNA induction between the two groups was performed using the Student's *t*-test. Data from mRNA high throughput screening were analyzed using the Kruskal-Wallis test and the Dunn's multiple comparison test. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.02 software. Differences were considered significant when the *p*-value was <0.05 , and graduated as *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), and ***($p < 0.001$).

Supporting Information

Figure S1 Induction rates of genes mRNA from selected immune markers in C57BL/6 and *J α 18^{-/-}* mice. (A) Mean induction rates in non infected mice. (B) Mean induction rates 15 days after infection with *L. donovani*. mRNA induction was normalized on housekeeping genes. Gene targets which were not more expressed than housekeeping genes are not represented. (TIF)

Figure S2 Ratios of most significant mRNA induction rates of immune markers in *J α 18^{-/-}* compared to WT mice at early stage (D15) and late stage (D60) of infection (induction of at least +/- 2-fold compared to WT mice). (TIF)

Figure S3 CXCR3 expression on lymphoid cells in the liver of C57BL/6 WT. Analysis by flow cytometry after infection with *L. donovani*, using, anti-NK1.1-PerCP-Cy-5.5, anti- β TCR-V450, α GalCer/CD1d tetramer-PE, anti-CD4-PE-Cy7, anti-CD8-APC-Cy7, CD3-FITC and anti-CXCR3-APC. (A) Quantification of CXCR3 expression in the following subsets: total lymphocytes, CD4+TL, iNKT cells (TCR β +/ α GalCer/CD1d tetramer+ gated cells), and NK cells (TCR β -/NK1.1+gated cells). Black transparent curve represents a non infected mice; grey curve represents an infected mice. This panel is representative of three mice per group. 10^6 cells of liver homogenates were labeled and data were analyzed on 60,000 events. (B) Mean percentage \pm SEM of CXCR3+cells in each gated cell subset from infected or non infected WT mice. (C) Absolute numbers of recruited CXCR3+cells in the liver from infected or non infected WT mice. (TIF)

Table S1 List of immune markers analyzed by transcriptomic approach.

(DOC)

Acknowledgments

We thank the Anatomopathology Department of the Faculté de Médecine de Rennes (IFR 140, Université Rennes 1) for use of their histology facilities, and the NIH tetramer core facility for α GalCer-CD1d tetramers. We also thank Christelle Manuel (Université Rennes 1) for technical assistance and Gersende Lacombe (flow cytometry facility, Université Rennes 1).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JPG FRG. Performed the experiments: ASD FRG CPP OR JC ML. Analyzed the data: FRG JPG ASD OR JC AH. Contributed reagents/materials/analysis tools: JPG CPP HG AH MS CG. Wrote the paper: FRG ASD JPG. Provided the required funding: JPG FRG.

References

- Engwerda CR, Kaye PM (2000) Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol Today* 21: 73–78.
- Murray HW, Squires KE, Miralles CD, Stoeckle MY, Granger AM, et al. (1992) Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. *J Immunol* 148: 1858–1863.
- Murray HW (2001) Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol* 82: 249–267.

4. Mielke ME, Peters C, Hahn H (1997) Cytokines in the induction and expression of T-cell-mediated granuloma formation and protection in the murine model of listeriosis. *Immunol Rev* 158: 79–93.
5. Saunders BM, Cooper AM (2000) Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol* 78: 334–341.
6. Beattie L, Peltan A, Maroof A, Kirby A, Brown N, et al. (2010) Dynamic imaging of experimental *Leishmania donovani*-induced hepatic granulomas detects Kupffer cell-restricted antigen presentation to antigen-specific CD8 T cells. *PLoS Pathog* 6: e1000805.
7. Murray HW, Nathan CF (1999) Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *JExp Med* 189: 741–746.
8. Murray HW, Hariprasad J (1995) Interleukin 12 is effective treatment for an established systemic intracellular infection: experimental visceral leishmaniasis. *JExp Med* 181: 387–391.
9. Tumang MC, Keogh C, Moldawer LL, Helfgott DC, Teitelbaum R, et al. (1994) Role and effect of TNF-alpha in experimental visceral leishmaniasis. *JImmunol* 153: 768–775.
10. Squires KE, Schreiber RD, McElrath MJ, Rubin BY, Anderson SL, et al. (1989) Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous IFN-gamma in host defense and tissue granulomatous response. *JImmunol* 143: 4244–4249.
11. Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, et al. (2004) The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev* 201: 239–253.
12. Murray HW, Jungbluth A, Ritter E, Montelibano C, Marino MW (2000) Visceral leishmaniasis in mice devoid of tumor necrosis factor and response to treatment. *Infect Immun* 68: 6289–6293.
13. Stager S, Alexander J, Carter KC, Brombacher F, Kaye PM (2003) Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. *Infect Immun* 71: 4804–4807.
14. Murray HW (2000) Mononuclear cell recruitment, granuloma assembly, and response to treatment in experimental visceral leishmaniasis: intracellular adhesion molecule 1-dependent and -independent regulation. *Infect Immun* 68: 6294–6299.
15. Stern JJ, Oca MJ, Rubin BY, Anderson SL, Murray HW (1988) Role of L3T4+ and LyT-2+ cells in experimental visceral leishmaniasis. *JImmunol* 140: 3971–3977.
16. Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM (1999) *Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner. *EurJImmunol* 29: 203–214.
17. Gomes-Pereira S, Rodrigues OR, Rolao N, Almeida PD, Santos-Gomes GM (2004) Hepatic cellular immune responses in mice with "cure" and "non-cure" phenotype to *Leishmania infantum* infection: importance of CD8+ T cells and TGF-beta production. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41: 59–68.
18. Smelt SC, Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM (2000) B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *JImmunol* 164: 3681–3688.
19. Apostolou I, Takahama Y, Belmant C, Kawano T, Huerre M, et al. (1999) Murine natural killer T(NKT) cells [correction of natural killer cells] contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5141–5146.
20. Im JS, Kang TJ, Lee SB, Kim CH, Lee SH, et al. (2008) Alteration of the relative levels of iNKT cell subsets is associated with chronic mycobacterial infections. *Clin Immunol* 127: 214–224.
21. Sada-Ovalle I, Chiba A, Gonzales A, Brenner MB, Behar SM (2008) Innate invariant NKT cells recognize *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages, produce interferon-gamma, and kill intracellular bacteria. *PLoS Pathog* 4: e1000239.
22. Exley MA, Koziel MJ (2004) To be or not to be NKT: natural killer T cells in the liver. *Hepatology* 40: 1033–1040.
23. Gao B, Jeong WI, Tian Z (2008) Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 47: 729–736.
24. Ilgoutz SC, McConville MJ (2001) Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *IntJParasitol* 31: 899–908.
25. Karmakar S, Paul J, De T (2011) *Leishmania donovani* glycosphingolipid facilitates antigen presentation by inducing relocation of CD1d into lipid rafts in infected macrophages. *EurJImmunol* 41: 1376–1387.
26. Amprey JL, Im JS, Turco SJ, Murray HW, Illarionov PA, et al. (2004) A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. *JExp Med* 200: 895–904.
27. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG (2000) NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 21: 573–583.
28. Park O, Jeong WI, Wang L, Wang H, Lian ZX, et al. (2009) Diverse roles of invariant natural killer T cells in liver injury and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Hepatology* 49: 1683–1694.
29. Hansen DS, Schofield L (2004) Regulation of immunity and pathogenesis in infectious diseases by CD1d-restricted NKT cells. *IntJParasitol* 34: 15–25.
30. Miller ML, Sun Y, Fu YX (2009) Cutting edge: B and T lymphocyte attenuator signaling on NKT cells inhibits cytokine release and tissue injury in early immune responses. *JImmunol* 183: 32–36.
31. Sprengers D, Sille FC, Derkow K, Besra GS, Janssen HL, et al. (2008) Critical role for CD1d-restricted invariant NKT cells in stimulating intrahepatic CD8 T-cell responses to liver antigen. *Gastroenterology* 134: 2132–2143.
32. Zhu R, Diem S, Araujo LM, Aumeunier A, Denizeau J, et al. (2007) The Pro-Th1 cytokine IL-12 enhances IL-4 production by invariant NKT cells: relevance for T cell-mediated hepatitis. *JImmunol* 178: 5435–5442.
33. Stanley AC, Zhou Y, Amante FH, Randall LM, Haque A, et al. (2008) Activation of invariant NKT cells exacerbates experimental visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog* 4: e1000028.
34. Ishikawa H, Hisaeda H, Taniguchi M, Nakayama T, Sakai T, et al. (2000) CD4(+) v(alpha)14 NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with *Leishmania major*. *Int Immunol* 12: 1267–1274.
35. Mattner J, Donhauser N, Werner-Felmayer G, Bogdan C (2006) NKT cells mediate organ-specific resistance against *Leishmania major* infection. *Microbes Infect* 8: 354–362.
36. Beattie L, Svensson M, Bune A, Brown N, Maroof A, et al. (2010) *Leishmania donovani*-induced expression of signal regulatory protein alpha on Kupffer cells enhances hepatic invariant NKT-cell activation. *EurJImmunol* 40: 117–123.
37. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, et al. (2007) Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *JClin Invest* 117: 902–909.
38. Rollins BJ (1997) Chemokines. *Blood* 90: 909–928.
39. Bradley DJ, Kirkley J (1977) Regulation of *Leishmania* populations within the host. I. the variable course of *Leishmania donovani* infections in mice. *Clin Exp Immunol* 30: 119–129.
40. Lehmann J, Enssle KH, Lehmann I, Emmendorfer A, Lohmann-Matthes ML (2000) The capacity to produce IFN-gamma rather than the presence of interleukin-4 determines the resistance and the degree of susceptibility to *Leishmania donovani* infection in mice. *JInterferon Cytokine Res* 20: 63–77.
41. Osman Y, Kawamura T, Naito T, Takeda K, Van Kaer L, et al. (2000) Activation of hepatic NKT cells and subsequent liver injury following administration of alpha-galactosylceramide. *EurJImmunol* 30: 1919–1928.
42. Lisbonne M, L'Helgoual'h A, Nauwelaers G, Turlin B, Lucas C, et al. (2011) Invariant natural killer T-cell-deficient mice display increased CCl₄-induced hepatitis associated with CXCL1 over-expression and neutrophil infiltration. *EurJImmunol* 41: 1720–1732.
43. Crowe NY, Uldrich AP, Kyparissoudis K, Hammond KJ, Hayakawa Y, et al. (2003) Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells. *JImmunol* 171: 4020–4027.
44. Rai AK, Thakur CP, Seth T, Mitra DK (2011) Enrichment of invariant natural killer T cells in the bone marrow of visceral leishmaniasis patients. *Parasite Immunol* 33: 688–691.
45. Rai AK, Thakur CP, Seth T, Mitra DK (2011) Early activated Th-1 type and dominantly diverse natural killer T (CD3CD161Valpha24) cells in bone marrow among visceral leishmaniasis patients. *IntJParasitol* 41: 1069–1077.
46. von der Weid T, Beebe AM, Roopenian DC, Coffman RL (1996) Early production of IL-4 and induction of Th2 responses in the lymph node originate from an MHC class I-independent CD4+NK1.1- T cell population. *JImmunol* 157: 4421–4427.
47. Taylor AP, Murray HW (1997) Intracellular antimicrobial activity in the absence of interferon-gamma: effect of interleukin-12 in experimental visceral leishmaniasis in interferon-gamma gene-disrupted mice. *JExp Med* 185: 1231–1239.
48. Satoskar AR, Rodig S, Telford SR, 3rd, Satoskar AA, Ghosh SK, et al. (2000) IL-12 gene-deficient C57BL/6 mice are susceptible to *Leishmania donovani* but have diminished hepatic immunopathology. *EurJImmunol* 30: 834–839.
49. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, et al. (1999) Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *JImmunol* 163: 4647–4650.
50. Uemura Y, Liu TY, Narita Y, Suzuki M, Nakatsuka R, et al. (2009) Cytokine-dependent modification of IL-12p70 and IL-23 balance in dendritic cells by ligand activation of Valpha24 invariant NKT cells. *JImmunol* 183: 201–208.
51. Svensson M, Zubairi S, Maroof A, Kazi F, Taniguchi M, et al. (2005) Invariant NKT cells are essential for the regulation of hepatic CXCL10 gene expression during *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun* 73: 7541–7547.
52. Santodomingo-Garzon T, Han J, Le T, Yang Y, Swain MG (2009) Natural killer T cells regulate the homing of chemokine CXC receptor 3-positive regulatory T cells to the liver in mice. *Hepatology* 49: 1267–1276.
53. Campanelli AP, Brodskyn CI, Boaventura V, Silva C, Roselino AM, et al. (2010) Chemokines and chemokine receptors coordinate the inflammatory immune response in human cutaneous leishmaniasis. *Hum Immunol* 71: 1220–1227.
54. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG (2008) Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26: 421–452.
55. McFarlane E, Perez C, Charmoy M, Allenbach C, Carter KC, et al. (2008) Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 76: 532–541.
56. Emoto M, Emoto Y, Yoshizawa I, Kita E, Shimizu T, et al. (2010) Alpha-GalCer ameliorates listeriosis by accelerating infiltration of Gr-1+ cells into the liver. *EurJImmunol* 40: 1328–1341.
57. Vandessempel J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.

Immunostimulatory Properties of Dendritic Cells after *Leishmania donovani* Infection Using an *In Vitro* Model of Liver Microenvironment

Ludovic Donaghy^{1,2,9}, Florian Cabillic^{1,3,4,9}, Anne Corlu^{1,5}, Octavie Rostan^{1,6}, Olivier Toutirais^{1,3}, Christiane Guguen-Guillouzo^{1,5}, Claude Guiguen^{1,7}, Jean-Pierre Gangneux^{1,6,7*}

1 Université de Rennes 1, Rennes, France, **2** Inserm U522, Régulation des Equilibres Fonctionnels du Foie Normal et Pathologique, Rennes, France, **3** EE 341 Biothérapies Innovantes, Rennes, France, **4** Laboratoire de Cytogénétique et Biologie Cellulaire, CHU Rennes, Rennes, France, **5** Inserm, UMR991, Liver Metabolisms and Cancer, Rennes, France, **6** EA SeRAIC 4427, IRSET, Rennes, France, **7** Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Rennes, Rennes, France

Abstract

Background: Recent advances demonstrated that liver dendritic cells (DCs) promote immunologic hyporesponsiveness that may contribute to hepatic tolerance. Although there has been significant work on the phenotypic and functional roles of such DCs, the impact of liver microenvironment on the immune properties of infected DC is still poorly explored, probably because of the limitations of modelization.

Methodology/Principal Findings: Here, we hypothesized that DC tolerogenic properties have an impact on the antimicrobial response, particularly during the infection by the protozoan parasite *Leishmania donovani*. Indeed, a lymphocytic Th2 environment was reported to favour the growth and proliferation of *L. donovani*. We first modeled an adequate monocyte-differentiated DC model, either in rat liver epithelial cell- or in a human hepatic non-parenchymal cell-conditioned medium in order to infect them further. We established that DCs differentiated in a hepatic microenvironment displayed a CD14+/CD16+/CD123+ phenotype, secreted low IL-12p70 and had an impaired capacity to stimulate allogeneic T lymphocyte proliferation and IFN γ secretion. We then infected DCs with *L. donovani* in the *in vitro*-defined hepatic microenvironment. The infection of hepatic DCs restored their capacity to stimulate allogeneic T-cell proliferation and to induce lymphocytic secretion of IFN γ . Such characteristics were recently shown to favour granuloma formation in mice liver.

Conclusions/Significance: Our results suggest that the specific immunostimulatory properties of infected hepatic DCs might amplify the granuloma maturation, which warrants the effective control of infection in the liver during visceral leishmaniasis.

Citation: Donaghy L, Cabillic F, Corlu A, Rostan O, Toutirais O, et al. (2010) Immunostimulatory Properties of Dendritic Cells after *Leishmania donovani* Infection Using an *In Vitro* Model of Liver Microenvironment. PLoS Negl Trop Dis 4(6): e703. doi:10.1371/journal.pntd.0000703

Editor: Ana Rodriguez, New York University School of Medicine, United States of America

Received: October 19, 2009; **Accepted:** April 12, 2010; **Published:** June 8, 2010

Copyright: © 2010 Donaghy et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Conseil Scientifique de la Faculté de Médecine de Rennes. LD is recipient of fellowship of Inserm/Région Bretagne. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: jean-pierre.gangneux@univ-rennes1.fr

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Parasitic infection with the obligate intracellular protozoan *Leishmania* spp. results in a broad spectrum of clinical diseases in humans. Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe form of leishmaniasis, compared to cutaneous, diffuse cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. The viscerotropic species *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum* are responsible for 500,000 new cases of VL each year in 62 endemic countries. VL ranges from asymptomatic infection, known as the sub-clinical form, to acute and potentially fatal disseminated disease with bone marrow, liver and spleen involvement [1,2].

In the blood stream, freely circulating *Leishmania* parasites are rapidly coated by complement molecules (C3, C5...) and immunoglobulins. Complement receptors (CR1 and CR3) and Fc γ receptors expressed on macrophage and dendritic cell (DC)

membranes can recognize opsonized parasites and induce phagocytosis [3,4]. *In vitro* infection of DCs with axenic non-opsonized *Leishmania* has also indicated the involvement of the C type lectin receptor DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin) in *Leishmania* internalization. DC-SIGN mediated internalization acts by recognition of mannose glyco-conjugates which are strongly expressed on the cytoplasmic membrane of parasites [5,6]. However, its precise ligand has not yet been described. DCs play a pivotal role in the control of *Leishmania* infection by directing T-cell polarization and cytokine production [3]. Their capability to modulate the immune response greatly depends on parasite diversity, with contradictory data obtained depending on whether DCs are infected with viscerotropic or dermatropic strains of *Leishmania* [7–15]. The response of DCs to infection also depends on their lineage, stage of maturation, processed antigens and tissue localization.

Author Summary

Because of its location and function, the liver is continuously exposed to a wide range of antigens. Pathogenic microorganisms must be eliminated while a large number of dietary or commensal organism antigens and hepatic metabolites must be tolerated. Therefore, the liver has developed a specialized immune system that favours tolerance rather than immunity and liver dendritic cells (DCs) act as a major cell subtype in promoting this response. Our work aimed to examine if such immunologic hyporesponsiveness has an impact on the control of the hepatic burden of *Leishmania donovani*, a protozoan parasite that grows in liver and spleen tissues after infection (called visceral leishmaniasis in South America and Mediterranean basin, and Kala Azar in South East Asia). We first modeled an original model of hepatic DCs and infected them with *Leishmania donovani*. In contrast to control DCs, infection of hepatic DCs restored the alterate capacity of non-infected liver DCs to stimulate allogeneic T cell proliferation and IFN γ secretion. Such characteristics were recently shown to favour granuloma formation in mouse liver. This research provides an explanation for the observation that *Leishmania* parasite growth is controlled in the liver via an efficient granuloma response.

Because of its location and function, the liver is continuously exposed to a wide range of antigens. Pathogenic microorganisms must be eliminated whereas a large number of dietary or commensal organism antigens as well as hepatic metabolites must be tolerated. Therefore, the liver has developed a specialized immune system that favours tolerance rather than immunity [16–22]. The survival of liver allografts without the need of immunosuppressive treatment provides evidence of such tolerance [23–25]. Thus, hepatic DCs may play a critical role in the accurate initiation and control of the specialized immune response in the liver [18,26]. Human liver myeloid DCs of human liver have been identified in cells spontaneously migrating from thin pieces of liver [27] and in cells eluted from donor livers prior to transplantation [28]. Human liver myeloid DCs express a semi-mature phenotype, with lower expression levels of CD80, CD86, DC-LAMP and CCR7 than those of DCs in lymph nodes [28]. Hepatic DCs express DC-SIGN, CD40 and MHC II molecules but also the common monocyte lineage marker CD14 and the plasmacytoid marker CD123 [27]. These cells synthesize IL-10 but not IL-12p70 [18], whereas IL-12p40 and IL-12p35 transcripts were detected by real-time PCR [27]. Finally, hepatic DCs stimulated T lymphocytes to secrete IL-10 and very low amounts of IFN γ [27].

One of our team has developed an *in vitro* model of monocyte-derived DCs co-cultured with rat liver epithelial cells (RLEC). This model of hepatic DCs differentiated into a CD11c⁺/CD14⁺/CD123⁺ DC subset that synthesized IL-10 but not IL-12p70 and promoted a Th2 immune response [29]. Recently, Bamboat *et al.* [30] definitely confirmed that human liver DCs promote immunologic hyporesponsiveness through the generation of suppressive T lymphocytes and a subset of IL-4 producing Th2 cells, via an IL-10-dependent mechanism.

In this study, we evaluated the molecular response of DCs to *Leishmania* infection in a hepatic microenvironment. We first developed an *in vitro* model for the differentiation of human myeloid DCs in a hepatic microenvironment, using either a rat liver epithelial cell-conditioned medium (RLEC-CM) or a human hepatic non parenchymal cell-CM (hNPC-CM). We then compared the molecular response of hepatic DCs to the infection

with a hepatotropic isolate of *L. donovani*. Here, we report that DCs differentiated in a liver-CM show impaired allostimulating capacity. The infection of these DCs with *L. donovani* amplified their Th2 polarizing cytokine profile and restored their ability to stimulate the proliferation and IFN γ secretion of T lymphocytes. This response could act as a specific hepatic immunological mechanism involved in the control of parasitic infections.

Methods

Ethics statement

Access to the biopsy material was in agreement with French laws and satisfied the requirements of the Ethics Committee of the institution.

Cultures of hepatic cells and production of hepatic conditioned medium

A rat liver epithelial cell line (RLEC) was isolated and cultured in William's E medium (Invitrogen, France) with 10% foetal calf serum (FCS, Invitrogen) as described by Williams *et al.* [31]. Human hepatic cells were isolated from liver biopsies by collagenase digestion [32] and centrifuged at low speed for 1 min. Hepatocytes were recovered from the pellet and the enriched hepatic nonparenchymal cell (hNPC) population from the supernatant. hNPCs were cultured in Williams' E medium with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 5 μ g/mL bovine insulin, 5 \times 10⁻⁵ M hydrocortisone hemisuccinate. When RLEC or hNPC reached confluence, the medium was removed and replaced with RPMI 1640 Glutamax-I medium (Invitrogen, France) containing 10% FCS. The 24 h culture supernatant was then recovered, filtered, and used as RLEC-CM and hNPC-CM for DC differentiation.

Dendritic cell differentiation and maturation

Monocytes were isolated and purified from healthy blood donor buffy-coats (Etablissement Français du Sang, Rennes, France) using a RosetteSepTM human monocyte enrichment cocktail (StemCell Technologies, France) and centrifugation on a Ficoll-Hypaque gradient (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.). Human monocytes were then plated (2 \times 10⁶ cells in 2 mL) into 6-well culture plates. Monocytes were cultured in RLEC-CM or hNPC-CM, both supplemented with IL-4 (500 U/mL; Peprotech Inc., Rocky Hill, NJ). Control monocytes were simultaneously cultured in RPMI 1640 Glutamax-I medium containing 25 mM HEPES, 10% FCS, IL-4 (500 U/mL) and GM-CSF (800 U/mL; Peprotech Inc., Rocky Hill, NJ). On day 2, cultures were fed by removing half of the spent medium and adding fresh medium containing cytokines to fulfill the initial volume of 2 mL. After 5 days of culture, immature myeloid DCs were harvested and recultured (5 \times 10⁵ cells/mL) for two additional days in maturation medium containing complete culture medium supplemented with IFN γ (1000 IU/mL; Imukin, Boehringer Ingelheim, France) and *Escherichia coli* LPS (1 μ g/mL; Sigma). Culture supernatant was recovered on day 7 and centrifuged prior to be cryopreserved for subsequent analysis of cytokine production. IL-10 and IL-12p70 secretions were measured using ELISA kits (optEIA; BD Biosciences, France). For the intracellular IL-12 detection, anti-IL-12 (p35/70p)-APC antibodies from Miltenyi Biotec Inc. (USA) were used according the manufacturer's recommendations.

Parasite culture and DC infection

L. donovani strain MHOM/SD/97/LEM3427 Zym MON-18 was isolated from a patient with VL and was grown *in vitro* on

blood agar. Prior to infection, amplification of promastigotes was carried out by culture in Schneider medium (Gibco, Invitrogen) supplemented with 10% FCS and antibiotics (penicillin 200 IU and streptomycin 200 µg/mL) for 6 days, until they reached infective stationary phase. Five-day-old DCs were then exposed to stationary phase promastigotes for 2 days. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, Invitrogen, France) labelling of *Leishmania donovani* promastigotes was performed at a 2 µM concentration for 10⁷ parasites/mL. Excreted-secreted antigens (ESA) from *Leishmania donovani* were obtained by centrifugation of the parasite suspension (600 g, 10 min) and 0,2 µm filtration of the supernatant.

Flow cytometric analysis of cell surface molecules

Control and infected DCs were incubated for 30 min at 4°C with monoclonal antibodies (mAb) directed against CD14, CD16, CD40, CD86, HLA DR, CD123, DC-SIGN and CD83 (BD PharMingen, USA) and CD1c (Miltenyi Biotec, France). Isotype-matched control labelling was included in all experiments. For cell viability assays, cells were incubated 5 min with 7ADD (e-bioscience, SD, USA). Data acquisition was performed using a FACSCalibur flow cytometer and CellQuest software (Becton-Dickinson, USA). Data analyses were performed with WinMDI software (J. Trotter).

Allogeneic stimulation assay

T lymphocytes were isolated from healthy blood donor buffy-coats with RosetteSep™ human T-cell enrichment cocktail

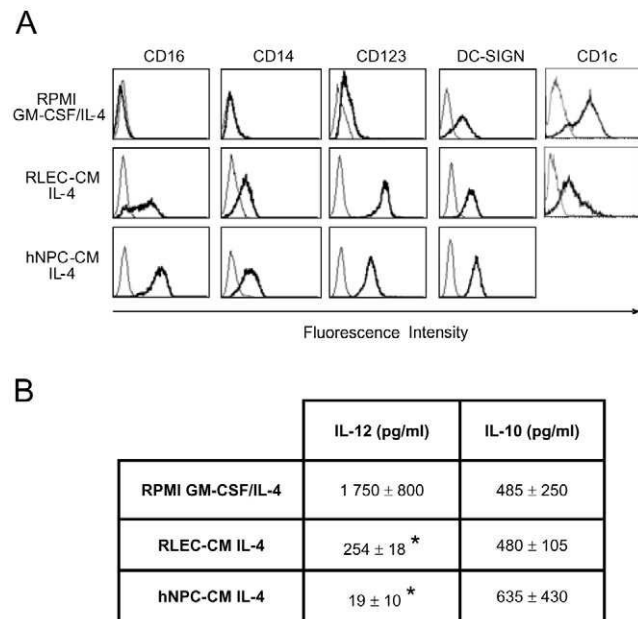


Figure 1. Immunophenotype and cytokine secretion profile of monocyte-derived DCs from RLEC-CM and hNPC-CM cultures. Monocytes were cultured in RPMI medium, RLEC-CM or hNPC-CM with the indicated cytokine combinations. On day 5, DCs were harvested and recultured (5 × 10⁵ cells/ml) for 2 days in the presence of IFNγ (1000 IU/ml) plus LPS (1 µg/ml). **A.** Cells were stained with specific antibodies (thick line histograms) or isotype controls (thin line histograms). Results for a single representative donor out of at least three donors are shown. **B.** Production of IL-10 and IL-12p70 was measured by ELISA after 48 h of maturation. Results are expressed as the mean ± SD of at least three experiments. When indicated, the mean value was statistically significant compared to control DCs (*, p < 0.05). doi:10.1371/journal.pntd.0000703.g001

(StemCell Technologies, France) and centrifugation on Ficoll-Hypaque gradient. Mixed leukocyte reactions (MLRs) were carried out in 96-well culture plates with 200 µL of medium. Allogeneic lymphocytes (1 × 10⁵) were co-cultured in complete RPMI 1640 medium with 7, 5 or 3-day-old DCs differentiated either in RPMI 1640 medium or RLEC-CM and infected or not with *L. donovani*. DC:T lymphocyte ratio of 1:10, 1:20 and 1:100 were used. Lymphocyte proliferation was measured on day 6 after a 16 h pulse with [³H]-methyl-thymidine (1 µCi/well). CD4+ or CD8+ T lymphocyte proliferation was characterized by flow cytometry after CFSE labelling (0.2 µM concentration for 10⁶ cells/mL). To analyse cytokine production by lymphocytes, 1 × 10⁵ 6-day-old MLR cultures lymphocytes were restimulated with anti-CD3 (1 µg/mL) and anti-CD28 (1 µg/mL) antibodies. IFNγ, IL-4 and IL-10 secretion was measured 48 h after restimulation using ELISA kits (OptEIA, BD Biosciences).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the non-parametric Mann-Whitney test. Values of p < 0.05 were considered statistically significant.

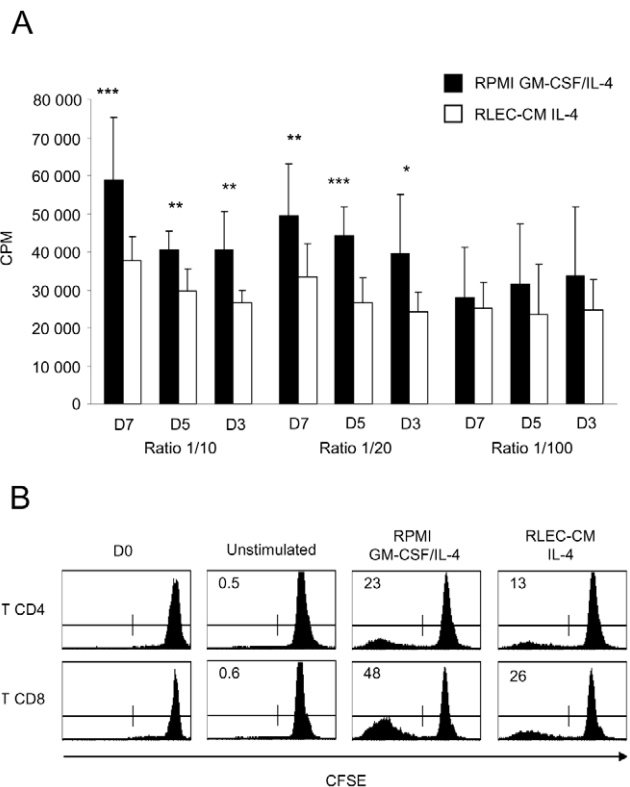


Figure 2. Allogeneic lymphocyte proliferation induced by DCs from RLEC-CM culture. DCs were differentiated and matured (IFNγ/LPS) in RPMI medium in the presence of GM-CSF and IL-4, or in RLEC-CM with IL-4 and then cultured for 6 days with allogeneic T lymphocytes (1 × 10⁵). **A.** Lymphocyte proliferation induced by 3, 5 and 7-day-old DCs was measured after a 16 h pulse with [³H]-methylthymidine (1 µCi/well); DC:T lymphocyte ratios of 1:10, 1:20 and 1:100 were used. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001. **B.** T lymphocytes were labelled with CFSE and stained with anti-CD4 and anti-CD8 antibodies for flow cytometry analysis. Percentage of proliferating cells is indicated on the histograms. doi:10.1371/journal.pntd.0000703.g002

Results

Hepatic conditioned-medium influences the differentiation of monocytes in a specific hepatic DC subset

The influence of the hepatic environment on human monocyte differentiation was investigated using RLEC and hNPC conditioned-medium (CM). Monocytes cultured in both RLEC-CM and hNPC-CM differentiated into a CD16+/CD14+/CD123+ DC subset as shown in figure 1A. By contrast, control DCs were CD16-/CD14-/CD123low. Over-expression of co-stimulatory (CD40 and CD86) and MHC-class II molecules was observed (data not shown) as previously shown using a co-culture model [29]. Regarding the cytokine secretion, mature RLEC-CM- and hNPC-CM-differentiated DCs produced IL-10 at similar level than control DCs, but IL-12p70 secretion was dramatically reduced compared with control DCs ($p < 0.05$) (Fig. 1B). Thus, both RLEC-CM and hNPC-CM DCs display the same specific hepatic phenotype and secretion profile.

RLEC-CM DCs have an impaired capacity to stimulate allogeneic T lymphocyte proliferation

To determine the capacity of this hepatic DC subset to induce an immune response, we carried out MLRs. Allogeneic T lymphocytes were co-cultured with 7, 5 or 3 day-old DCs. Thymidine incorporation assays demonstrated an impaired capacity of RLEC-CM DCs to induce allogeneic lymphocyte proliferation for both 1:10 and 1:20 DC:T lymphocyte ratios, compared with control DCs (Fig. 2A). Flow cytometry analysis of

CFSE-labelled lymphocytes showed that the percentage of proliferating T lymphocytes was two-fold lower with RLEC-CM DCs than control DCs (13% vs 23% and 26% vs 48% for T CD4 and CD8, respectively). Moreover, the CD4:CD8 proliferating T lymphocyte ratio was similar *i.e.* 1:2 for both RLEC-CM and control DCs (Fig. 2B).

L. donovani infection does not alter the phenotypic maturation of RLEC-CM DCs

To assess the effects of *L. donovani* infection on the immunophenotype and cytology of RLEC-CM DCs, infection with *L. donovani* was carried out during the final 2 days of DC culture. The percentage of infected DCs ranged between 31% and 35% for control DCs and was 49% and 48% for RLEC-CM DCs at days 1 and 3, respectively (Fig. 3A). The average of intracellular amastigote number was of 3 per infected cells, either in RLEC-CM and control DCs. This level of infection remained stable between day 1 and day 3 suggesting their intracellular survival (Fig. 3B and 3C). The viability of infected DCs was preserved as shown by staining with the marker of cell viability 7AAD (Fig. 3D). In addition, the infection of immature DCs did not induce the CD83 maturation marker expression (Fig. 3E). By contrast, LPS and IFN γ maturation stimuli induced CD83 expression in non-infected as well as in infected RLEC-CM and control DCs (Fig. 3E). Of note that the use of CFSE-labelled parasites evidenced that the up-regulation of CD83 was similar in the infected cell and non infected cell populations (Fig. 3E). Moreover, the immunophenotype (CD16, CD14, CD123, DC-SIGN, CD40, CD86 and HLA-DR) of infected mature RLEC-CM and control

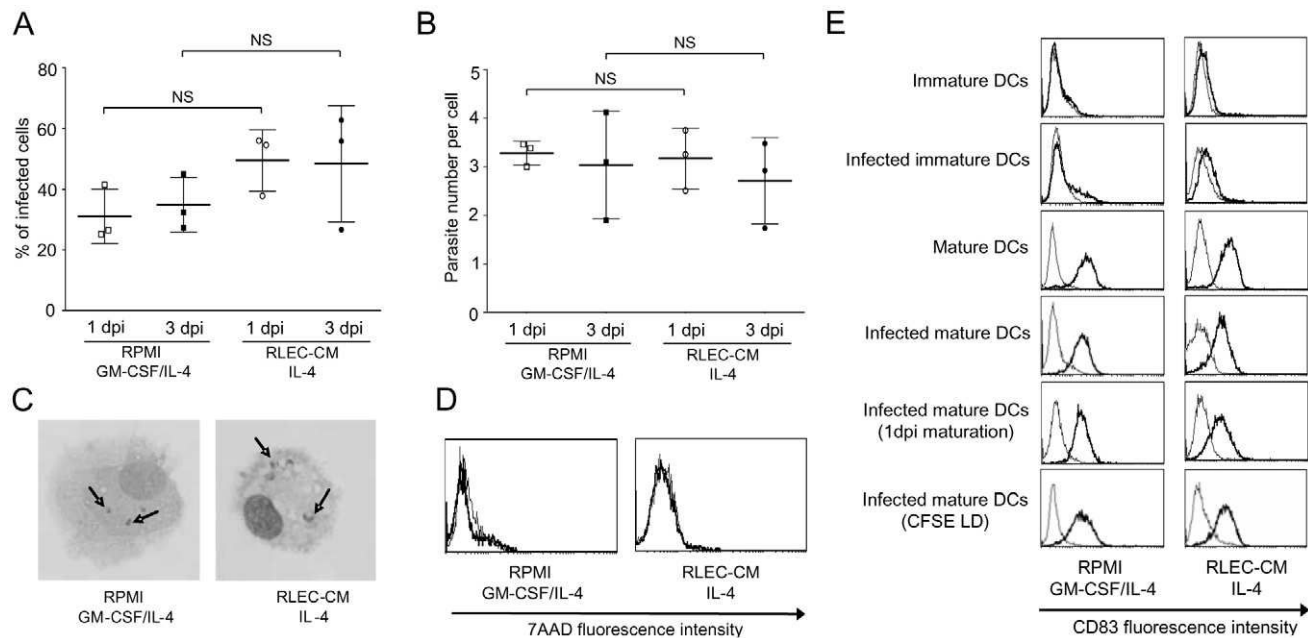


Figure 3. Infection of RLEC-CM and control DCs by *L. donovani*. Monocytes were cultured in RPMI or RLEC-CM with the indicated cytokine combinations. On day 5, DCs were harvested and recultured (5×10^5 cells/ml) for 2 days in the presence of IFN γ (1000 IU/ml) plus LPS (1 μ g/ml) with or without *L. donovani* parasites (10:1). **A/B.** Percentage of infected cells and parasite number per infected cell: one and three day post-infection (dpi) cells were analysed on May-Grünwald-Giemsa-stained cytopspins. Data are the percentage of infected cell number/total cell number and the parasite number per infected cells; data are mean \pm SD from three experiments; 250 cells were counted per experiment; NS = not significant difference. **C.** Photographs of May-Grünwald-Giemsa-stained cytopspins (arrows indicate intracellular parasites). **D.** Cell viability: cells were stained with 7AAD (thick line histograms) or unstained (thin line histograms). Results for a single representative donor out of three donors are shown. **E.** CD83 expression: cells were stained with anti-CD83 antibody (thick line histograms) or isotype control (thin line histograms). In some experiments, maturation was performed one day post-infection (1 dpi maturation). When CFSE-stained *L. donovani* promastigotes (CFSE LD) were used, analysis of CD83 expression was realized on CFSE-positive cells.

doi:10.1371/journal.pntd.0000703.g003

DCs was similar to the non-infected mature cell phenotype (data not shown).

L. donovani infection modifies the cytokine secretion profile of mature RLEC-CM DCs

IL-10 and IL-12p70 secretion was measured in culture supernatants of 7-day-old infected mature RLEC-CM and control DCs. *L. donovani* infection did not modify control DC secretion of IL-10 (Fig. 4A). Conversely, infection of RLEC-CM DCs induced a statistically significant up-regulation of IL-10 secretion ($p < 0.01$). IL-12p70 secretion was markedly higher in non-infected mature control DC supernatants than in non-infected RLEC-CM-differentiated DC supernatants. Infection of both RLEC-CM and control DCs by *L. donovani* resulted in significant decreased IL-12p70 levels ($p < 0.05$) (Fig. 4A). IL-12 intracellular staining of DCs infected with CFSE-labelled parasites or excreted-secreted antigens from parasites evidenced that secretion ability was similarly reduced in infected and non-infected cell populations (Fig. 4B).

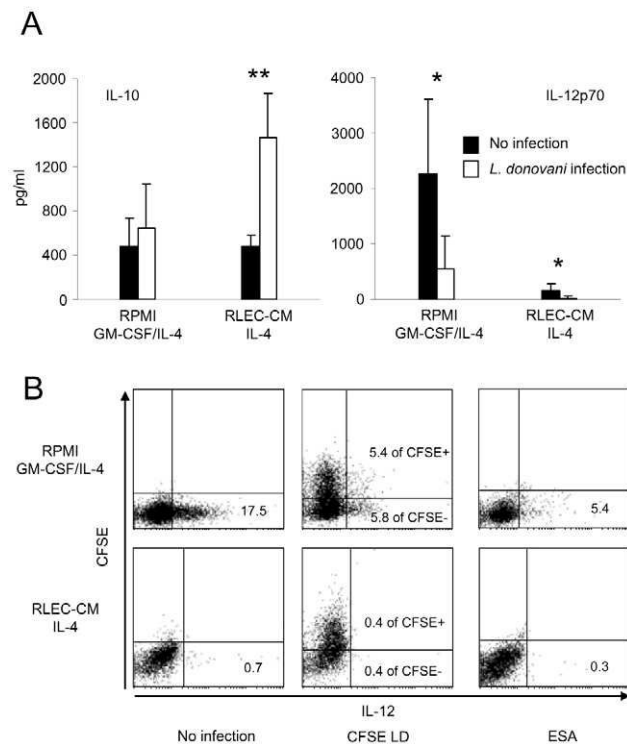


Figure 4. Cytokine secretion profile of DCs after *L. donovani* infection. Monocytes were cultured in RPMI medium or RLEC-CM with the indicated cytokine combinations. On day 5, DCs were harvested and recultured (5×10^5 cells/mL) for 2 days with IFN γ (1000 IU/mL) plus LPS (1 μ g/mL). **A.** *L. donovani* infection was carried out at a ratio of 10:1 (parasites:DCs). Secretion of IL-10 and IL-12p70 was measured in the culture supernatant by ELISA after 48 h. Results are expressed as the mean \pm SD of at least three experiments. When indicated, the mean value was statistically significant compared to non infected DCs (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). **B.** Infection was carried out with CFSE-labelled parasites or excreted-secreted antigens (ESA) from *L. donovani*. Intracellular staining of IL-12 was evaluated by flow cytometry analysis. Percentage of IL-12 positive-cells among the whole cell population or among infected cells (CFSE+) and non infected cells (CFSE-) is indicated on the cytograms.

doi:10.1371/journal.pntd.0000703.g004

L. donovani infection restores the allostimulating capacity of mature RLEC-CM DCs

MLRs were carried out in order to determine the impact of *L. donovani* infection on the capacity of RLEC-CM and control DCs to stimulate allogeneic T lymphocyte proliferation and cytokine secretion. *L. donovani* infection of control DCs did not modify allogeneic lymphocyte proliferation (Fig. 5A). In contrast, infection of mature RLEC-CM DCs significantly restored their capacity to activate allogeneic lymphocyte proliferation ($p < 0.05$). Regarding the cytokine secretion, lymphocytes primed with mature RLEC-CM DCs, and subsequently restimulated with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs, secreted significantly less IFN γ than those primed with control DCs ($p < 0.05$) (Fig. 5B). The IFN γ /IL-10 and IFN γ /IL-4 ratios from RLEC-CM DCs were lower than those of control DCs (9 vs. 26 and 96 vs. 307, respectively). Interestingly, lymphocytes stimulated with mature *L. donovani* infected RLEC-CM DCs, as well as with mature infected control DCs, secreted significantly higher amounts of IFN γ compared to non-infected DCs ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) (Fig. 5B).

Discussion

The hepatic DC response to hepatotropic pathogens is still poorly understood probably because only limited models of hepatic DCs are available [18]. Human liver DCs have been isolated and identified in cells eluted from donor livers prior to transplantation [28] and in freshly purified cells from thin pieces of liver [27,30]. Analyses of such *ex vivo* hepatic DCs revealed a semi-mature phenotype [28] and expression of membrane markers commonly associated with other lineages such as CD14 and CD123 [27]. These liver DCs induced less alloproliferation and promoted T cell hyporesponsiveness [30]. *In vitro* hepatic models were also recently developed to generate human monocyte-derived DCs in co-culture with either RLECs [29] or mouse liver fibroblastic stromal cells [21]. *Ex vivo* and *in vitro* co-cultured hepatic DCs failed to synthesize IL-12p70 and promoted a Th2 immune response orientation [18,21,27,29,30]. All together, these results suggest that liver DCs have tolerogenic properties and put into question the impact of such characteristics on the antimicrobial response.

Due to the presence of feeder cells [21,29] or a relatively low purification levels [26], these models are not designed for infection protocols. Cabillic *et al.* [29] suggested that hepatic characteristics of DCs could be related to soluble molecules such as cytokines and growth factors produced by the local environment. We then developed a model of human monocyte-derived DCs in a hepatic microenvironment without feeder cells using conditioned medium from either hNPCs and RLEC. Here, we showed that DCs generated in both hepatic cell-conditioned media share features with control DCs, including typical morphology and expression of DC-SIGN as well as over-expression of MHC II (HLA-DR) and co-stimulation molecules (CD40, CD86), compared to monocytes. DCs differentiated in hNPC- and RLEC-CM display a similar immunophenotype defined as a CD14+/CD123+ DC subset, in accordance with previous studies using other experimental models [27,29,33]. Furthermore, we showed that CD123 expression was increased during maturation of these cells and that they also expressed CD16. Mature control DCs secreted IL-10 and IL-12p70 and activated allogeneic lymphocyte proliferation. Contrastingly, DCs differentiated in both hepatic microenvironments secreted very low amounts of IL-12p70, were poor inducers of lymphocyte proliferation, as described *ex vivo* by Goddard *et al.* [27]. In accordance with *ex vivo* [27,30,34,35] and *in vitro* [21,29] studies, our results confirm that liver constitutes a specific micro-

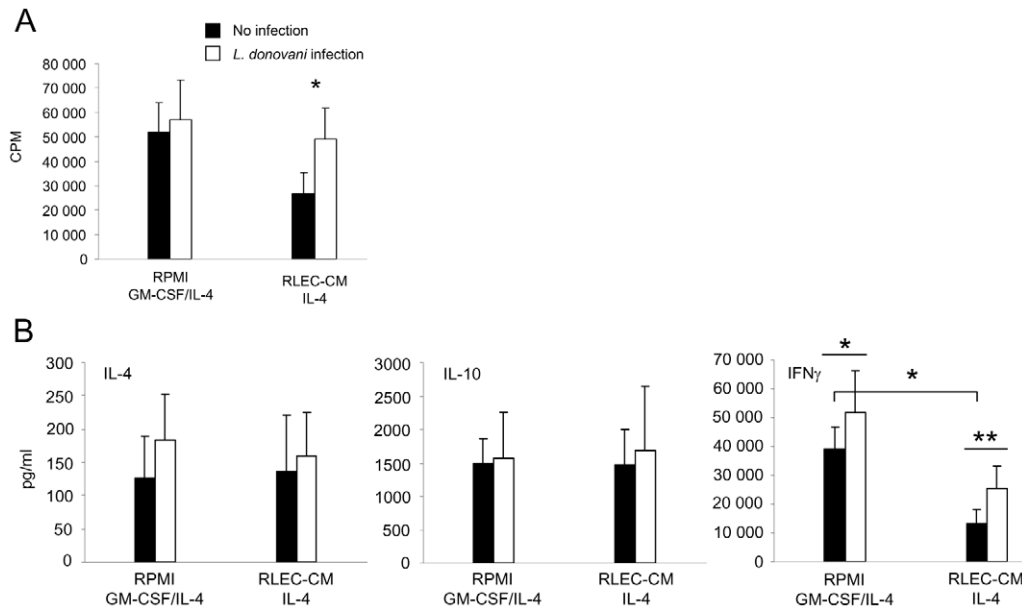


Figure 5. Proliferation and cytokine secretion of allogeneic lymphocytes stimulated with DCs after *L. donovani* infection. DCs were differentiated and matured (IFN γ /LPS) in RPMI medium in the presence of GM-CSF and IL-4, or in RLEC-CM with IL-4. Five-day-old DCs were infected or not with *L. donovani* (10:1). Allogeneic lymphocytes (1×10^5) were co-cultured with 7-day-old mature infected or non-infected DCs (5×10^3). **A.** Lymphocyte proliferation was measured on day 6 after a 16 h pulse with [3 H]-methylthymidine (1 μ Ci/well). **B.** Lymphocytes were collected after 6 days of stimulation, washed and restimulated for 48 h with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs. Supernatants were harvested and analysed by ELISA for IL-4, IL-10 and IFN γ secretion. Results are expressed as the mean \pm SD and represent at least three experiments. When indicated, the mean value is statistically significant compared to non-infected DCs (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). doi:10.1371/journal.pntd.0000703.g005

environment which contributes to the tolerogenic properties of DCs.

We then analysed the molecular response of this DC subset to parasitic infection. Because primary human hNPCs were isolated from human liver biopsies, it was easier to use an *in vitro* model with RLEC-CM for infection protocols. We selected the hepatotropic protozoan *L. donovani* and examined the impact of an hepatic microenvironment on DC response to infection. Whereas recent studies with dermatropic *Leishmania* strains highlighted the importance of a dermal cytokine microenvironment for initiation of a local inflammatory response [36], no data are available concerning the liver, one of the main target organ during VL. Here we showed that *L. donovani* infection did not induce the maturation of DCs when infecting either immature DCs differentiated in control medium or in RLEC-CM. Indeed, we neither observed CD83 expression nor over-expression of costimulatory molecules CD40 and CD86 or HLA-DR, and there was no induction of IL-12p70 secretion (data not shown). Our results are in agreement with those obtained with *L. mexicana* and *L. amazonensis* suggesting that the promastigote surface is devoid of DC-activating signals and that DCs infected with stationary-phase promastigotes remain phenotypically immature [8,13]. In addition, we showed that *L. donovani* parasite did not further inhibit the maturation process of infected DCs (i.e., over-expression of costimulatory molecules and MHC II, expression of CD83 and morphological modifications). However, in contrast with the findings from McDowell *et al.* [11], we observed a strong inhibition of IL-12p70 secretion during infection of mature RLEC-CM and control DCs.

In our experimental model, *L. donovani* infection increased the IL-10 secretion of DCs differentiated in RLEC-CM. Thus, infected hepatic DCs may be partly responsible for the high serum IL-10 levels observed in patients with active VL [37,38].

Furthermore, *L. donovani* infection of DCs differentiated in RLEC-CM restored their impaired capacity to stimulate allogeneic lymphocyte proliferation and up-regulated lymphocyte IFN γ secretion. A similar simultaneous co-expression of IL-10 and IFN γ is detected in the serum of acute VL patients [37,38]. Furthermore, a *Leishmania*-specific subtype of CD4+ lymphocytes from individuals cured of VL has even been described as IFN γ + / IL-10+ [39]. In this context, Amprey *et al.* [40] have described a liver-specific secretion of IFN γ a few hours after *Leishmania* infection. This secretion was independent of IL-12p70 and was suggested to be produced by a subset of NKT cells.

In the liver, parasites are phagocytosed by K \ddot{u} pfper cells and DCs. Infected cells secrete cytokines and recruit lymphocyte subpopulations in order to create a granuloma. A well-formed mature granuloma is an antigen-specific immune response mediated by mononuclear cells. Such mature granuloma presents a delayed appearance but a long-term persistence. During human VL, mature hepatic granulomas commonly correlate with infection control and clinical latency [41]. Cytokines such as IFN γ and TNF α are involved in the activation of immunocompetent cells and account for the final microbicidal response [1,41]. However, variable responses can be observed, depending on the host's genetic and immunological environment. Using a non-infected model of IL-1 receptor antagonist-deficient mice, impaired DC maturation associated with IL-10 secretion was shown to exacerbate granuloma formation in murine liver [42]. Moreover, the transfer of liver DCs loaded with an antigen to the portal vein of mice was shown to induce a Th2 orientation of immune response [43]. During *Schistosoma mansoni*/*L. donovani* co-infection, Hassan *et al.* [44] similarly demonstrated that mature hepatic granuloma formation was favoured by the Th2 cytokine environment induced by *S. mansoni* infection. All together, an efficient granuloma response in a Th2 environment may

contribute to control of infection. Hepatic DCs may then represent a major cell subtype involved in the induction and maintenance of such Th2 environment. This newly described *in situ* activation of the liver immune response might represent a complementary phenomenon with the model proposed by Engwerda *et al.* [45,46], in which lymphocytes are primed in the spleen, where IL-12p70 production is important, and then migrate to the liver. Our data show that *L. donovani* infection of DCs within a hepatic environment restores their ability to induce allogeneic lymphocyte proliferation and IFN γ secretion. Such results suggest the existence of an intrinsic liver activation pathway that could contribute to granuloma formation, in addition to the spleen-mediated activation way described previously.

References

- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561–1577.
- Dedet JP (2000) [Leishmaniasis: update]. *Presse Med* 29: 1019–1026.
- Antoine JC, Prina E, Courret N, Lang T (2004) *Leishmania* spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. *Adv Parasitol* 58: 1–68.
- Woelbing F, Kostka SL, Moelle K, Belkaid Y, Sunderkoetter C, *et al.* (2006) Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fc γ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med* 203: 177–188.
- Caparros E, Serrano D, Puig-Kroger A, Riol L, Lasala F, *et al.* (2005) Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in *Leishmania* interaction with host phagocytes. *Immunobiology* 210: 185–193.
- Colmenares M, Corbi AL, Turco SJ, Rivas L (2004) The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. *J Immunol* 172: 1186–1190.
- Amprey JL, Spath GF, Porcelli SA (2004) Inhibition of CD1 expression in human dendritic cells during intracellular infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 72: 589–592.
- Bennett CL, Misslitz A, Colledge L, Aebischer T, Blackburn CC (2001) Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Eur J Immunol* 31: 876–883.
- Ghosh M, Bandyopadhyay S (2004) Interaction of *Leishmania* parasites with dendritic cells and its functional consequences. *Immunobiology* 209: 173–177.
- Konecny P, Stagg AJ, Jebbari H, English N, Davidson RN, *et al.* (1999) Murine dendritic cells internalize *Leishmania major* promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary T cell proliferation *in vitro*. *Eur J Immunol* 29: 1803–1811.
- McDowell MA, Marovich M, Lira R, Braun M, Sacks D (2002) *Leishmania* priming of human dendritic cells for CD40 ligand-induced interleukin-12p70 secretion is strain and species dependent. *Infect Immun* 70: 3994–4001.
- Moll H, Scharner A, Kampgen E (2002) Increased interleukin 4 (IL-4) receptor expression and IL-4-induced decrease in IL-12 production by Langerhans cells infected with *Leishmania major*. *Infect Immun* 70: 1627–1630.
- Prina E, Abdi SZ, Lebastard M, Perret E, Winter N, *et al.* (2004) Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J Cell Sci* 117: 315–325.
- Quinones M, Ahuja SK, Melby PC, Pate L, Reddick RL, *et al.* (2000) Preformed membrane-associated stores of interleukin (IL)-12 are a previously unrecognized source of bioactive IL-12 that is mobilized within minutes of contact with an intracellular parasite. *J Exp Med* 192: 507–516.
- von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC (1998) Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med* 188: 1547–1552.
- Bertolino P (2008) Impaired function of dendritic cells translocating the liver sinusoids: a veto effect contributing to intrahepatic tolerance? *Eur J Immunol* 38: 938–941.
- Bowen DG, McCaughan GW, Bertolino P (2005) Intrahepatic immunity: a tale of two sites? *Trends Immunol* 26: 512–517.
- Crispe IN, Giannandrea M, Klein I, John B, Sampson B, *et al.* (2006) Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance. *Immunol Rev* 213: 101–118.
- Hsu W, Shu SA, Gershwin E, Lian ZX (2007) The current immune function of hepatic dendritic cells. *Cell Mol Immunol* 4: 321–328.
- Parker GA, Picut CA (2005) Liver immunobiology. *Toxicol Pathol* 33: 52–62.
- Xia S, Guo Z, Xu X, Yi H, Wang Q, *et al.* (2008) Hepatic microenvironment programs hematopoietic progenitor differentiation into regulatory dendritic cells, maintaining liver tolerance. *Blood* 112: 3175–3185.
- You Q, Cheng L, Kedl RM, Ju C (2008) Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology* 48: 978–990.
- Calne RY (1976) Mechanisms in the acceptance of organ grafts. *Br Med Bull* 32: 107–112.
- Calne RY, Sells RA, Pena JR, Davis DR, Millard PR, *et al.* (1969) Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 223: 472–476.

Acknowledgments

We thank Newmed Publishing Services for editing the manuscript, Michel Samson for helpful scientific discussions, Pascale Daniel and Cécile Thomas de La Pintièrre for technical assistance. Flow cytometry analyses were performed thanks to the flow cytometry platform from IFR140, University of Rennes 1.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LD FC AC CGG CG JPG. Performed the experiments: LD FC AC OR OT JPG. Analyzed the data: LD FC AC CGG CG JPG. Contributed reagents/materials/analysis tools: LD FC AC JPG. Wrote the paper: LD FC AC CGG CG JPG.

- Opelz G, Wujciak T, Dohler B, Scherer S, Mytilineos J (1999) HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev Immunogenet* 1: 334–342.
- Wu W, Zheng N, Wang Y, Fung JJ, Lu L, *et al.* (2006) Immune regulatory activity of liver-derived dendritic cells generated *in vivo*. *Microsurgery* 26: 17–20.
- Goddard S, Youster J, Morgan E, Adams DH (2004) Interleukin-10 secretion differentiates dendritic cells from human liver and skin. *Am J Pathol* 164: 511–519.
- Bosma BM, Metselaar HJ, Mancham S, Boor PP, Kusters JG, *et al.* (2006) Characterization of human liver dendritic cells in liver grafts and perfusates. *Liver Transpl* 12: 384–393.
- Cabillic F, Rougier N, Basset C, Lecouillard I, Quelvennec E, *et al.* (2006) Hepatic environment elicits monocyte differentiation into a dendritic cell subset directing Th2 response. *J Hepatol* 44: 552–559.
- Bamboot ZM, Stableford JA, Plitas G, Burt BM, Nguyen HM, *et al.* (2009) Human liver dendritic cells promote T cell hyporesponsiveness. *J Immunol* 182: 1901–1911.
- Williams GM, Weisburger EK, Weisburger JH (1971) Isolation and long-term cell culture of epithelial-like cells from rat liver. *Exp Cell Res* 69: 106–112.
- Guguen-Guillouzo C, Bourel M, Guillouzo A (1986) Human hepatocyte cultures. *Prog Liver Dis* 8: 33–50.
- Steptoe RJ TA (1999) Dendritic cells in liver, kidney, heart and pancreas. In: Lotze MT TA, ed. *Dendritic cells: biology and clinical applications*. New-York: Academic Press. pp 153–171.
- De Creus A, Abe M, Lau AH, Hackstein H, Raimondi G, *et al.* (2005) Low TLR4 expression by liver dendritic cells correlates with reduced capacity to activate allogeneic T cells in response to endotoxin. *J Immunol* 174: 2037–2045.
- Khanna A, Morelli AE, Zhong C, Takayama T, Lu L, *et al.* (2000) Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* 164: 1346–1354.
- Ritter U, Lechner A, Scharl K, Kiafard Z, Zwirner J, *et al.* (2008) TNF controls the infiltration of dendritic cells into the site of *Leishmania major* infection. *Med Microbiol Immunol* 197: 29–37.
- Karp CL, el-Safi SH, Wynn TA, Satti MM, Kordofani AM, *et al.* (1993) *In vivo* cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *J Clin Invest* 91: 1644–1648.
- Lagler H, Willheim M, Traummüller F, Wahl K, Winkler H, *et al.* (2003) Cellular profile of cytokine production in a patient with visceral leishmaniasis: gammadelta+ T cells express both type 1 cytokines and interleukin-10. *Scand J Immunol* 57: 291–295.
- Kemp K, Kemp M, Kharazmi A, Ismail A, Kurtzhals JA, *et al.* (1999) *Leishmania*-specific T cells expressing interferon-gamma (IFN-gamma) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 116: 500–504.
- Amprey JL, Im JS, Turco SJ, Murray HW, Ilarionov PA, *et al.* (2004) A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. *J Exp Med* 200: 895–904.
- Murray HW, Nathan CF (1999) Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med* 189: 741–746.
- Iizasa H, Yoneyama H, Mukaida N, Katakoka Y, Naito M, *et al.* (2005) Exacerbation of granuloma formation in IL-1 receptor antagonist-deficient mice with impaired dendritic cell maturation associated with Th2 cytokine production. *J Immunol* 174: 3273–3280.
- Watanabe T, Katsukura H, Chiba T, Kita T, Wakatsuki Y (2007) Periportal and sinusoidal liver dendritic cells suppressing T helper type 1-mediated hepatitis. *Gut* 56: 1445–1451.
- Hassan MF, Zhang Y, Engwerda CR, Kaye PM, Sharp H, *et al.* (2006) The *Schistosoma mansoni* hepatic egg granuloma provides a favorable microenvironment for sustained growth of *Leishmania donovani*. *Am J Pathol* 169: 943–953.
- Engwerda CR, Ato M, Kaye PM (2004) Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol* 20: 524–530.
- Engwerda CR, Kaye PM (2000) Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol Today* 21: 73–78.

Résumé

La leishmaniose viscérale est une maladie systémique mortelle en l'absence de traitement. Elle est due aux protozoaires *Leishmania donovani* et *L. infantum*, parasites des phagocytes mononucléés, capables d'envahir les organes lymphoïdes et le foie. Le contrôle de l'infection hépatique repose sur la mise en place d'une réponse granulomateuse efficace, promue par une réponse immunitaire Th1, dans un environnement tissulaire Th2. L'objectif de ce travail était l'étude du rôle d'une cytokine Th2 récemment décrite, l'IL-33, dans cette réponse hépatique complexe encore partiellement incomprise. Des dosages d'IL-33 sur des sérums de patients et la détection de cellules IL-33⁺ dans le foie d'un patient rennais ont placé l'IL-33 comme un biomarqueur possible de la maladie active. L'IL-33 étant exprimée dans les cellules étoilées du foie au cours d'hépatites chroniques, ces cellules ont été exposées à *L. donovani*. Leur permissivité aux leishmanies sans toxicité apparente ni perturbation de leurs propriétés fonctionnelles, ainsi que la persistance des leishmanies sur une culture de plusieurs semaines, nous ont conduit à proposer les cellules étoilées comme cellules sanctuaires possibles pour les leishmanies viscérotropes, contribuant donc potentiellement au portage asymptomatique. En revanche, elles ne sont pas apparues comme une source majeure d'IL-33 au cours de la leishmaniose viscérale. Chez des souris C57BL/6 et BALB/c infectées par *L. donovani*, l'IL-33 a été observée dans des cellules ne s'apparentant pas à des cellules étoilées, et principalement localisées dans les granulomes. Des cellules exprimant son récepteur ST2 ayant été également observées dans le foie, un rôle de l'axe IL-33/ST2 a été recherché. Les résultats obtenus chez des souris BALB/c déficientes en ST2 ou traitées par de l'IL-33 recombinante suggèrent que l'IL-33 régule négativement l'expression de cytokines Th1 (IL-12, IFN- γ) et l'infiltrat de neutrophiles et monocytes dans le foie, limitant ainsi le contrôle de la charge parasitaire. Ainsi, l'IL-33 semble être un facteur de susceptibilité pour la leishmaniose viscérale. En parallèle, des travaux entrepris sur des souris C57BL/6 infectées par *L. donovani* suggèrent de possibles rôles différentiels de l'IL-33 en fonction de l'environnement immunitaire inhérent au fond génétique de l'hôte.

Mots clés : IL-33, Leishmaniose Viscérale, Foie, Cellules étoilées hépatiques, Cytokines Th1, Chimiokines, Polynucléaires neutrophiles, Monocytes/Macrophages.

Abstract

Visceral leishmaniasis is a life-threatening systemic disease caused by *Leishmania* protozoans, *L. donovani* and *L. infantum*, which invade mononuclear phagocytes in the lymphoid organs and the liver. The control of the hepatic parasite burden depends on the granuloma formation, which is favored by a Th1 immune response in a Th2 tissue microenvironment. The aim of this work was to study the role of the recently described Th2 cytokine IL-33 in this complex immune response, which remains partially misunderstood. IL-33 dosages in different patient sera and IL-33⁺ cells detected in the liver of a patient from Rennes suggested that IL-33 could be a biomarker for active visceral leishmaniasis. As IL-33 was described in hepatic stellate cells during chronic hepatitis, these cells were exposed to *L. donovani* in primary culture. The cell permissivity to *L. donovani* and the parasite persistence during a long term culture led us to propose hepatic stellate cells as a new type of sanctuary cells, which could partially explain asymptomatic carriage. However, these cells were apparently not the main source of IL-33 during visceral leishmaniasis. In infected BALB/c and C57BL/6 mice, IL-33 was detected in the liver in non stellate cells preferentially localized in granulomas. The presence of cells expressing its specific receptor ST2 in the liver led us to explore the role of the IL-33/ST2 axis. BALB/c mice deficient in ST2 or treated with recombinant IL-33 and infected with *L. donovani* revealed that IL-33 downregulates the expression of Th1 key cytokines (IL-12, IFN- γ) and the recruitment of neutrophils and monocytes. Finally, IL-33 acts as a susceptibility factor during visceral leishmaniasis. Besides, the model of *L. donovani* infected C57BL/6 mice deficient in IL-33 or treated with recombinant IL-33 suggests possible differential roles of IL-33 depending on the immune environment related to the host genetic background.

Key words: IL-33, Visceral Leishmaniasis, Liver, Hepatic Stellate cells, Th1 cytokines, Chemokines, Polymorphonuclear neutrophils, Monocytes/Macrophages.