

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières .....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Avant-propos .....	xiii
1. Chapitre 1 : Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1.....	1
1.1 Mise en contexte : données actuelles et transmission .....	1
1.2 Structure, génome et protéines virales .....	2
1.3 Cycle répliatif.....	5
1.3.1 Évènements précoces.....	6
1.3.2 Évènements de biosynthèse .....	6
1.3.3 Évènements tardifs.....	8
1.4 Pathogénèse du VIH-1 .....	9
1.4.1 L'immunologie du VIH-1 .....	9
1.4.2 Phases de l'infection .....	12
1.5 Traitements.....	14
2. Chapitre II : Leishmania et la leishmaniose .....	17
2.1 Généralités sur <i>Leishmania</i> .....	17
2.2 Cycle de vie de <i>Leishmania</i> .....	18
2.2.1. Le stade promastigote .....	18
2.2.2. La métacyclogénèse.....	19
2.2.3. Le stade amastigote.....	20
2.3 Pathogénèse de <i>Leishmania</i> .....	22
2.4 Traitements.....	24

3. Chapitre III : Co-infection VIH-1 et <i>Leishmania</i> .....	27
4. Chapitre IV: Hypothèse et objectifs.....	29
4.1 Hypothèse de recherche.....	29
4.2 Objectifs de recherche .....	29
5. Chapitre V: <i>Leishmania infantum</i> active les lymphocytes B régulateurs .....	31
Résumé.....	31
<i>Leishmania infantum</i> amastigotes trigger human B cells with an immunoregulatory phenotype .....	32
Abstract .....	33
Introduction .....	34
Materials and methods .....	38
Results.....	42
Discussion .....	45
References .....	51
Figure legends .....	62
Figures.....	67
6. Chapitre VI : Matériel et méthodes supplémentaires.....	73
6.1 Culture de la lignée cellulaire 293T .....	73
6.2 Production virale par transfection de cellules 293T au phosphate de calcium.....	73
6.3 Quantification de la production et la réplication virale par ELISA p24.....	74
7. Chapitre VII: Résultats supplémentaires .....	75
8. Chapitre VIII : Discussion et perspective .....	77
9. Chapitre IX : Conclusions.....	87
Bibliographie.....	89

## Liste des tableaux

Tableau I : Les protéines du VIH-1 et leurs fonctions.....	5
Tableau II : Classification simplifiée du genre <i>Leishmania</i> .....	18

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Prévalence du VIH-1 en 2012 .....	2
<b>Figure 2</b> : Organisation génomique du VIH-1 .....	3
<b>Figure 3</b> : Structure du VIH-1 .....	3
<b>Figure 4</b> : Le cycle réplcatif du VIH-1 .....	9
<b>Figure 5</b> : Le cycle réplcatif de <i>Leishmania</i> .....	21
<b>Figure 6</b> : Mesure de la réplcation virale du VIH-1 .....	75



## Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique  
AICD: *Activation-induced cell death*  
APOBEC : *Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide*  
ARN : acide ribonucléique  
ARNm: acide ribonucléique messenger  
ARV: antirétroviraux  
Bregs : lymphocytes B régulateurs  
CA : protéine de la capside  
CFSE : *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*  
CMH-II : complexe majeur d'histocompatibilité de type II  
CR : *Complement receptor*  
DCIR : *Dendritic cell immunoreceptor*  
DC-SIGN : *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*  
EDTA : *Ethylenediaminetetraacetic acid*  
ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*  
Env : enveloppe  
FBS : *Fetal bovine serum*  
fPPG : protéophosphoglycan filamenteux  
Gag : *Group-specific antigen*  
GALT : *gut-associated lymphoid tissue*  
GP 63 : glycoprotéine de surface 63  
GPI : *glycosylphosphatidylinositol*  
HAART : *Highly active antiretroviral therapy*  
HRP : *Horseradish peroxidase*  
IFN- $\gamma$  : interféron gamma  
Ig : immunoglobuline  
IL : interleukine  
IN : intégrase virale  
LC : leishmaniose cutanée  
LV : leishmaniose viscérale  
LTR : *Long terminal repeat*  
MA : protéine de la matrice  
MAP Kinase : *Mitogen activated protein kinase*  
MDM : macrophage dérivé de monocyte  
NC : protéine de la nucléocapside  
Nef : *Negative factor*  
NF-AT : *Nuclear factor of activated T-cells*  
NF- $\kappa$ B : *Nuclear factor  $\kappa$ B*  
NIH : *National institutes of Health*  
NK : *Natural killer*  
OMS : organisation mondiale de la santé  
PBS : *Phosphate-buffered saline*  
PIC : *Pre-integration complex*  
Pol : polymérase

PR : protéase virale  
PSG : *Promastigote Secretory Gel*  
Rev : *Regulator of viral expression*  
RT : *Reverse transcriptase*  
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise  
Tat : *Transactivator of transcription*  
TAR : *HIV trans-activation response element*  
TCR : *T cell receptor*  
TGF- $\beta$  : *Transforming growth factor- $\beta$*   
Th : *T helper*  
TLR : *Toll-like receptor*  
TNF : *Tumor necrosis factor*  
Treg : lymphocyte T régulateur  
Vif : *Viral infectivity factor*  
VIH-1 : virus de l'immunodéficience humaine de type-1  
Vpr : *Viral protein R*  
Vpu : *Viral protein U*

## **Avant-propos**

### **Remerciements**

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche le Dr Michel J. Tremblay de m'avoir donné la chance de travailler au sein de son laboratoire. Grâce à lui, j'ai su développer de l'autonomie et un esprit critique qui m'ont permis de mener à bien mes projets de recherche.

J'aimerais également remercier mon co-directeur le Dr Dave Richard pour sa patience et pour son aide pour un autre de mes projets de recherche.

J'aimerais remercier tous les membres de mon équipe « LA MJTEAM ». Merci pour votre aide tout au long de ma maîtrise, votre bonne humeur et votre joie de vivre! J'ai vécu avec vous deux très belles années. Chacun de vous m'a aidée à sa manière.

Je remercie mon fiancé Zaki pour son soutien depuis notre première rencontre. Merci de m'encourager dans tout ce que j'entreprends; je suis choyée de t'avoir.

J'aimerais remercier mes parents, « mon petit papa » et « ma petite maman », qui sont mes modèles à moi. Merci pour votre soutien et votre amour. Je vous aime plus que tout.

Finalement, je voudrais remercier mon frère Rafik et mes deux sœurs Lynda et Lylia pour leur présence quotidienne à mes côtés. Je suis chanceuse de vous avoir et je vous aime très fort.

### **Contribution**

Tout au long de mes études de maîtrise, j'ai eu l'opportunité de travailler sur plusieurs projets de recherche dont celui présenté dans ce mémoire, qui a mené à la soumission de l'article : *Leishmania infantum amastigotes trigger human B cells with an immunoregulatory phenotype* dans la revue *Journal of Immunology*

Guadalupe Andreani\*, Rym Menasria\*, Alejandro Martin Gomez\*, Michel Ouellet\* and Michel J. Tremblay.

Dans cet article, j'ai participé à réalisation des expériences présentées dans les figures 1 et 2 et j'ai réalisé les expériences présentées dans les figures 6 et 7. Dans ce mémoire, je présente uniquement les résultats des expériences auxquelles j'ai contribué ou que j'ai réalisées moi-même.





## 1. Chapitre 1 : Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1

### 1.1 Mise en contexte : données actuelles et transmission

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est l'agent causal du SIDA (Syndrome de l'immunodéficience acquise). Il a été décrit pour la première fois en 1980 aux États-Unis lorsqu'un médecin a rencontré des patients homosexuels ayant un système immunitaire affaibli. Un an plus tard, d'autres cas de personnes immunodéprimées ont été observés un peu partout dans le monde et on nomma alors le virus HTLV-III (*Human T-lymphotropic retrovirus type III*) ou encore LAV (*Lymphadenopathy associated virus*) [4, 5].

Le SIDA a fait plus de 25 millions de victimes depuis sa découverte. Cette maladie se traduit par un affaiblissement du système immunitaire dû à la perte des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. De ce fait, les personnes infectées par le virus sont souvent victimes d'infections opportunistes qui peuvent être fatales en absence de traitement.

Selon les dernières données publiées par ONUSIDA en 2013, 35,3 millions de personnes sont présentement infectées par le VIH. On a dénombré près de 2,3 millions de nouvelles infections en 2012 et près de 1,6 millions de décès liés au VIH-1. Il s'agit des chiffres annuels les plus bas jamais enregistrés, prouvant ainsi que tous les travaux de recherche effectués et l'accès amélioré aux médicaments dans les pays en développement ont grandement contribué à atteindre ces chiffres. En effet, le traitement antirétroviral est passé de US\$ 100 000 par année pour une personne à US\$ 140 dans quelques pays à revenu faible [6].

L'Afrique reste le continent le plus touché par le SIDA et l'Afrique subsaharienne représente à elle seule plus de la moitié des cas d'infection avec 23,5 millions de personnes infectées (figure 1).

Le VIH-1 est transmis principalement lors de rapports sexuels non protégés avec des partenaires infectés. La contamination a lieu lors du transfert de cellules infectées entre les partenaires, le virus sous forme libre étant moins souvent impliqué.

Le virus peut également être transmis par contact avec d'autres liquides biologiques contaminés, comme le lait maternel et le sang. Ce risque de transmission grandit lorsque la charge virale est élevée ou lorsque l'intégrité des muqueuses est compromise.

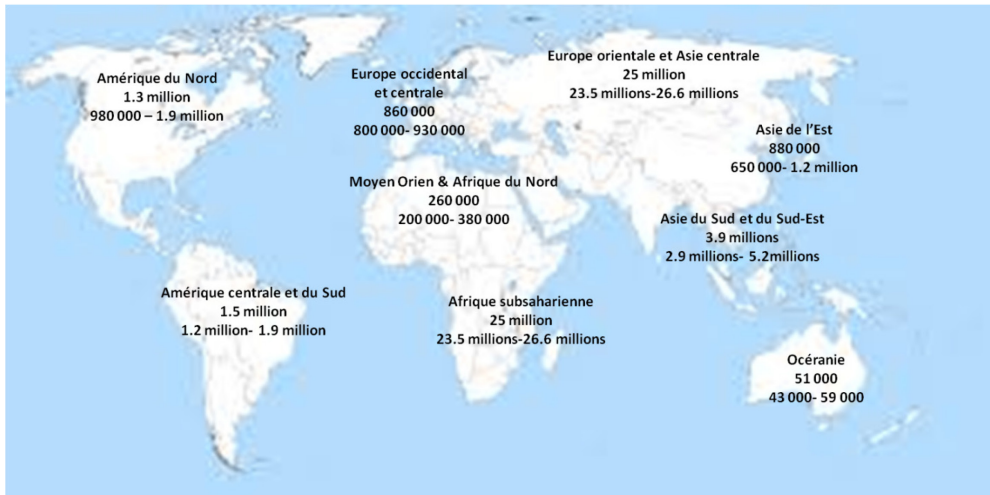


Figure 1 : Prévalence du VIH-1 en 2012 à travers le monde.

Figure modifiée à partir du *Résumé mondial de l'épidémie de sida en 2013*, ONUSIDA [1]

## 1.2 Structure, génome et protéines virales

Le VIH-1 est un lentivirus de la famille des *retroviridae* de 120 nm de diamètre. C'est un virus sphérique, enveloppé d'une bicouche phospholipidique provenant de la cellule hôte. Son génome, de 9 200 pb est composé d'ARN simple brin à polarité positive. Il contient 9 gènes (*tat*, *rev*, *pol*, *gag*, *nef*, *env*, *vpr*, *vif* et *vpu*) codant pour 15 protéines ainsi qu'une séquence non codante appelée LTR (*long terminal repeat*) contenant plusieurs signaux requis pour la régulation de la transcription, pour l'encapsidation du génome viral, un signal de polyadénylation ainsi que le promoteur du virus (figures 2 et 3).

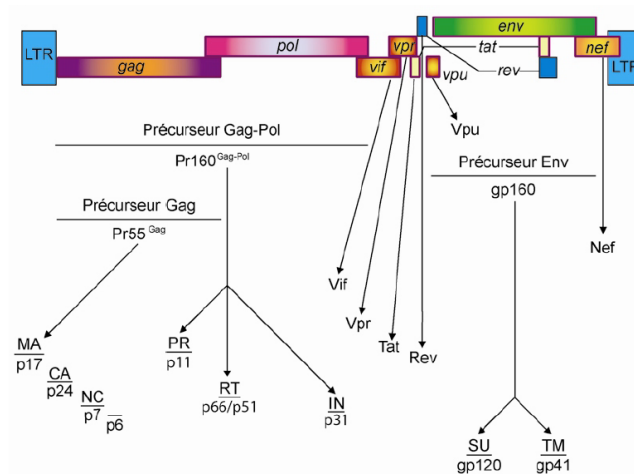


Figure 2 : Organisation génomique du VIH-1 [3].

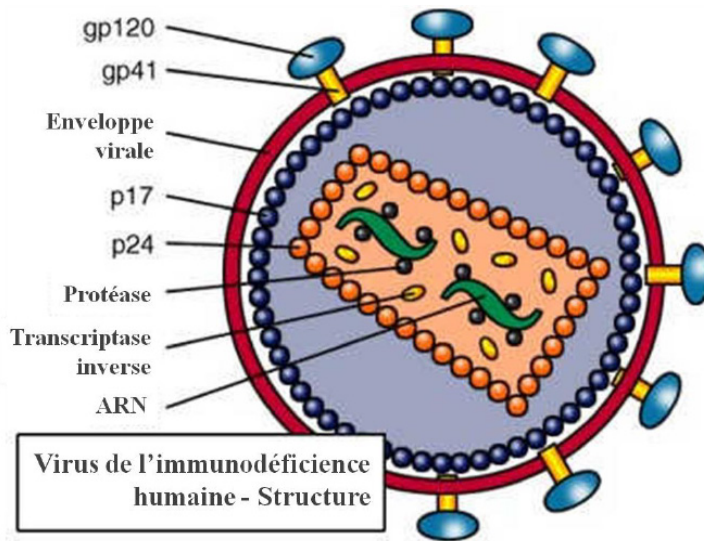


Figure 3 : Structure du VIH-1 [2].

Plusieurs protéines du virus sont synthétisées sous forme de précurseurs polyprotéiques pour former par la suite des protéines matures. Le gène *gag* (*group-specific antigen*) code pour la polyprotéine Pr55<sup>Gag</sup> qui forme les protéines structurales que sont la matrice (MA, p17), la capside (CA, p24), la nucléocapside (NC, p7) et la protéine p6 [7].

Le gène *pol* code pour le précurseur Pr160<sup>Gag-Pol</sup> qui forme, quant à lui, les protéines nécessaires à la réplication virale, à savoir la transcriptase inverse (*Reverse transcriptase*, RT), la polymérase (Pol) et l'intégrase (Int) [8]. Le gène *env* (enveloppe) code pour les glycoprotéines de l'enveloppe gp160, nommément la gp120 et la gp40 qui ont pour rôle l'attachement et la fusion de la particule virale avec la cellule hôte.

Les gènes *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu* codent pour des protéines accessoires portant le même nom et dont les fonctions sont de contribuer à l'augmentation de la réplication virale, d'augmenter l'infectivité du virion, de transporter l'ADN et de favoriser le bourgeonnement du virus (Tableau 1).

Finalement, les gènes *tat* et *rev* codent respectivement pour les protéines Tat (*Transactivator of transcription*) et Rev (*Regulator of viral expression*) qui exercent des fonctions de régulation génique essentielles à la réplication virale.

Tableau I : Protéines du VIH-1 et leurs fonctions

Protéines virales	Fonctions
p24	Protéine de la capside, fonction structurale
p17	Protéine de la matrice, fonction structurale
p7	Protéine de la nucléocapside, régule la condensation et l'encapsidation du génome viral
p6	Régulation du bourgeonnement
Transcriptase inverse	Production d'ADN double-brin à partir du génome viral
Intégrase	Intégration de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire
Protéase	Clivage des précurseurs Pr55 <sup>Gag</sup> et Pr160 <sup>Gag-Pol</sup> pour la maturation du virion
gp120	Attachement du virus
gp41	Fusion du virus avec la membrane cellulaire
Tat	Régulateur positif de la transcription
Rev	Export des ARNm non épissés ou mono-épissés
Nef	Régulation négative du CD4 et du CMH-I de la surface cellulaire, augmentation de l'infectivité virale
Vpu	Agit contre le facteur de restriction Téthérine
Vif	Agit contre le facteur de restriction APOBEC3G
Vpr	Import nucléaire du complexe de pré-intégration, arrêt du cycle cellulaire en G1

### 1.3 Cycle répliatif

N'ayant pas le bagage génétique nécessaire à la transcription et la réplication de son génome, le VIH-1 utilise la machinerie cellulaire de la cellule infectée pour mener à bien son cycle répliatif (figure 4). Les étapes de ce cycle peuvent être regroupées en trois sections, soient les évènements précoces, les évènements de biosynthèse et les évènements tardifs.

### 1.3.1 Évènements précoces

Le cycle répliatif du VIH-1 commence avec l'attachement de ses glycoprotéines à des récepteurs de la cellule cible. En effet, la gp120 transmembranaire de 120 kilodaltons, possède cinq régions variables (V1 à V5) [9], résultant de la grande capacité du VIH-1 à muter et cinq régions constantes (C1 à C5). Cette glycoprotéine va se lier à son récepteur primaire, le CD4, un membre de la superfamille des immunoglobulines (Ig) [10]. Ce récepteur est présent à la surface des lymphocytes T auxiliaires, des macrophages, des monocytes et des cellules dendritiques et il possède un domaine intracytoplasmique et quatre domaines extracellulaires (D1 à D4). Ainsi, la liaison du gp120 au récepteur CD4 provoque un changement conformationnel exposant la région V3 [11]. Cette dernière va se lier, à son tour, à un corécepteur de la famille des récepteurs de chimiokines CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*) [12, 13] pour les virus de tropisme X4 ou CCR5 (*C-C chemokine receptor type 5*) [14, 15] pour les virus de tropisme R5 [16-18].

Cette liaison au corécepteur permet alors au gp41 de faire un changement de conformation lui permettant d'insérer son peptide de fusion dans la membrane cellulaire. Finalement, la gp41 effectue un dernier changement conformationnel pour former une structure en épingle qui rapproche encore plus les membranes jusqu'à leur fusion. La capsid virale est alors libérée dans le cytoplasme.

### 1.3.2 Évènements de biosynthèse

Le phénomène de la décapsidation de la particule virale demeure encore sujet à débat quant à l'endroit et au moment précis où elle se produit. Ainsi, peu après sa libération dans le cytoplasme, la capsid serait au moins partiellement décapsidée et permettrait la formation du complexe de transcription inverse (RTC, *Reverse transcription complex*). Ce complexe comprend un ARN de transfert Lys 3 provenant de la cellule hôte et lié à l'ARN viral, les protéines virales (MA, CA, NC, RT, PR, Vpr, Vif et Nef) ainsi que des protéines provenant de la cellule [16].

Pour que le génome viral puisse s'intégrer au génome cellulaire, il doit être converti en ADN double brin. Cette tâche est assurée par la transcriptase inverse qui se sert de l'ARN<sup>Lys3</sup> comme amorce et produit ainsi un ADN viral double brin flanqué par de

longues séquences terminales répétées (Long Terminal Repeat; LTR) faisant office de promoteur.

La transcriptase inverse, ne possédant pas d'activité exonucléase 3'-5', est à la base des nombreuses mutations que l'on retrouve dans le génome viral. En effet, cette protéine virale introduit environ 3 à 4 mutations par ronde de réplication [19, 20], permettant ainsi au VIH-1 d'échapper au système immunitaire et de résister à la thérapie antirétrovirale.

Une fois le génome viral sous forme d'ADN double brin, le complexe de pré-intégration (PIC, *preintegration complex*) se forme [21]. Les composantes de ce complexe restent un sujet à débat, mais les auteurs s'entendent pour dire que la protéine IN serait présente, alors que la CA serait absente.

Le PIC est alors transporté jusqu'aux pores nucléaire à l'aide des microtubules cellulaires [16] et accède au noyau grâce aux importines. Ces dernières sont des protéines qui se lient à des signaux de localisation nucléaire (*Nuclear localization signal*) présents sur la MA, l'IN, le Vpr et sur la l'ADN viral [21].

Une fois à l'intérieur du noyau, l'IN entre en jeu en catalysant l'intégration du génome viral au génome cellulaire [22]. Il est intéressant de mentionner que le VIH s'intègre préférentiellement dans des régions hautement transcriptionnelles, ce qui favoriserait la transcription de son propre génome [23].

C'est à ce moment que la transcription, initiée par l'ARN polymérase cellulaire de type II, débute, donnant naissance à des ARN génomiques complets ou à des ARN messagers épissés (ARNm) qui seront par la suite traduits pour former les protéines du virion (structurales ou régulatrices).

Tat, Rev et Nef sont des protéines régulatrices provenant d'ARNm entièrement épissés et sont les premières à être produites [24]. Tat se lie à une séquence nommée TAR (*Trans-activation response element*) présente sur l'extrémité 5' des ARNm viraux. Cette liaison permet d'augmenter la capacité d'élongation de l'ARN polymérase. Rev, quant à elle, est responsable du transport au cytoplasme des ARNm, partiellement ou non épissés, pour la production des protéines structurales et pour celles nécessaires à la réplication du virion.

Finalement, Nef régule l'expression de molécules de surface, tel le récepteur CD4, de la cellule en faveur du virus.

### 1.3.3 Évènements tardifs

Les évènements tardifs à savoir l'assemblage, le bourgeonnement et la maturation du virion ont lieu lorsqu'il y a une accumulation des protéines virales nouvellement synthétisées. L'assemblage a lieu au niveau de la membrane plasmique dans les radeaux lipidiques [25], grâce aux signaux contenus dans le domaine N-terminal myristoylé de la MA et dans Pr160<sup>Gag-Pol</sup>. Pour l'ARN viral, le recrutement à la membrane se fait grâce au motif en doigt de zinc présent sur le domaine NC ainsi qu'à la structure secondaire du signal d'encapsidation  $\Psi$  [26].

Une fois l'assemblage terminé, la particule virale est libérée par bourgeonnement. Lors de cette étape, le virus acquiert une partie de la membrane de la cellule hôte ainsi que les molécules de surface qui s'y trouvent [27]. C'est là aussi que la gp120 et la gp41 sont insérées à la membrane. Les particules virales alors libérées sont sphériques et immatures; la protéase procède ensuite au clivage de Pr55<sup>Gag</sup> et de Pr160<sup>Gag-Pol</sup>, la capsid se condense et devient conique. À ce stade, le virus est pleinement infectieux [28].



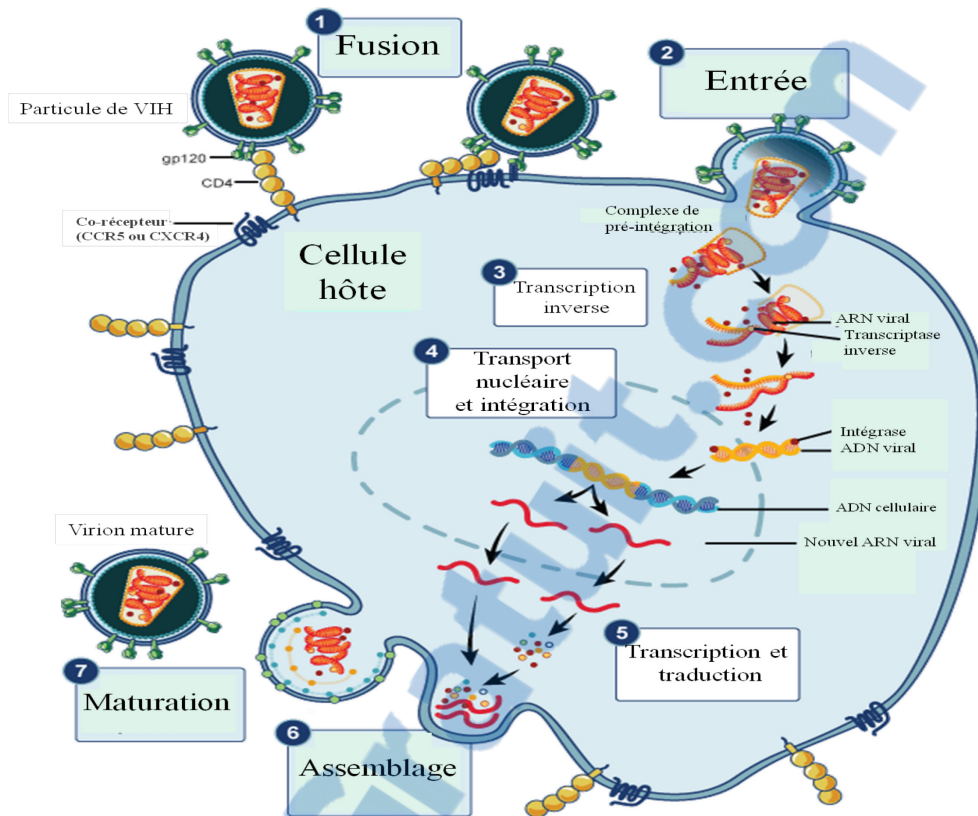


Figure 4 : Le cycle répliatif du VIH-1 [2].

1. Le VIH-1 lie son récepteur et son corécepteur pour fusionner avec la cellule cible. 2. La capside virale et les protéines nécessaires à la réplication virale sont libérées dans le cytoplasme. 3. La transcriptase inverse convertit l'ARN en ADNc. 4. Le génome viral est transporté jusqu'au noyau pour s'intégrer au génome de la cellule cible. 5. L'ADN viral est transcrit puis traduit pour former les protéines du virus. 6. Les protéines virales sont transportées au niveau de la membrane plasmique où le virus va s'assembler puis bourgeonner. 7. Une étape de maturation est nécessaire pour que le virus acquière son infectivité.

## 1.4 Pathogénèse du VIH-1

### 1.4.1 L'immunologie du VIH-1

Tel que mentionné précédemment, le virus de l'immunodéficience humaine a pour principale cible les cellules exprimant le récepteur CD4 et un des deux corécepteurs, le CCR5 ou le CXCR4, déterminant ainsi le tropisme du virus. Cependant, plusieurs autres

types cellulaires sont impliqués dans sa pathogénèse. Certains favorisent la réplication du virus, d'autres sa propagation et sa persistance. La partie qui suit va traiter des principales cellules cibles du virus, ainsi que des types cellulaires utilisés dans mon projet de recherche.

#### **1.4.1.1 Les Lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (LyT CD4<sup>+</sup>) sont les principales cellules cibles du VIH-1. Ces cellules expriment un TCR (*T cell receptor*) nécessaire à la reconnaissance d'antigènes présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (APC), grâce à leurs molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> participent à la réponse immunitaire adaptative et sont dits auxiliaires (*helper*). Ils peuvent être divisés en plusieurs sous-groupes (Th1, Th2, Th17; ou T suppresseurs (*regulatory T* (Treg)), dépendamment de l'environnement cytokinique [29, 30].

Le VIH-1 infecte préférentiellement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés, causant par le fait même leur déplétion. Toutefois, cette dernière peut aussi être causée par d'autres facteurs tels que la destruction des lymphocytes infectés par les cellules T CD8<sup>+</sup>, la perte des cellules non infectées avoisinantes (*bystander cells*) par apoptose, la formation de syncytia induite par l'infection, ainsi que les dysfonctionnements dans la voie de production des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> observés dans le thymus [31].

Le VIH peut également infecter les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents dans lesquels le virus reste sous forme latente, faisant de ces cellules un réservoir majeur pour l'infection. En effet, le virus peut infecter une cellule quiescente soit en gardant son génome non intégré (latence de pré-intégration) ou en intégrant son génome à celui de la cellule sans l'exprimer pour autant (latence de post-intégration). Cette deuxième forme de latence arrive lorsqu'une cellule activée revient vers un état quiescent pour devenir un lymphocyte T mémoire [32, 33].

Une récente étude a démontré que le sous-type le plus susceptible à l'infection par le VIH est celui des Th17. Ces cellules sont particulièrement abondantes dans la muqueuse intestinale, là où le virus se réplique le plus. Elles jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la barrière mucoale afin d'empêcher la translocation bactérienne et l'hyperactivation du système immunitaire [7, 34].

#### **1.4.1.2 Les macrophages**

Les macrophages, eux aussi considérés comme réservoir pour l'infection au VIH-1 à cause de leur grand potentiel de survie à la suite de l'infection, constituent une cible idéale pour la réplication virale. Ceci est dû d'une part à leur résistance aux effets cytopathiques du virus et, d'autre part, à leur présence dans des sanctuaires, tels que les microglies, les rendant inaccessibles aux traitements [35, 36]. Les macrophages sont parmi les premières cellules à être infectées et jouent ainsi un rôle clef dans la dissémination du virus. Effectivement, ils peuvent transmettre les virions nouvellement synthétisés aux cellules environnantes [37] mais aussi, par leur fonction présentatrice d'antigène, sécréter des cytokines chimioattractantes permettant le recrutement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pouvant eux aussi être infectés par le VIH-1 [38].

#### **1.4.1.3 Les cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques, un autre type de cellules de la lignée myéloïde, jouent aussi un rôle important dans la dissémination du virus [39, 40]. En effet, ces cellules captent le virus dans les muqueuses, où on les retrouve sous leur forme immature, et le présentent aux cellules T CD4<sup>+</sup> retrouvées dans les ganglions lymphatiques. Lors de son déplacement entre les muqueuses et les ganglions, la cellule dendritique subit une étape de maturation. Les cellules dendritiques matures sont peu sujettes à l'infection par le VIH-1 [41], mais elles arrivent à transmettre le virus, sans être infectées productivement, aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par infection *trans*, grâce à des récepteurs présents à leur surface tels que le DCIR (*dendritic cells immunoreceptor*) et le DC-SIGN (*dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) [42, 43]. Les cellules dendritiques immatures peuvent être infectées productivement par le VIH-1, ce qui mène à l'infection d'autres cellules (transfert *cis*) [44].

#### **1.4.1.4 Les lymphocytes B**

Les lymphocytes B (LyB) sont les seules cellules capables de sécréter les anticorps. Ils prennent une place de plus en plus importante dans la pathogénèse du VIH. En effet, même si ces cellules ne peuvent pas être infectées par le virus, celui-ci provoque plusieurs changements physiologiques, dont l'hyperactivation des lymphocytes B. Cette hyperactivation se traduit par une hypergammaglobulinémie, une augmentation du taux de renouvellement des cellules B et par une augmentation de l'expression de marqueurs d'activation.

En 1983, un groupe avait déjà suggéré que l'hyperactivation des lymphocytes B contribuait à la lymphadénopathie des sidéens [45]. Durant les années qui ont suivi, plusieurs études se sont penchées sur le dérèglement des LyB causé par le VIH dans plusieurs systèmes, incluant des modèles *in vivo*, *in vitro* et *ex vivo* sur des cellules et des tissus provenant de personnes infectées.

Toutes les études s'entendent pour dire que le problème ne réside pas en la déplétion des lymphocytes B, mais bien dans le déséquilibre entre leurs sous-types [46, 47]. En effet, chez les personnes infectées par le virus du SIDA, on remarque des altérations dans les cellules B immatures ou transitionnelles, une augmentation du nombre de cellules B immatures, un appauvrissement en lymphocytes B mémoires dans le sang périphérique, ainsi qu'une augmentation de sécrétion de plusieurs cytokines dans les organes lymphoïdes secondaires tels que l'IL-6 [48], le TNF- $\alpha$  et l'interféron de type I.

#### **1.4.2 Phases de l'infection**

Lorsqu'une personne est infectée par le virus de l'immunodéficience humaine et que le virus se retrouve dans les tissus, c'est souvent la cellule dendritique qui orchestre la réponse immunitaire. En effet, cette dernière va apprêter les antigènes viraux pour les présenter dans les organes lymphoïdes secondaires aux cellules B et, grâce à ses molécules du CMH-II [49], aux cellules T. Ces cellules vont s'activer à leur tour, proliférer et se différencier.

Les LyB commencent alors à sécréter des anticorps dirigés contre des antigènes du VIH -1 [50]; c'est ce que l'on appelle la séroconversion. Celle-ci peut prendre jusqu'à 12 semaines avant d'être complétée, laissant ainsi le champ libre à la dissémination du virus.

Un des premiers tissus à être infecté est le GALT (*Gut-associated lymphoid tissue*). Celui-ci englobe la majorité des LyT CD4<sup>+</sup> et contient la presque totalité des cellules T centrales mémoires. Leur infection par le VIH-1 mène à leur déplétion massive, ce qui perturbe la muqueuse intestinale. S'ensuit alors une translocation microbienne dans la circulation sanguine qui cause une hyperactivation du système immunitaire, et donc une plus grande infection par le VIH-1. Cette hyperactivation aura aussi pour effet la mort cellulaire programmée des cellules T due à l'AICD (*activation-induced cell death*). On peut donc résumer cette première phase de l'infection par une forte réplication virale et une grande déplétion de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

Vient alors la deuxième phase de l'infection par le VIH-1, à savoir la phase asymptomatique, caractérisée par une augmentation du taux de LyT CD4<sup>+</sup> et par une diminution de la charge virale. L'atteinte de cette phase résulte de plusieurs processus : le contrôle de la réplication virale par le système immunitaire par la production des cytokines, la destruction des cellules infectées par les LyT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et la production d'anticorps par les cellules B.

Cependant, ce contrôle momentané de la réplication virale est inefficace et n'empêche pas la progression vers le SIDA, d'une part parce qu'il y a épuisement du système immunitaire et d'autre part, parce que le renouvellement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ne compense pas leur perte dans le GALT.

Cette phase se caractérise souvent par un changement du tropisme du virus. En effet, lors de la première phase de l'infection, les virus retrouvés sont majoritairement de tropisme R5 (infectant principalement les macrophages, les cellules dendritiques ainsi que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires) [51, 52]. Dans la seconde phase, on constate une augmentation du tropisme X4 (virus infectant tous les types de LyT CD4<sup>+</sup>).

Vient finalement la troisième phase nommée la phase SIDA dans laquelle l'équilibre est complètement rompu entre les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et le VIH-1. À ce stade, le système immunitaire est affaibli à cause des cellules infectées tuées par les effets cytopathiques du virus, de la perte par apoptose des cellules non infectées avoisinantes (*bystander cells*) et à cause des cellules infectées tuées par les LyT CD8<sup>+</sup>. La phase SIDA se caractérise également par un très faible taux de LyT CD4<sup>+</sup> (moins de 200 par mm<sup>3</sup> de sang), par une très forte charge virale et par l'émergence d'infections causées par des pathogènes opportunistes.

Tel que mentionné précédemment, la reconstitution des LyT CD4<sup>+</sup> ne compense pas les pertes subies. Le système immunitaire va puiser dans ses ressources de LyT naïfs, mémoires et même dans son pool de cellules progénitrices pour palier à ce manque [7]. Les personnes infectées sont alors atteintes d'immunodéficience, souvent accompagnée, en absence de traitement, d'infections causées par des pathogènes opportunistes tels que, *Pneumocystis carinii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans* et *Leishmania*.

## 1.5 Traitements

À ce jour, il n'existe aucun traitement permettant d'éliminer complètement le VIH-1. Par contre, l'introduction des antirétroviraux (ARV) a grandement amélioré la qualité de vie des personnes infectées partout à travers le monde, surtout dans les pays en développement qui sont les plus touchés par l'infection au VIH-1. La baisse des coûts de traitement ainsi que la prise en compte par l'OMS des nouvelles études démontrant que l'administration plus rapide des ARV sauvait plus de vies, a permis de diminuer le nombre de décès liés au VIH-1 (29% de décès de moins de depuis 2005) [6].

Le principe de la thérapie antirétrovirale, plus particulièrement la HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*), repose sur l'utilisation d'une combinaison d'au moins 2 molécules de classes différentes anti-VIH, afin de baisser la charge virale à un seuil indétectable et de rétablir le taux de LyT CD4<sup>+</sup> à plus 500 par mm<sup>3</sup> de sang.

Il existe plusieurs classes de molécules antirétrovirales dont les inhibiteurs de la protéase, les inhibiteurs de la transcriptase inverse [53], les inhibiteurs de l'intégrase ainsi que les inhibiteurs de fusion (T-20). Ces molécules sont utilisées en combinaison pour empêcher

que le virus ne devienne résistant au traitement, car il est connu pour son grand pouvoir de mutations [54, 55]. Il est important de mentionner que la HAART ne cible que le virus en cours de réplication et ne permet donc pas d'éradiquer le virus latent dans les cellules dites réservoirs [54].





## 2. Chapitre II : Leishmania et la leishmaniose

### 2.1 Généralités sur *Leishmania*

*Leishmania* est un parasite protozoaire unicellulaire de l'ordre des *kinetoplastidae* et de la famille des *Trypanosomatidae*. Les *kinetoplastidae* se caractérisent par la présence d'une organelle nommée le kinétoplaste, une mitochondrie alimentant le flagelle et la cellule en énergie. La famille des *Trypanosomatidae* regroupe deux principaux genres de parasites. Le premier genre est *Trypanosoma*, un parasite unicellulaire incluant les espèces responsables des trypanosomiasés africaines et américaines [56]. Le deuxième genre *Leishmania* cause des leishmaniosés ayant plusieurs phénotypes et diverses formes cliniques (ex. leishmaniosés cutanées ou viscérales) [57].

Des données épidémiologiques suggèrent que 12 millions de personnes sont présentement infectées par le parasite et 350 millions de personnes sont à risque dans plus de 98 pays [58]. Chaque année, on dénombre entre 200 000 et 400 000 nouveaux cas de leishmaniosés viscérales (LV) et jusqu'à 1,2 millions de nouveaux cas de leishmaniosés cutanées (LC).

La leishmaniose viscérale (kala-azar) est mortelle en absence de traitement et se caractérise par des poussées de fièvre, par l'anémie, par l'hépatosplénomégalie et par la pancytopénie. Cette forme de leishmaniose est causée principalement par les espèces *L. infantum* ou *L. donovani* (Tableau 2) et se retrouve surtout dans le continent indien et en Afrique de l'Est.

La leishmaniose cutanée est causée souvent par l'espèce *L. major* (Tableau 2) est beaucoup plus fréquente et se caractérise par des lésions cutanées défigurantes et inesthétiques [59]. Plus des deux tiers des cas surviennent dans les six pays suivants: l'Afghanistan, l'Algérie, le Brésil, la Colombie, la République arabe syrienne et la République islamique d'Iran [58].

Le parasite *Leishmania* se caractérise par un cycle de vie impliquant plusieurs intervenants, incluant un insecte vecteur du genre *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* et un hôte mammifère.

La transmission se fait à la suite d'une piqûre d'un phlébotome femelle infecté et le parasite se retrouve alors chez un hôte mammifère. Ce sont principalement les macrophages qui sont ciblés par le parasite.

Tableau 2 : Classification simplifiée du genre *Leishmania*

Sous-genres et complexe	Forme clinique courante
<p><i>Le sous-genre Leishmania</i></p> <p><i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i></p> <p><i>L. tropica</i> <i>L. major</i> <i>L. killicki</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. arabica</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i></p>	<p>Leishmaniose viscérale</p> <p>Leishmaniose cutanée</p>
<p><i>Le sous-genre Viania</i></p> <p><i>L. braziliensis</i></p> <p><i>L. guyanensis</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i></p>	<p>Leishmaniose muco-cutanée</p> <p>Leishmaniose cutanée</p>

## 2.2 Cycle de vie de *Leishmania*

Tel que mentionné précédemment, le cycle répliatif de *Leishmania* est complexe et implique plusieurs intervenants. De plus, dépendamment de son hôte, le parasite peut changer de forme (promastigote ou amastigote) pour mieux s'adapter à son environnement (pH, stress oxydatif, température) (figure 5).

### 2.2.1. Le stade promastigote

À ce stade, le parasite se retrouve dans l'insecte. Il se présente sous forme flagellée et allongée allant jusqu'à 20 µm. Cette forme provient de la différenciation des amastigotes ingérés lors du repas sanguin du phlébotome. En effet, il a été démontré que les changements de pH et de température rencontrés lors du passage du parasite de l'hôte

mammifère vers l'insecte vecteur (pH de 4,5-5 avec une température de 37°C chez l'hôte mammifère et un pH légèrement alcalin avec une température de 25°C chez l'insecte), étaient responsables de la différenciation du parasite sous la forme promastigote [60]. Le parasite se retrouve attaché à la paroi du tractus digestif de l'insecte où il n'est pas encore infectieux et doit subir un processus de maturation nommée métacyclogénèse afin d'acquérir son infectivité.

### **2.2.2. La métacyclogénèse**

Cette étape se caractérise par un allongement du lipophosphoglycan (LPG), une répétition de phospho-disaccharide galactose-mannose du parasite. C'est une molécule de surface importante pour la survie du parasite autant chez l'insecte que chez l'hôte mammifère [61]. Ainsi, lors de sa maturation, le parasite se prépare pour affronter le milieu hostile retrouvé dans le phagolysosome, pour résister à la lyse induite par le complément, pour augmenter son infectivité et accroître sa virulence par l'expression de la métalloprotéase gp63 (glycoprotéine de surface 63) [62, 63].

Chez l'insecte, les promastigotes matures vont migrer du tractus digestif jusqu'à l'œsophage et le pharynx du phlébotome. Ces parasites forment alors un protéophosphoglycan filamenteux (fPPG) qui forme un gel de sécrétion (PSG) qui force l'ouverture de la valve stomodéale [64-66], forçant ainsi l'insecte à régurgiter les parasites avant de prendre son repas sanguin pour infecter un autre mammifère. Ensuite, juste après leur libération chez l'hôte, les parasites sont phagocytés par les neutrophiles qui sont les premières cellules à être recrutées au site d'infection. Les promastigotes, grâce au LPG entre autres, empêchent les neutrophiles d'entrer en apoptose au moins jusqu'à l'arrivée de macrophages, cible principale du parasite [67]. Lorsque les macrophages arrivent sur place, ils phagocytent à leur tour les promastigotes qui se retrouvent alors dans le phagosome. Ces derniers fusionnent avec les lysosomes pour former les phagolysosomes. C'est à ce moment que les promastigotes se transforment en amastigotes lesquels sont mieux adaptés au milieu acide du phagolysosome.

### **2.2.3. Le stade amastigote**

Lorsque les promastigotes se retrouvent dans le phagolysosome, le changement de pH (4,5-5) et de température (37°C) favorise leur transformation en amastigotes [60]. Sous cette forme, le parasite se présente de façon arrondie, non motile de 4 à 5 µm. Les amastigotes vont alors proliférer et provoquer la lyse du macrophage pour être libérés et aller infecter d'autres cellules.

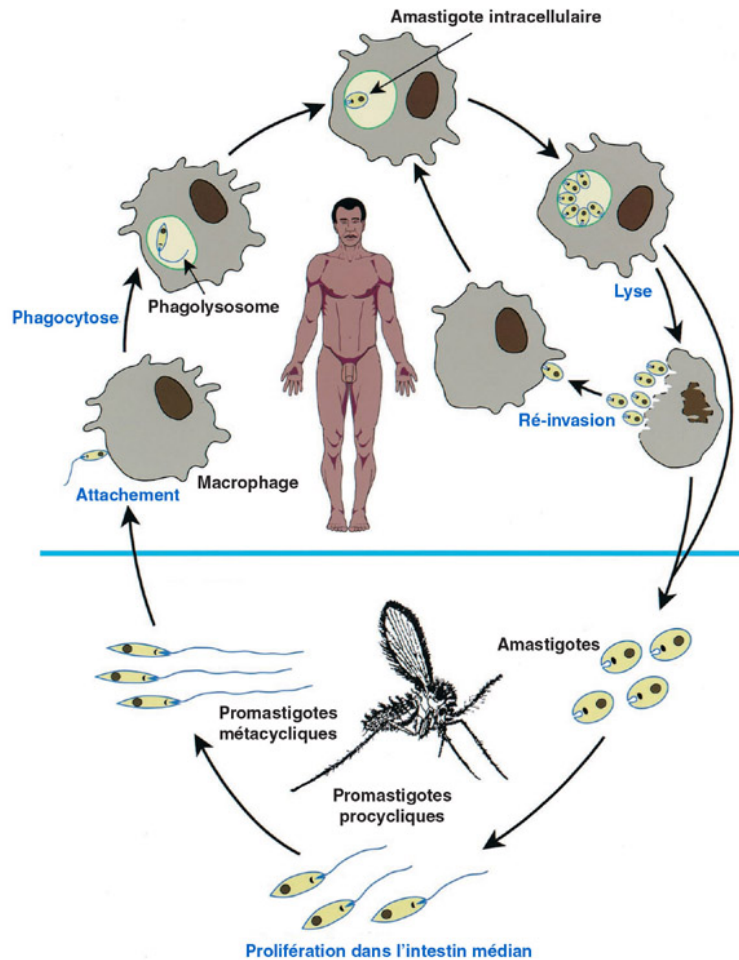


Figure 5 : Le cycle réplcatif de *Leishmania*.

<http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/21419/ch01.html> [68].

Le cycle réplcatif de *Leishmania* commence lors du repas sanguin d'un phlébotome infecté lorsque les promastigotes métacycliques sont relâchés. Les promastigotes sont alors phagocytés par les macrophages pour se retrouver dans le phagosome. Ce dernier fusionne avec le lysosome pour former le phagolysosome dans lequel les promastigotes se transforment en amastigotes. Le parasite prolifère rapidement jusqu'à la rupture du macrophage pour se propager et infecter d'autres cellules. Le cycle recommence lorsqu'un phlébotome pique une personne infectée.

## 2.3 Pathogénèse de *Leishmania*

### Cellules de l'immunité participant à la pathogénèse de *Leishmania*

Peu de temps après l'infection, *Leishmania* fait face à plusieurs barrières de l'immunité, la première étant le complexe du complément. Ce complexe protéique de l'immunité innée s'active et favorise la fixation du C3 à la membrane plasmique du parasite. S'ensuit alors le clivage du C3 en C3b qui vient se fixer soit à la membrane plasmique ou à la protéine gp63 pour former le complexe lytique C5b9 [69]. Le parasite *Leishmania* a toutefois développé des stratégies pour échapper au système immunitaire. Parmi elles, on retrouve l'inactivation de la protéine C3b par la gp63, les kinases présentes sur la membrane plasmique inactivent C3 et C3b, le blocage du complexe C5b9 par le LPG du parasite [69] et l'induction de cytokines immunosuppressives tels que le TGF- $\beta$  et l'IL-10 [70]. Contrairement aux autres parasites, *Leishmania* n'induit pas la sécrétion de l'IL-12 par les macrophages, interférant ainsi dans les voies de signalisations nécessaires au développement d'une réponse de type Th1 qui est indispensable pour combattre cette infection. Finalement, il a été démontré que l'infection par *Leishmania* induisait le développement de lymphocytes Treg à travers la sécrétion du TGF- $\beta$  par les macrophages [70]. Ces lymphocytes Treg suppriment la capacité des LyT effecteurs à éliminer le parasite favorisant ainsi sa persistance dans l'organisme.

Tel que mentionné précédemment, les neutrophiles arrivent en premier sur le site d'infection pour phagocyter le parasite, suivis de près par les macrophages. La phagocytose a lieu lorsque les récepteurs CR1 et CR3 se lient avec les protéines C3b et C3bi présentes sur les promastigotes. Les macrophages produisent par la suite des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires ainsi que des molécules toxiques pour amplifier la réponse immunitaire [69].

La réponse immunitaire innée étant contournée par le parasite, le contrôle de l'infection nécessite le développement d'une réponse cellulaire adaptative. Pour ce faire, les cellules de Langerhans (cellules dendritiques de l'épiderme) captent et appréhendent l'antigène pour le présenter aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans le ganglion lymphatique. Ces derniers vont s'activer, proliférer et se différencier en cellules effectrices.

La mise en place de la réponse immunitaire de type Th1 (T-helper type-1), qui active une forte activité leishmanicide par les macrophages, est importante pour le contrôle et la protection contre les leishmanies. Cette protection a lieu grâce à l'interleukine 12 (IL-12) produite par les APC et à l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) produit par les lymphocytes T auxiliaires [71-76]. Cependant, les patients infectés par des souches causant les leishmanioses viscérales sont incapables de monter une réponse immunitaire curative contre le parasite [71, 72]. Cette incapacité s'explique par l'échec des PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) à proliférer et à produire de l'IFN- $\gamma$ . Comme les patients infectés par des souches causant des VL répondent à d'autres antigènes lorsqu'infectés et qu'ils résistent à la réinfection par le parasite, on peut penser que des mécanismes immunosuppresseurs contribuent à la pathogénèse de la VL [76, 77].

Des études réalisées sur des modèles expérimentaux animaux et sur des patients atteints de leishmanioses ont montré l'importance de la cytokine immunorégulatrice IL-10 dans la régulation de la réponse immunitaire contre les leishmanies [78]. En effet, il a été démontré que des concentrations élevées d'IL-10 étaient retrouvées dans le sérum [73, 79-82] et les tissus lésionnels [74, 75] de personnes infectées. De plus, la neutralisation de cette cytokine permet l'élimination du parasite dans les aspirats spléniques de personnes atteintes de leishmaniose viscérale [83]. Il en est de même pour les souris chez qui la neutralisation du récepteur de l'IL-10 a aussi mené au contrôle de la maladie [84]. L'IL-10 joue également un rôle dans les leishmanioses cutanées [85]. Cette cytokine peut être produite par plusieurs types cellulaires, dont les lymphocytes Tregs [85], les cellules Th1 [81, 86-88], les cellules T CD8<sup>+</sup> [89], les cellules dendritiques [90], les macrophages [91], les neutrophiles [92], les cellules *Natural Killer* (NK) [93] et les lymphocytes B [94, 95].

Tel que mentionné précédemment, certains lymphocytes B secrètent eux aussi de fortes quantités d'IL-10 et sont appelés Bregs (Regulatory B cells) [96]. Ces cellules ont la capacité de réguler l'inflammation en supprimant la production de cytokines pro-inflammatoires produites par les LyT, les macrophages et les cellules dendritiques [97, 98]. Même s'ils ne sont pas infectés par *Leishmania*, les cellules B prennent une place de plus en plus importante dans les études concernant la pathogénèse du parasite. En effet, des études conduites sur des humains et des souris ont révélé que l'activation des cellules B

participait fortement à la propagation et à l'exacerbation des leishmanies [95, 99]. De même, des dysfonctionnements au niveau des lymphocytes B ont été observés chez des patients ayant la leishmaniose viscérale tels que l'hypergammaglobulinémie et la présence d'anticorps non spécifiques et/ou auto-immuns [100-103].

Récemment, le rôle de l'IL-10 sécrétée par les cellules Bregs dans le développement de la réponse Th2 chez la souris BALB/c infectées par *L. major* a été mis en lumière [94]. Cette étude a même révélé que cette réponse de type Th2 dépendait de la capacité des cellules B à présenter des antigènes aux cellules T plutôt que de leur production d'anticorps IgG spécifiques [104, 105]. En effet, dans un modèle de leishmaniose murin, il a été démontré que lorsque les LyB agissaient comme des APC, ils induisaient préférentiellement la production de l'interleukine 4 menant au développement d'une réponse de type Th2, contrairement aux macrophages qui, eux, induisent la production de l'interféron gamma et de l'interleukine 2 menant au développement d'une réponse de type Th1, qui est la réponse nécessaire pour combattre le parasite [106].

En outre, l'importance de l'IL-10 pour la susceptibilité à l'infection et de son association avec la viscéralisation de l'infection a également été rapportée [94, 107]. Il a été démontré que la stimulation de cellules spléniques de souris BALB/c avec la tryparédoxyne de *Leishmania infantum* activait les cellules B et conduisait à la production de l'IL-10 [94, 108]. Il semblerait donc que l'IL-10 joue un rôle à double tranchant. D'une part, elle favorise la propagation du parasite en abaissant la réponse immunitaire. D'autre part, cet abaissement de la réponse immunitaire empêche l'apparition de lésions immunopathologiques dues à une réponse immunitaire exacerbée [109].

## **2.4 Traitements**

À ce jour, il n'existe encore aucun vaccin permettant de prévenir les leishmanioses : il existe toutefois plusieurs traitements permettant la guérison. Parmi eux, on retrouve en première ligne de défense, l'antimoine pentavalent et ses dérivés. Ce traitement est utilisé depuis plusieurs années pour traiter toutes les formes de *Leishmania*. Cependant, des problèmes de résistance grandissants sont associés à ce traitement. L'antimoine et ses



dérivés (stibogluconate de sodium ou antimoniate de meglumine) agissent en exposant le parasite au stress oxydatif de la cellule hôte [110].

La pentamidine constitue le traitement de deuxième choix. Son mode d'action exact n'est pas encore connu, mais il a été rapporté qu'elle s'accumulait dans la mitochondrie du parasite en inhibant la topoisomérase mitochondriale [69, 111]. En raison de sa forte toxicité, on n'utilise ce médicament qu'en cas de résistance à l'antimoine. L'amphotéricine B agit en formant des pores au niveau de la membrane plasmique, créant ainsi un déséquilibre ionique. Ce médicament est le plus utilisé pour le traitement des leishmanioses en co-infection avec le VIH-1 [112].

Finalement, la miltefosine est le premier traitement administré par voie orale [113]. Elle agit sur la membrane du parasite en causant son apoptose. Ce médicament possède un effet leishmanicide autant sur les souches viscérales que sur les souches cutanées. Par contre, la miltefosine possède des effets tératogènes empêchant ainsi son administration chez les femmes enceintes.



### 3. Chapitre III : Co-infection VIH-1 et *Leishmania*

Les cas de co-infection VIH-1/*Leishmania* représentent un sérieux problème dans les régions endémiques. En effet, les leishmanioses gagnent une plus grande importance clinique chez les personnes infectées par le VIH-1 pour deux principales raisons : d'une part, parce que les deux pathogènes sont prévalents dans plus de 35 pays [114, 115] et d'autre part, parce que les deux microorganismes ont des cibles cellulaires communes à savoir le macrophage et la cellule dendritique. Initialement, la majorité des cas de co-infection VIH/*Leishmania* étaient rapportés en Europe, mais le nombre de cas est en augmentation en Afrique (surtout en Éthiopie et au Soudan), en Asie et en Amérique du Sud [59, 113]. Tel que mentionné précédemment, il existe diverses formes cliniques de *Leishmania*. C'est cependant la leishmaniose viscérale (LV) qui connaît une grande émergence chez les personnes infectées par le VIH-1 et c'est la souche *Leishmania infantum* qui est la plus retrouvée dans les cas de co-infections.

Plusieurs études ont révélé que le VIH-1 augmente le risque de développer des VL par un facteur de 100 à 2300 dans les zones d'endémicité, qu'il diminue la probabilité d'une réponse thérapeutique et qu'il augmente le risque de rechute [114]. Le parasite *Leishmania*, quant à lui, favorise une augmentation de la charge virale [116] et une progression plus rapide vers le SIDA [117]. En ce sens, une étude publiée par Zhao et collaborateurs a montré que lorsque les macrophages étaient co-infectés par le VIH-1 et *Leishmania*, la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-6) était plus importante que lorsque les macrophages étaient infectés par l'un ou l'autre des pathogènes [118]. On peut donc en conclure que les deux pathogènes exercent un effet synergique préjudiciable pour leur hôte.

Tel que mentionné précédemment, les deux microorganismes ciblent les mêmes types cellulaires du système immunitaire, à savoir les macrophages et les cellules dendritiques. Dans ces cellules, *Leishmania* favorisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  [117, 119, 120]. Ces cytokines activent le système immunitaire permettant ainsi l'augmentation de la réplication du VIH-1. Ce dernier, à son tour, accroît les fonctions phagocytaires des macrophages, amplifiant par le fait même la

réplication de *Leishmania* [115, 121]. Il est intéressant de mentionner que le VIH-1 augmente la phagocytose de *Leishmania* dans les macrophages [122], ce qui est inhabituel étant donné qu'il a déjà été démontré que le VIH-1 diminue la fonction phagocytaire des macrophages [122-124]. L'effet par lequel le virus augmente la phagocytose des macrophages lors de la co-infection avec *Leishmania* est encore mal compris. Cependant, il semblerait que l'augmentation de la phagocytose de *Leishmania* par les macrophages médiée par le VIH-1 serait causée par la protéine virale Tat et par le TGF- $\beta$  [122]. Dans cette même étude, il a été démontré que VIH-1 augmentait l'expression du récepteur de la phosphatidylsérine, le CD91/LRP-1 (*the low density lipoprotein receptor-related protein 1*) à la surface des macrophages exposés mais non infectés par le VIH-1 (*bystander*), favorisant ainsi l'internalisation du parasite dans ces cellules.

Seulement 1 sur chaque 5 à 10 individus immunocompétents développe une LV. Puisque une réponse immunitaire menée par l'entremise des lymphocytes T est nécessaire pour la clairance du parasite, les personnes immunosupprimées sont plus enclines à développer des LV [125]. Il a aussi été rapporté que des souches de *Leishmania*, qui sont habituellement non pathogènes chez l'humain, peuvent causer la maladie chez les personnes positives au VIH-1. Pour ces raisons, une meilleure compréhension des mécanismes d'interaction entre les deux microorganismes est nécessaire pour mieux traiter les personnes co-infectées. Chez ces dernières, la HAART est rapidement initiée afin de restaurer partiellement les fonctions immunitaires et pour prévenir la viscéralisation de *Leishmania*, comme en témoigne la forte diminution de l'incidence de la LV en Europe suite à l'utilisation généralisée de la thérapie HAART [126].

L'interaction entre le VIH-1 et *Leishmania* est complexe et fait intervenir plusieurs facteurs et plusieurs types cellulaires. C'est pourquoi, il est important d'élargir le champ de recherche et de s'intéresser aux autres types cellulaires impliqués, même s'ils ne sont pas directement infectés par les deux pathogènes. C'est notamment le cas des cellules B qui ne sont ni infectées par le VIH-1 ni par le protozoaire *Leishmania* et dont le rôle joué par ces cellules dans le contrôle des deux maladies n'est pas encore très bien défini. On sait par contre que chacun des deux pathogènes cause des altérations au niveau fonctionnel de ces cellules.

## 4. Chapitre IV: Hypothèse et objectifs

### 4.1 Hypothèse de recherche

Lorsque les personnes sont infectées par le VIH-1, leur système immunitaire est grandement affaibli, donnant ainsi l'occasion à des pathogènes opportunistes d'entrer en jeu. C'est notamment le cas pour le parasite *Leishmania* qui profite de cette déficience du système immunitaire pour se propager.

L'effet de la co-infection VIH-1/*Leishmania* sur les cellules cibles communes aux pathogènes est largement étudié. Toutefois, on s'intéresse de plus en plus à d'autres types cellulaires n'étant pas directement infectés par ces deux pathogènes. Parmi eux, on retrouve les lymphocytes B, connus pour sécréter des cytokines immunorégulatrices lorsqu'exposés à *Leishmania* et dont le rôle dans la pathogénèse de *Leishmania* n'est plus à prouver.

Comme les LV s'accompagnent par la colonisation des organes lymphoïdes secondaires et que ces organes englobent une grande quantité de lymphocytes B, nous avons décidé d'en savoir plus sur l'effet des amastigotes de *Leishmania infantum* sur des cellules B provenant d'amygdales, d'analyser les facteurs solubles sécrétés par les cellules B en réponse à *Leishmania* et de déterminer leur effet sur la réplication du VIH-1. C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse voulant que les molécules sécrétés par les cellules B suite à leur exposition aux amastigotes de *Leishmania infantum* pourraient affecter l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et la réplication virale du VIH-1 dans un contexte *ex vivo*.

### 4.2 Objectifs de recherche

Pour vérifier cette hypothèse, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

1. Analyser la nature des facteurs solubles sécrétés par les cellules B après exposition à *Leishmania infantum*.
2. Analyser l'effet des molécules sécrétés par les lymphocytes B sur les cellules T CD4<sup>+</sup>.
3. Analyser l'effet de ces cytokines sur la réplication du VIH-1.



## 5. Chapitre V: *Leishmania infantum* active les lymphocytes B régulateurs

Ce chapitre présente un manuscrit soumis dans la revue *Journal of Immunology*.

Guadalupe Andreani\*, Rym Menasria\*, Alejandro Martin Gomez\*, Michel Ouellet\* and Michel J. Tremblay.

### Résumé

La leishmaniose viscérale est caractérisée par un parasitisme incontrôlé des organes internes qui, en absence de traitement, conduit à la mort. La progression de la maladie est liée à la nature de la réponse immunitaire générée et au niveau de la cytokine immunosuppressive IL-10 retrouvé dans le sérum. Dans cette étude, nous rapportons que l'incubation des cellules B humaines avec des amastigotes de *Leishmania infantum* a donné lieu à une augmentation de l'expression de plusieurs marqueurs d'activation et à une sécrétion dose-dépendante de l'IL-10. Cette sécrétion médiée par le parasite dépend de l'activité de Syk, de la phosphatidylinositol-3 kinase, de la p38 et nécessite la mobilisation du calcium intracellulaire. Les milieux conditionnés provenant de cellules incubées avec les amastigotes inhibent fortement l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, leur prolifération et leur fonction. L'exposition des cellules B aux amastigotes de *L. infantum* déclenche donc les fonctions régulatrices des cellules B, en partie grâce à la sécrétion de l'IL-10, ce qui pourrait favoriser la diffusion du parasite dans l'organisme.

***Leishmania infantum* amastigotes trigger human B cells with an immunoregulatory phenotype**

Guadalupe Andreani\*, Rym Menasria\*, Alejandro Martin Gomez\*,  
Michel Ouellet\* and Michel J. Tremblay\*, †

\*Axe des Maladies Infectieuses et Immunitaires, Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Québec - pavillon CHUL, and †Département de Microbiologie-Infectiologie et Immunologie, Faculté de médecine, Université Laval, Québec, Canada

Running title: *Leishmania* activates human regulatory B cells

Corresponding author. Mailing address:

Dr. Michel J. Tremblay

Axe des Maladies Infectieuses et Immunitaires, RC709

Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Québec - pavillon CHUL

2705 boul. Laurier, Québec (QC), Canada, G1V 4G2

Tel.: 1-418-525-4444 local 48274; Electronic address: michel.j.tremblay@crchul.ulaval.ca

This work was supported by an operating grant to M.J. Tremblay from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (HOP-84555). M.J. Tremblay holds the CIHR Canada Research Chair in Human Immunoretrovirology (Tier 1 level).



## **Abstract**

Visceral leishmaniasis is caused by the protozoan parasites *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani*. This infection is characterized by an uncontrolled parasitization of internal organs which, when left untreated, leads to death. Disease progression is linked with the type of immune response generated and a strong correlation was found between disease progression and serum levels of the immunosuppressive cytokine IL-10. Other studies have suggested a role for B cells in the pathology of this parasitic infection and the recent identification of a B-cell population in humans with regulatory functions, which secretes large amounts of IL-10 following activation, have sparked our interest in the context of visceral leishmaniasis. We report that incubation of human B cells with *Leishmania infantum* amastigotes resulted in upregulation of multiple cell surface activation markers and a strong dose-dependent secretion of IL-10. Cell sorting experiments allowed us to identify the IL-10-secreting B cell subset (i.e. CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>). The parasite-mediated IL-10 secretion was shown to rely on the activity of Syk, phosphatidylinositol-3 kinase and p38, as well as to require intracellular calcium mobilization. Conditioned media from B cells incubated with *L. infantum* amastigotes were shown to strongly inhibit CD4<sup>+</sup> T-cell activation, proliferation and function. Blockade of IL-10 activity using a soluble IL-10 receptor restored TNF- $\alpha$  secretion almost to control levels. Exposure of human B cells to *L. infantum* amastigotes thus triggers B cells with regulatory activities mediated in part by IL-10, which could favor parasite dissemination in the organism.

## Introduction

Leishmaniasis is an infection caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* and is one of the most significant neglected tropical diseases, with 350 million people in 88 countries worldwide at risk of developing one of the forms of the disease. Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe form of the disease, fatal when untreated and represents nearly 70 000 deaths per year (1). VL is characterized by an uncontrolled parasitization of organs, such as spleen, liver and bone marrow and is caused by the species *Leishmania infantum* (*L. infantum*) (known as *L. chagasi* in South America) and *L. donovani*. All parasites of the genus *Leishmania* are obligate, intracellular protozoa that infect cells of the macrophage-dendritic cell lineage of their vertebrate hosts (primarily macrophages) (2, 3). The parasite exists under two distinct morphologic forms, i.e. either as motile promastigotes within the alimentary canal of their phlebotomine sandfly vector or as nonmotile amastigotes that reside within phagolysosomes of mammalian mononuclear phagocytes. Infection of the mammalian host is initiated when the female sandfly regurgitates infectious promastigotes during its blood meal. Promastigotes are quickly internalized by tissue phagocytes recruited to the site of infection. Following phagocytosis, promastigotes are engulfed in phagolysosomes, where they transform into the non-motile intracellular amastigotes. Thereafter, amastigotes replicate within acidic phagolysosomes, eventually lysing the cell and freeing themselves to invade adjacent cells.

Host protection against *Leishmania* infection depends on the development of a T-helper type-1 (Th1) response, which triggers a strong leishmanicidal activity by infected macrophages. The production of IL-12 by antigen-presenting cells and interferon (IFN)- $\gamma$  by T-helper cells appear to be necessary for the control of the infection and the development of acquired resistance (4-10). A unique feature of the immune response in patients with VL is the inability to mount a curative, parasite-specific immune response, which is reflected as the failure of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to proliferate and produce IFN- $\gamma$  in response to leishmanial antigens (4, 5). After treatment and successful cure, individuals become resistant to re-infection events, test positive for leishmanin and respond adequately to leishmanial antigens *in vitro*. Given that individuals

with active VL respond normally to other antigens before being cured, the observed defect of parasite-specific immune responses cannot be attributed to a generalized failure of antigen-specific immune responses. Furthermore, as they can generate a proper parasite-specific immune response after being cured, this defect cannot be due to an inability of *Leishmania* antigens to drive Th1 responses (6, 10). Therefore, other immunosuppressive mechanisms may contribute to the overall pathogenesis of VL.

The regulatory cytokine IL-10 has repeatedly been implicated as an immunosuppressive factor in both human and experimental leishmaniasis (i.e. murine). It has been shown that patients with an advanced state of disease display elevated levels of IL-10 mRNA in lesional tissues (7-9) and high amounts of IL-10 in serum (11-14). Moreover, neutralization of IL-10 promotes clearance of the parasite in splenic aspirate cells from patients with VL (15). It has been reported that IL-10-deficient BALB/c and C57BL6 mice are highly resistant to *L. donovani* infection, and blockade of IL-10 receptor in wild-type mice leads to control of the infection (16). The involvement of IL-10 in the persistence of localized cutaneous leishmaniasis has also been described in humans (17). Recent studies conducted in humans and mice have revealed that IL-10 can be produced by different cell types following *Leishmania* infection, including regulatory T cells (Tregs) (18), Th1 cells (13, 19-21), CD8+ T cells (22), natural killer cells (23), regulatory dendritic cells (24), macrophages (25), neutrophils (26) and B cells (27, 28). IL-10 acts as a multifactorial cytokine in human infectious diseases. By interfering with both innate and adaptive responses, it contributes to favorable conditions for the persistence of microbes and chronic infections. On the other hand, it prevents the development of immunopathological lesions that result from an exacerbated immune response to acute and chronic infections that can lead to deleterious tissue lesions (29). Thus, although high levels of IL-10 found in VL might help to diminish immunopathologies and tissue damage, the immunosuppressive effect of IL-10 might promote parasite replication, dissemination and disease progression.

Evidence from both human and mice studies indicate that B-cell activation leads to disease exacerbation (28, 30). Furthermore, animal studies have demonstrated that C57BL/6 B cell-deficient mice are highly resistant to VL (31). Signs of B-cell dysfunctions are also observed in human VL, including hypergammaglobulinemia, presence of non-specific polyclonal and/or autoimmune antibodies (32-35). In cutaneous leishmaniasis, polyclonal

B-cell activation has been detected in response to *L. major* infection (36, 37), and antibody production and antigen presentation by B cells have been shown to exacerbate disease also in *L. major* infection (38). The importance of B cells for the development of a Th2 response and the susceptibility in BALB/c mice infected with *L. major* have been reported (38). It has also been well-established that the ability of B cells to direct the immune response in BALB/c mice toward a Th2 phenotype (associated with a non-healing disease) was dependent upon their capacity to present antigens to T cells rather than upon their production of specific IgG antibodies (38, 39). Recently, the role of IL-10 secreted by regulatory B cells in the development of a Th2 response in BALB/c mice infected with *L. major* has been brought into light (27). Furthermore, the importance of IL-10 for the susceptibility to the infection and its association with the visceralization of the infection have also been described (27). In addition, B-cell activation and IL-10 production were seen following stimulation of splenic BALB/c B cells with *L. infantum* tryparedoxin (40). Depending on the species and the disease studied but also on the specific triggering signals used, various populations of IL-10-secreting B cells with regulatory functions have been described. For example, in a murine model system, Yanaba and co-workers have described a rather unique CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> B-cell subset that is able to efficiently control T cell-dependent inflammatory responses through IL-10 secretion (41). Although a similar B-cell subset has been rarely described in humans, patients suffering from Chagas disease were shown recently to have a slightly higher frequency of CD1d<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> B cells that produce IL-10 (42) and an increased frequency of circulating CD1d<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> B cells was correlated with inhibition of Th17 responses in tuberculosis patients (43). The role of regulatory B cells in the development of autoimmune diseases and chronic infections in humans has been addressed previously and it was established that a CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B-cell subset that secretes high amounts of IL-10 upon stimulation can regulate T-cell functions and is positively associated with renal graft acceptance (44, 45). Lastly, a CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> subpopulation of B cells was described in humans as having regulatory properties upon stimulation by CPG/anti-CD40 and elevated frequencies of these cells were associated with various autoimmune diseases (46). In summary, there seems to be no single marker to identify regulatory B cell and different subtypes of regulatory B cells might exist depending of various factors such as the disease and the nature of stimulation.

As already mentioned, IL-10 is a critical regulatory cytokine involved in the pathogenesis of human VL. Given that colonization of secondary lymphoid organs occurs during VL and B cells are found at high concentrations in these organs, we investigated whether human B cells isolated from tonsillar tissue do secrete IL-10 in response to *L. infantum* amastigotes. We assessed also the phenotypic characteristics of IL-10-secreting B cells and their capacity to modulate T-helper cell functions.

## Materials and methods

*Ethics statement.* The current study was approved by the institutional Bioethics Committee (i.e. Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Québec). Clinical samples from tonsillar tissues were obtained from minor patients in accordance with the guidelines of the institutional review board and parents/guardians provided a written consent on behalf of all minor participants. Human primary CD4<sup>+</sup> T cells were obtained from PBMCs purified from the blood of healthy subjects in accordance with the guidelines of the Bioethics Committee from the CHU de Québec. A written ethics board-approved informed consent form was obtained from each donor for the CD4<sup>+</sup> T cells.

*Isolation and purification of human B cells.* Tonsillar tissues were obtained from 2- to 4-year-old patients undergoing routine tonsillectomy at the CHU de Québec. Briefly, tonsillar tissues were dissected into small pieces and resuspended in endotoxin-free phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma, Oakville, ON) containing penicillin (100 U/ml) (Wisent, St-Bruno, QC), streptomycin (100 µg/ml) (Wisent, St-Bruno, QC), Fungizone/Amphotericin B (2.5 µg/ml) (Gibco, Burlington, ON) and Primocin (100 µg/ml) (InvivoGen, San Diego, CA). The tissue suspension was incubated with collagenase D (Roche Diagnostic, Montreal, QC) at a final concentration of 2 mg/ml for 45 min at 37°C. Next, partially digested tissue was processed with a GentleMacs device (Miltenyi Biotec inc. Auburn, CA) in a C tube using standard “program B”. DNase I (Roche Diagnostic, Montreal, QC) was then added at a final concentration of 100 U/ml and the suspension was further incubated for 15 min at room temperature. Cell suspension was finally processed with the GentleMacs device (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA) in a C tube using standard program “m\_spleen\_04”. The resulting cell suspension was diluted in a solution of PBS supplemented with 2mM EDTA and 0.5% BSA, filtered first through a 100-µm nylon mesh cell strainer (Partec, Swedesboro, NJ) and next by a 30-µm nylon mesh cell strainer (Partec), and finally separated using a StemSep human B cell enrichment kit (StemCell Technologies). Isolated B cells (CD19<sup>+</sup>) were maintained at a density of  $1 \times 10^7$  cells/ml in RPMI-1640 medium (Gibco Life Technologies, Life Technologies, Burlington, ON) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Wisent, St-Bruno, QC), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and Primocin (100µg/ml). Various B-cell subsets were

isolated with a BD influx high-speed cell sorter based on their expression of CD27, CD24 and CD38. Alternatively, CD27<sup>+</sup> and CD27<sup>-</sup> cells were separated using CD27 Microbeads (Miltenyi Biotec Inc.).

*Culture of L. infantum parasites.* The *L. infantum* strain clone 1 (MHOM/MA/67/ ITMAP-263) used in this study and its maintenance as axenic amastigotes were described previously (47). Briefly, axenically-grown amastigote forms of *L. infantum* were maintained at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere by weekly sub-passages in MAA/20 in 25 cm<sup>2</sup> flasks. MAA/20 consists of modified medium 199 with Hank's salts (Gibco, Burlington, ON), supplemented with 0.5% soybean tryptocasein (Pasteur Diagnostics, Marne la Coquette, France), 15 mM D-glucose, 5 mM L-glutamine, 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.023 mM bovine haemin and 25 mM HEPES (all purchased from Sigma, Oakville, ON) at a final pH of 6.5. Axenically grown amastigotes show morphological, biochemical and biological characteristics similar to those of *in vivo* amastigotes (47).

*Exposure of human B cells to L. infantum amastigotes.* Purified B cells were cultured at a final concentration of 1 x 10<sup>7</sup>/mL in RPMI-1640 medium containing L-glutamine supplemented with 10% FBS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and Primocin (100 µg/ml). Cells were incubated with axenic amastigotes at a 3:1 ratio (unless otherwise indicated) for 24 h. Thereafter, cell-free supernatants were harvested and IL-10 secretion was quantified using a BD OptEIA Human IL-10 ELISA set (BD Biosciences, Mississauga, ON).

*qRT-PCR analysis.* Total RNA was isolated using the illustra RNAspin Mini Kit (GE Healthcare, Mississauga, ON). RNA was reverse transcribed using Moloney-Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) and expression level of IL-10 transcripts were determined by quantitative PCR (qPCR) using SyberGreen mastermix (Applied Biosystems, CA) on an ABI-PRISM 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, CA). Each sample was run in triplicate and relative changes in IL-10 expression were calculated using the 2<sup>ΔΔCt</sup> method (48). This method was used once validation experiments showed that the efficiencies of the target and endogenous reference (18S) were approximately equal. Primers used were as follow: IL-10, Fwd: TTA CCT

GGA GGA GGT GAT GC, Rev: GGC CTT GCT CTT GTT TTC AC; 18S, Fwd: TAG  
AGG GAC AAG TGG CGT TC, Rev: CGC TGA GCC AGT CAG TGT.

*Flow cytometry.* Freshly isolated B cells were exposed to *L. infantum* amastigotes for 24 h after which cells were incubated for 20 min in PBS supplemented with 200 mM D-galactose (osmolarity was adjusted to 317 mOsm/l by reducing NaCl concentration accordingly) to detach the parasites from B cells. Cells were then pelleted at 800 rpm, resuspended in the same solution and filtered through a 30- $\mu$ m nylon mesh cell strainer (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA), washed again and finally resuspended at  $1 \times 10^7$ /ml in PBS containing 2 mM EDTA and 0.5% BSA (staining buffer). For analysis of human IL-10 intracellular expression, cells were incubated with GolgiPlug (BD Biosciences, Mississauga, ON) during the last 5h of stimulation along with ionomycin (1  $\mu$ g/ml; Sigma, Oakville, ON) and PMA (50 ng/ml; Sigma, Oakville, ON). Viability of B cells was assessed by staining with Fixable Viability Dye eFluor 780 in PBS/EDTA 2 mM, following manufacturer's instructions (eBiosciences, San Diego, CA). Finally, cells were treated with 10% pooled human sera and 20% goat sera for 15 min at 4°C to block nonspecific binding sites and Fc receptors and cells were washed with cold staining buffer. Cells were pelleted and resuspended at a final concentration of  $1 \times 10^7$  cells per 100  $\mu$ l of cold staining buffer. For intracellular detection of IL-10, cells were stained with a combination of CD19-PE, CD27-FITC, CD24-PE and CD38-FITC monoclonal antibodies (mAbs) (BD Biosciences, Mississauga, ON). Cells were washed, fixed and permeabilized using the Cytotfix Cytoperm kit (BD Biosciences, Mississauga, ON). For the detection of intracellular IL-10, cells were stained with IL-10-APC mAb (Miltenyi Biotec Inc.). B-cell activation markers following parasite exposure were evaluated by staining with anti-human CD25-PE, CD54-PE, CD80-PE, CD69-FITC, CD83-FITC, or CD86-FITC mAb (BD Biosciences, Mississauga, ON). FMO controls including the Fixable Viability Dye and all the mAbs used were performed. Cells were analysed with a FACS Canto flow cytometer (BD Biosciences, Mississauga, ON) and data was analysed using FCS Express 4 (De Novo Software, Los Angeles, CA).

*Signal transduction experiments.* B cells were pre-treated for 45 min with the following pharmacological inhibitors: the PI3K inhibitor Wortmannin (0.625, 1.25, 2.5 and 5 nM) (InvivoGen, San Diego, CA), the p38 MAP kinase inhibitor SB203580 (1.25, 2.5, 5 and 10



$\mu\text{M}$ ) (Invitrogen, Burlington, ON), the Syk inhibitor IV (62.5, 125, 250, 500 and 1000 nM) (Calbiochem, EMD Millipore, Billerica, MA) and the calcium chelator BAPTA/AM (1.25, 2.5, 5 and 10  $\mu\text{M}$ ) (Calbiochem). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as drug carrier control. After incubation with *L. infantum* amastigotes, cell-free supernatants were harvested and IL-10 was quantified, as previously described. Cell viability was evaluated by flow cytometry after drug treatment using 7-AAD staining (Biolegend, San Diego, CA) as previously described (49).

*Conditioned media preparation.* Freshly purified B cells ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were incubated for 24 h in the presence of *L. infantum* amastigotes at the previously indicated ratio. Control supernatants were prepared by leaving B cells untreated for 24 h in culture media. To evaluate the effect of soluble factors produced by *L. infantum* amastigotes, an additional control was prepared by incubating parasites in the same condition but in the absence of B cells. After incubation, supernatants were harvested and centrifuged at 2000 x g for 10 min to eliminate cell debris and parasites. Finally, supernatants were filtered with a 0.22  $\mu\text{m}$  sterile syringe filter, aliquoted and frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until used. All the supernatants were tested for IL-10 content using a commercial ELISA kit as described above.

*Functional assays for CD4<sup>+</sup> T cells.* CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from PBMCs using a magnetic Easysep CD4<sup>+</sup> T-cell enrichment kit (Stemcell Technologies, Vancouver, BC) and CD25<sup>+</sup> T cells (activated T cells and Treg cells) were depleted with a CD25 positive selection kit (Stemcell Technologies, Vancouver, BC). For activation experiments, CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells were activated with plate-bound anti-CD3 (clone OKT3; used at 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and anti-CD28 mAbs (clone 9.3; used at 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 48 h in the presence or not of a 1:4 dilution of B-cell conditioned medium. Cells were then washed and stained with anti-human CD25-PE and CD69-FITC and analyzed by flow cytometry. For proliferation experiments, resting cells were stained with the carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) dye following manufacturer's instructions (Invitrogen, Burlington, ON), activated as previously described for 5 days and analyzed by flow cytometry. Production of TNF- $\alpha$  was evaluated by activating CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells with plate-bound anti-CD3 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the presence or not of a 1:4 dilution of B-cell conditioned medium for 72 h. Cells were then washed, fixed and permeabilized using the Cytofix Cytoperm kit (BD Biosciences,

Mississauga, ON) and finally stained with and anti-human TNF- $\alpha$ -PE (BD Biosciences, Mississauga, ON) before being analyzed by flow cytometry. In some cases, cell-free supernatants were pre-treated with a recombinant IL-10 soluble receptor alpha (R&D Systems, Minneapolis, MN) at 1  $\mu$ g/ml. In all the experiments, dead cells were excluded by 7-AAD staining, as previously described (49).

*Statistical analyses.* Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 6 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA). Two-tailed Student's t test was performed and a threshold of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

***L. infantum* amastigotes induce B-cell activation.** The potential outcome of an intimate contact between purified human B cells and *L. infantum* amastigotes was first assessed by monitoring surface expression of various cell activation markers by flow cytometry. Representative histograms of each activation marker tested and CD19 (used as a control) are shown in Fig. 1A. Results depicted in Fig. 1B indicate that a statistically significant increase in the percentage of CD25- and CD83-expressing B cells is observed following an interaction with the parasite. Moreover, the mean fluorescence intensities for all studied activation markers were also augmented in a statistically significant manner by a contact with *L. infantum* amastigotes (Fig. 1C). On the other hand, the broadest lineage-specific surface marker for B cells, CD19, remains stable despite an incubation step with the parasite. These results suggest that a physical contact between human B cells and *L. infantum* amastigotes is sufficient per se to induce cell activation.

Next, we evaluated whether the parasite can drive IL-10 expression and secretion in B cells. A dose-dependent increase in IL-10 mRNA expression was seen in response to *L. infantum* amastigotes (Fig. 2A). Similar results were obtained when measuring IL-10 secretion in cell-free supernatants using a commercial ELISA kit (Fig. 2B). Interestingly, the parasite-dependent induction of IL-10 mRNA was not seen when using heat-killed parasites (Fig. 2C). Although the promastigote form of the parasite induced IL-10 mRNA synthesis (Fig. 2C), albeit less efficiently than the amastigote form, it could not mediate human B cells to secrete IL-10 (Fig. 2D). The production of IL-10 was also determined by intracellular

staining. The percentage of IL-10-expressing cells was higher in B cells exposed to the parasite compared to untreated controls (Fig. 2E), and were identified as CD19<sup>+</sup>, as previously described (44, 46).

Taken together these results demonstrate that a contact with *L. infantum* amastigotes induces human B cells to express and secrete IL-10. It should be noted that IL-6, another anti-inflammatory cytokine, was also detected by ELISA with levels ranging from 600 to 4 000 pg/ml in conditioned media from B cells incubated with the parasite (data not shown).

**Phenotypic characterization of IL-10-secreting B cells.** Although there is currently no cell surface or intracellular phenotypic marker or set of markers unique to IL-10-producing B cells, CD27 is a well-characterized marker for memory B cells (50) which has been detected on some occasions in IL-10-secreting B cells (44, 46, 51). The overall surface expression of CD27 diminished after incubation with the parasite compared to control cells (Fig. 3A). However, the percentage of CD27-expressing cells was higher in IL-10-positive cells, in both experimental conditions (Fig. 3B). To further address the putative contribution of CD27 in the parasite-mediated B-cell response, additional experiments were performed using two distinct purified cell subpopulations (i.e. CD27<sup>-</sup> and CD27<sup>+</sup>). A greater proportion of B cells that are actively secreting IL-10 are found in the CD27<sup>-</sup> subpopulation (Fig. 3C), which is consistent with a previous study (44). These results suggest that *L. infantum* amastigotes initially drive IL-10 production in CD27<sup>-</sup> B cells and the parasite-dependent cell activation then leads to increased CD27 expression in IL-10-positive cells.

It has been established that transitional immature B cells (CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>) are the main source of IL-10 produced by circulating B cells (44). It has also been demonstrated that IL-10 is generated by CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> B cells and an enhancement of CD24 and CD38 is seen in IL-10-expressing cells (46). Based on this information, we monitored surface expression of both CD24 and CD38 markers on the total B-cell population after a contact with *L. infantum* amastigotes. Data depicted in Fig. 4A demonstrate that CD24 was decreased in a statistically significant manner on parasite-treated B cells when compared to control cells, thus suggesting B-cell activation (52). In contrast, CD38 was not affected upon exposure to

the parasite (Fig. 4B). The levels of CD24 and CD38 expression in relation to IL-10 production did not differ significantly (Fig. 4C). In order to determine the importance of CD24<sup>+</sup> and/or CD38<sup>+</sup> cells with respect to IL-10 secretion in response to *L. infantum* amastigotes, subsequent experiments were performed with three distinct purified B-cell subsets (i.e. CD24<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> and CD24<sup>-</sup> CD38<sup>+</sup>). The parasite-mediated induction of IL-10 is seen exclusively in the two CD24-expressing B-cell subsets irrespective of CD38 expression (i.e. CD24<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> and CD24<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>) (Fig. 4D). This observation is in agreement with some previous findings but not using a protozoan parasite such as *L. infantum* (44, 46).

Parasite-mediated IL-10 production involves signaling via Syk, phosphatidylinositol 3-kinase, p38 and requires intracellular calcium. Secretion of IL-10 by macrophages and T cells has been shown to be mostly dependent on ERK and c-Maf signaling pathways although other second messengers such as p38 and NF-κB were involved as well (53-60). In B cells, and particularly in murine regulatory B cells, IL-10 secretion has been suggested to be dependent on B-cell receptor (BCR)-derived signals leading to Syk activation and an increase in intracellular calcium but also on Toll-like receptor (TLR) expression (41, 61, 62). A panel of various signal transduction inhibitors was thus tested in order to shed light on the signal transduction pathways and molecular mechanisms that drive IL-10 production once human B cells are put in contact with *L. infantum* amastigotes. To this end, B cells were thus pretreated with increasing concentrations of inhibitors directed against Btk (i.e. LFM-A13), ERK (i.e. PD98059), p38 (i.e. SB203580), protein kinase C (i.e. R318220), Syk (i.e. BAY 61-3606, also called Syk Inhibitor IV), and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (i.e. Wortmannin) prior to exposure to the parasite. A dose-dependent inhibition of IL-10 secretion was observed only in the presence of inhibitors against Syk, PI3K and p38 (Fig. 5, panels A to C). No such decrease in the parasite-mediated induction of IL-10 was seen with compounds directed against protein kinase C, ERK or Btk (data not shown). The role of intracellular calcium signaling was also investigated by pretreating B cells with increasing concentrations of the intracellular calcium chelator BAPTA/AM. A dose-dependent inhibition of IL-10 secretion in the presence of BAPTA/AM was detected (Fig.

5D), which is in line with a previous observation made with murine B cells (61). Cell viability following drug treatment was evaluated by flow cytometry using 7-AAD staining of dead cells and no differences were observed between control samples and those treated with each drug at the various concentrations tested (data not shown).

**Conditioned medium from parasite-treated B cells inhibits several functions of CD4<sup>+</sup> T cells.** Regulatory B cells have been shown previously to modulate CD4<sup>+</sup> T-cell functions through different mechanisms involving soluble factors such as IL-10 (44, 51). Based on this information, we assessed whether conditioned media from human B cells inoculated with *L. infantum* amastigotes can modulate some basic functions of CD4<sup>+</sup> T-cell. It should be noted that CD25<sup>+</sup> expressing CD4<sup>+</sup> T-cell were depleted initially to remove Tregs because it might represent a confounding factor. Results depicted in Fig. 6A indicate that soluble factors present in conditioned media from parasite-treated human B cells induce a statistically significant decrease in expression of the classical activation markers CD25 and CD69 on the surface of CD4<sup>+</sup> T cells stimulated with plate-bound anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. A similar finding was made when measuring cell proliferation with the CFSE dye (Fig. 6B).

Secretion of TNF- $\alpha$  by activated CD4<sup>+</sup> T-cell is a well-recognized marker of their pro-inflammatory function (63, 64). We thus assessed intracellular TNF- $\alpha$  expression in CD4<sup>+</sup> T-cell treated with conditioned media from parasite-treated human B cells. A statistically significant diminution in the percentage of TNF- $\alpha$ -producing CD4<sup>+</sup> T-cell was seen following incubation with conditioned media from human B cells incubated with *L. infantum* amastigotes (Fig. 7), which was partially but not completely inhibited in presence of a neutralizing soluble IL-10 receptor.

## **Discussion**

The biological contribution of IL-10 for the visceralization of *L. infantum* has been well-established (7, 16, 65-69). Moreover, the importance of B cells as a source of IL-10 in murine models of *L. major* infection and visceral leishmaniasis has already been described (27, 28). However, the direct involvement of human B cells to the elevated levels of plasma

IL-10 following *L. infantum* infection remains undefined. In the current study, we first demonstrate that *in vitro* incubation of *L. infantum* amastigotes with purified human B cells increases expression of activation markers such as CD25 and CD83 (Fig. 1). This is in agreement with the previously reported activation of murine B cells by a *L. infantum* cytosolic trypanothione (40) and the demonstrated B-cell activation in patients with localized cutaneous leishmaniasis (70). We also report that interactions between the parasite and human B cells induce a dose-dependent up-regulation of IL-10 mRNA expression and cytokine secretion (Fig. 2). The parasite-mediated production of IL-10 by human B cells was neither seen with parasites under the flagellated promastigote form (the life cycle stage in the insect) nor with paraformaldehyde-killed amastigotes (Fig. 3), therefore suggesting that live parasites under the nonflagellated amastigote stage (normally found in the macrophage phagolysosomal compartment of the mammalian host) are required to mediate the observed phenomenon. Intracellular staining by flow cytometry revealed that IL-10-expressing cells correspond to the CD19 compartment, as it has been previously described for other type of stimulations (44, 46).

Although regulatory B cells and IL-10 secretion by B cells have been observed in humans (44, 46, 71), the precise phenotype of such cells is still elusive. It has been previously shown that stimulation of human B cells with CpG and anti-IgG drives IL-10 secretion by memory B cells (IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>) after a short period of treatment (i.e. 5 hours), whereas naïve B cells were shown to produce IL-10 following a longer period of stimulation with the same agonists (i.e. 48 hours) (51). The controversy surrounding the phenotypic characterization of IL-10-producing B cells is further supported by the previous findings made by Iwata and colleagues who have shown that the CD27<sup>+</sup> subpopulation can respond to CpG and CD40L by expressing IL-10 (46) and Blair and co-workers who have established that IL-10-producing B cells following stimulation with CD40L correspond to the CD27<sup>-</sup> subset (44). Our own results indicate that CD27 expression decreases in the whole population of human B cells following treatment with *L. infantum* amastigotes (Fig. 4A). This might suggest a decrease of the memory B cell population, as it was observed for other infections, including HIV-1 (72, 73). Upon closer examination of the data, we detected an increase of CD27 expression on IL-10-positive B cells compared to cells negative for IL-10 following a treatment with the parasite (Fig. 4B). This would rather

imply a specific B-cell activation and differentiation of naïve CD27<sup>-</sup> B cells towards an effector/memory CD27<sup>+</sup> phenotype. These observations are in line with results obtained by Bouaziz and colleagues (51).

The transitional immature B cell subset (CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>) has been proposed as the main producer of IL-10 by the B-cell population (44). However, in another study, the IL-10-secreting cells were predominantly found in the CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> B-cell population (46). Considering that a consensus on CD24 expression seemed to emerge as a hallmark for IL-10-secreting human B cells, we monitored expression of this surface marker upon incubation of human B cells with *L. infantum* amastigotes. We report herein that the parasite induces a reduced expression of CD24 (Fig. 4A), indicative of B-cell activation (74, 75), with no effect on CD38 (Fig. 4B) irrespective of cells producing or not IL-10 (Fig. 4C). Altogether, these results suggest that the phenotype of IL-10-secreting B cells following incubation with *L. infantum* is different from those that were described previously. In a related set of experiments, we used different purified B-cell subsets (i.e. CD24<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup> and CD38<sup>+</sup>) and were able to reveal the importance of CD24<sup>+</sup> cells, but not CD38<sup>+</sup> for the secretion of IL-10 by B cells in response to *L. infantum* amastigotes (Fig. 4D). Surprisingly, only the CD27-negative B-cell subpopulation responded to the parasite by producing IL-10 (Fig. 3C). This suggests a quite different IL-10-secreting B-cell subset from those that were previously described both in human *in vitro* and murine *in vivo* models (27, 41, 44, 46). While it is assumed that phenotypic characteristics of IL-10-producer cells might differ according to the stimuli to which they are exposed, this CD24<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> human B-cell subpopulation seems to respond to *L. infantum* amastigotes by secreting high levels of IL-10. Given that our experimental procedures involved a short incubation period between human B cells and parasites (i.e. 24 h) without involvement of CD40 signaling, we postulate that such a CD40-independent activation of B cells would arise as part of an innate response, which could be exploited by the parasite.

A very close physical contact between human B cells and *L. infantum* amastigotes was observed under the microscope and the use of a galactose-modified PBS/EDTA solution was required to efficiently separate the two distinct entities and obtain single-cell suspensions prior to flow cytometry analyses (unpublished observations). The ability of

galactose to take apart B cells and parasites suggests the involvement of a galactose-specific lectin. Multiple lectins can transduce signals in response to ligand binding and some of them have been shown to bear one or multiple intracellular tyrosine-based activation motifs (ITAM) that can signal through Syk, intracellular calcium and PI3K to activate endocytosis, cell proliferation and gene transcription (76-79). The protozoan parasite *Leishmania* has been shown to be bound by various lectins, including plant lectins as well as mammalian C-type lectins and galectins (80-86). Lectin ligands on *Leishmania* have been shown to be both species- and stage-specific which complicates their identification and the study of their functionality (83, 84, 86). *Leishmania* can also trigger TLR signaling, mostly via TLR2, TLR4 and TLR9 (26, 65, 87-91). In mice, TLR signaling through Myd88 was shown to be essential for the clearance of the pathogen (92). It has been shown that TLR4 and TLR9 agonists induce IL-10 in murine B cells which can modulate T-cell responses (41, 46). Altogether, these observations suggest that *Leishmania* induces activation of regulatory B cells via a TLR-dependent pathway. Experiments aimed at evaluating the putative contribution of TLR- and Myd88-mediated signal transduction pathways in the parasite-induced IL-10 secretion were unsuccessful due to technical limitations related to a low transfection efficiency in primary human B cells and unstable or inefficient commercial inhibitory peptides (data not shown). However, we could not detect any parasite-induced secretion of type-I IFN in human B cells, as monitored with the reporter cell line HEK-Blue™ IFN $\alpha/\beta$ , using various parasites to cell ratios and different incubation periods (i.e. 6 and 2h) (data not shown). As type-I IFN production is a hallmark output of TLR signaling, we conclude that the parasite-triggered IL-10 secretion does not rely on TLR. Production of IL-10 by regulatory B cells in peripheral blood was also shown to be dependent on BCR, ERK and intracellular calcium (41, 61). We could not observe any modulatory effect of the highly specific ERK inhibitor PD98059 on IL-10 secretion following incubation with *L. infantum* amastigotes. Similarly, the BTK inhibitor LFM-A13 and the PKC inhibitor R $\delta$ 318220 did not affect parasite-mediated IL-10 secretion. ERK, BTK and PKC are known to be important for signal transduction via the BCR (93-96). Our experiments instead suggest that parasite-stimulated upregulation of IL-10 secretion in human B cells is dependent on Syk, PI3K, p38 and intracellular calcium (Fig. 5), which would again point towards a C-type lectin-mediated signal transduction pathway.



Regulatory B cells are characterized by their ability to modulate different functions of CD4<sup>+</sup> T-cells including activation, proliferation and production of pro-inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . They can also significantly regulate some biological functions of monocytes and dendritic cells (44, 46, 51, 97). Among their described mechanisms of action, IL-10 remains the principal soluble factor involved but modulation of cell function through TGF- $\beta$  has also been described in the murine model (98). Direct interaction may also be at play since Blair and co-workers have reported that CD80 and CD86 interactions between B cells and CD4<sup>+</sup> T-cells act synergistically with B cell-derived IL-10 to suppress CD4<sup>+</sup> T-cells cytokine production (44). Our data demonstrate that soluble factors secreted by human B cells following a contact with *L. infantum* amastigotes can inhibit proliferation of CD25-depleted CD4<sup>+</sup> T-cells (Fig. 6B), which corroborates a previous work using human B cells treated with a combination of a TLR9 agonist (i.e. CpG-B) and anti-Ig antibodies (51). Although it was previously shown that inhibition of CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation was partially mediated by IL-10 (51), we did not observe a complete restoration of cell proliferation by neutralizing IL-10 in the cell supernatant via addition of a soluble IL-10 receptor (data not shown). Moreover, when similar experiments were conducted using conditioned media from sorted CD27<sup>+</sup> and CD27<sup>-</sup> B cells, no differences were observed on the level of inhibition between supernatants from the different populations (data not shown). These results lead us to propose that impairment of CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation by soluble factors secreted by human B cells incubated with *L. infantum* amastigotes is independent of IL-10. Production of TNF- $\alpha$  by CD4<sup>+</sup> T-cells following antigenic stimulation can be used as a functional marker (63, 64). It was established that conditioned media from CPG/anti-Ig-treated B cells can inhibit TNF- $\alpha$  production by antigen-stimulated CD4<sup>+</sup> T-cells but that this effect was not relying on IL-10 (46). Interestingly, TNF- $\alpha$  secretion by monocytes was demonstrated to be affected by conditioned media from B cells in an IL-10-dependent manner (46). In our hands, when CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells were activated in the presence of conditioned media from B cells exposed to *L. infantum* amastigotes, we observed a significant decrease of TNF- $\alpha$  production, which was partially reverted when adding a soluble IL-10 receptor (Fig. 7). It can be hypothesized that the modulation of CD4<sup>+</sup> T cell functions exerted by conditioned media from parasite-treated human B cells is due to a multifactorial process that includes

IL-10 and some unknown factor(s). The parasite-directed enhancement in CD80 and CD86 expression in human B cells might be involved but we were unable to evaluate this possibility due to technical limitations related to parasite growth (data not shown).

The systemic dissemination of pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Mycobacterium tuberculosis* and Herpesviruses has been linked with their ability to induce IL-10 secretion in immune cells (99-103). More relevant to the present study, IL-10 secretion is crucial for the visceralization of *L. infantum* in mice (16, 104-106) and increased levels of IL-10 are found in the serum of patients suffering from VL (12, 34, 67, 70). The contribution of B cells to the production of IL-10 in response to *Leishmania* has also been described in the mouse model (27, 28) but no information can be found in humans. Herein, we report that *L. infantum* amastigotes can induce secretion of IL-10 and other(s) unknown events in a specific subset of human B cells (i.e. CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) that can modulate CD4<sup>+</sup> T-cell functions. Further studies are warranted to determine the clinical importance of this phenomenon and whether induction of IL-10 by *L. infantum* amastigotes is part of an immune evasion strategy that would allow the dissemination and visceralization of this parasite.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the Bio-Imaging platform from the Centre de Recherche en Infectiologie, Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Québec - pavillon CHUL. This work was performed by Rym Menasria and Alejandro Martin Gomez in partial fulfillment of their M.Sc and Ph.D. Degrees, respectively, in the Program of Microbiology-Immunology, Faculty of Medicine, Université Laval.

## References

1. Kaye, P., and P. Scott. 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* 9:604-615.
2. Naderer, T., and M. J. McConville. 2008. The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cellular microbiology* 10:301-308.
3. Handman, E., and D. V. Bullen. 2002. Interaction of Leishmania with the host macrophage. *Trends in parasitology* 18:332-334.
4. 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* 154:4623-4629.
5. Sacks, D. L., S. L. Lal, S. N. Shrivastava, J. Blackwell, and F. A. Neva. 1987. An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar. *J Immunol* 138:908-913.
6. Garg, R., S. K. Gupta, P. Tripathi, S. Naik, S. Sundar, and A. Dube. 2005. Immunostimulatory cellular responses of cured Leishmania-infected patients and hamsters against the integral membrane proteins and non-membranous soluble proteins of a recent clinical isolate of Leishmania donovani. *Clinical and experimental immunology* 140:149-156.
7. Ghalib, H. W., M. R. Piuvezam, Y. A. Skeiky, M. Siddig, F. A. Hashim, A. M. el-Hassan, D. M. Russo, and S. G. Reed. 1993. Interleukin 10 production correlates with pathology in human Leishmania donovani infections. *The Journal of clinical investigation* 92:324-329.
8. Karp, C. L., S. H. el-Safi, T. A. Wynn, M. M. Satti, A. M. Kordofani, F. A. Hashim, M. Hag-Ali, F. A. Neva, T. B. Nutman, and D. L. Sacks. 1993. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *The Journal of clinical investigation* 91:1644-1648.
9. Kenney, R. T., D. L. Sacks, A. A. Gam, H. W. Murray, and S. Sundar. 1998. Splenic cytokine responses in Indian kala-azar before and after treatment. *The Journal of infectious diseases* 177:815-818.
10. White, A. C., Jr., M. Castes, L. Garcia, D. Trujillo, and L. Zambrano. 1992. Leishmania chagasi antigens recognized in cured visceral leishmaniasis and asymptomatic infection. *Am J Trop Med Hyg* 46:123-131.

11. Babaloo, Z., P. M. Kaye, and M. B. Eslami. 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.
12. Gama, M. E., J. M. Costa, J. C. Pereira, C. M. Gomes, and C. E. Corbett. 2004. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 37:129-136.
13. Nylen, S., R. Maurya, L. Eidsmo, K. D. Manandhar, S. Sundar, and D. Sacks. 2007. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. *The Journal of experimental medicine* 204:805-817.
14. Verma, S., R. Kumar, G. K. Katara, L. C. Singh, N. S. Negi, V. Ramesh, and P. Salotra. 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.
15. Gautam, S., R. Kumar, R. Maurya, S. Nylen, N. Ansari, M. Rai, S. Sundar, and D. Sacks. 2011. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases* 204:1134-1137.
16. Murphy, M. L., U. Wille, E. N. Villegas, C. A. Hunter, and J. P. Farrell. 2001. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *European journal of immunology* 31:2848-2856.
17. Coelho, Z. C., M. J. Teixeira, E. F. Mota, M. S. Frutuoso, J. S. Silva, A. Barral, M. Barral-Netto, and M. M. Pompeu. 2010. In vitro initial immune response against *Leishmania amazonensis* infection is characterized by an increased production of IL-10 and IL-13. *Braz J Infect Dis* 14:476-482.
18. Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, S. Mendez, E. M. Shevach, and D. L. Sacks. 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature* 420:502-507.
19. Anderson, C. F., M. Oukka, V. J. Kuchroo, and D. Sacks. 2007. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *The Journal of experimental medicine* 204:285-297.
20. Stager, S., A. Maroof, S. Zubairi, S. L. Sanos, M. Kopf, and P. M. Kaye. 2006. Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10+ CD4+ T cells. *European journal of immunology* 36:1764-1771.

21. Owens, B. M., L. Beattie, J. W. Moore, N. Brown, J. L. Mann, J. E. Dalton, A. Maroof, and P. M. Kaye. 2012. IL-10-producing Th1 cells and disease progression are regulated by distinct CD11c(+) cell populations during visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog* 8:e1002827.
22. Belkaid, Y., K. F. Hoffmann, S. Mendez, S. Kamhawi, M. C. Udey, T. A. Wynn, and D. L. Sacks. 2001. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *The Journal of experimental medicine* 194:1497-1506.
23. Maroof, A., L. Beattie, S. Zubairi, M. Svensson, S. Stager, and P. M. Kaye. 2008. Posttranscriptional regulation of *II10* gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. *Immunity* 29:295-305.
24. Svensson, M., A. Maroof, M. Ato, and P. M. Kaye. 2004. Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells. *Immunity* 21:805-816.
25. Miles, S. A., S. M. Conrad, R. G. Alves, S. M. Jeronimo, and D. M. Mosser. 2005. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *The Journal of experimental medicine* 201:747-754.
26. Charmoy, M., R. Megnekou, C. Allenbach, C. Zweifel, C. Perez, K. Monnat, M. Breton, C. Ronet, P. Launois, and F. Tacchini-Cottier. 2007. *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *Journal of leukocyte biology* 82:288-299.
27. Ronet, C., Y. Hauyon-La Torre, M. Revaz-Breton, B. Mastelic, F. Tacchini-Cottier, J. Louis, and P. Launois. 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.
28. Deak, E., A. Jayakumar, K. W. Cho, K. Goldsmith-Pestana, B. Dondji, J. D. Lambris, and D. McMahon-Pratt. 2010. Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. *European journal of immunology* 40:1355-1368.
29. Mege, J. L., S. Meghari, A. Honstetter, C. Capo, and D. Raoult. 2006. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 6:557-569.
30. Bankoti, R., K. Gupta, A. Levchenko, and S. Stager. 2012. Marginal zone B cells regulate antigen-specific T cell responses during infection. *J Immunol* 188:3961-3971.

31. 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* 164:3681-3688.
32. Casato, M., F. G. de Rosa, L. P. Pucillo, I. Ilardi, B. di Vico, L. R. Zorzin, M. L. Sorgi, P. Fiaschetti, R. Coviello, B. Lagana, and M. Fiorilli. 1999. Mixed cryoglobulinemia secondary to visceral Leishmaniasis. *Arthritis Rheum* 42:2007-2011.
33. Louzir, H., L. Belal-Kacemi, A. Sassi, D. Laouini, R. Ben Ismail, and K. Dellagi. 1994. Natural autoantibodies, IgG antibodies to tetanus toxoid and CD5+ B cells in patients with Mediterranean visceral leishmaniasis. The Leishmania Study Group. *Clinical and experimental immunology* 95:479-484.
34. Galvao-Castro, B., J. A. Sa Ferreira, K. F. Marzochi, M. C. Marzochi, S. G. Coutinho, and P. H. Lambert. 1984. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. *Clinical and experimental immunology* 56:58-66.
35. Bohme, M. W., D. A. Evans, M. A. Miles, and E. J. Holborow. 1986. Occurrence of autoantibodies to intermediate filament proteins in human visceral leishmaniasis and their induction by experimental polyclonal B-cell activation. *Immunology* 59:583-588.
36. Lohoff, M., C. Matzner, and M. Rollinghoff. 1988. Polyclonal B-cell stimulation by L3T4+ T cells in experimental leishmaniasis. *Infection and immunity* 56:2120-2124.
37. Gessner, A., A. Will, M. Vieth, K. Schroppel, and M. Rollinghoff. 1995. Stimulation of B-cell lymphopoiesis by interleukin-7 leads to aggravation of murine leishmaniasis. *Immunology* 84:416-422.
38. Ronet, C., H. Voigt, H. Himmelrich, M. A. Doucey, Y. Hauyon-La Torre, M. Revaz-Breton, F. Tacchini-Cottier, C. Bron, J. Louis, and P. Launois. 2008. *Leishmania* major-specific B cells are necessary for Th2 cell development and susceptibility to *L. major* LV39 in BALB/c mice. *J Immunol* 180:4825-4835.
39. Mitchell, G. F. 1983. Murine cutaneous leishmaniasis: resistance in reconstituted nude mice and several F1 hybrids infected with *Leishmania tropica* major. *J Immunogenet* 10:395-412.
40. Cabral, S. M., R. L. Silvestre, N. M. Santarem, J. C. Tavares, A. F. Silva, and A. Cordeiro-da-Silva. 2008. A *Leishmania infantum* cytosolic trypanothione reductase activates B cells to secrete interleukin-10 and specific immunoglobulin. *Immunology* 123:555-565.

41. Yanaba, K., J. D. Bouaziz, T. Matsushita, T. Tsubata, and T. F. Tedder. 2009. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol* 182:7459-7472.
42. Fares, R. C., R. Correa-Oliveira, F. F. de Araujo, T. S. Keesen, A. T. Chaves, J. A. Fiuza, K. S. Ferreira, M. O. Rocha, and J. A. Gomes. 2013. Identification of phenotypic markers of B cells from patients with Chagas disease. *Parasite immunology* 35:214-223.
43. Zhang, M., X. Zheng, J. Zhang, Y. Zhu, X. Zhu, H. Liu, M. Zeng, M. W. Graner, B. Zhou, and X. Chen. 2012. CD19(+)CD1d(+)CD5(+) B cell frequencies are increased in patients with tuberculosis and suppress Th17 responses. *Cell Immunol* 274:89-97.
44. Blair, P. A., L. Y. Norena, F. Flores-Borja, D. J. Rawlings, D. A. Isenberg, M. R. Ehrenstein, and C. Mauri. 2010. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 32:129-140.
45. Mauri, C. 2010. Regulation of immunity and autoimmunity by B cells. *Current opinion in immunology* 22:761-767.
46. Iwata, Y., T. Matsushita, M. Horikawa, D. J. Dilillo, K. Yanaba, G. M. Venturi, P. M. Szabolcs, S. H. Bernstein, C. M. Magro, A. D. Williams, R. P. Hall, E. W. St Clair, and T. F. Tedder. 2011. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 117:530-541.
47. Sereno, D., and J. L. Lemesre. 1997. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 41:972-976.
48. Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
49. Schmid, I., C. H. Uittenbogaart, B. Keld, and J. V. Giorgi. 1994. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *Journal of immunological methods* 170:145-157.
50. Agematsu, K., S. Hokibara, H. Nagumo, and A. Komiyama. 2000. CD27: a memory B-cell marker. *Immunology today* 21:204-206.
51. Bouaziz, J. D., S. Calbo, M. Maho-Vaillant, A. Saussine, M. Bagot, A. Bensussan, and P. Musette. 2010. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *European journal of immunology* 40:2686-2691.

52. Kay, R., P. M. Rosten, and R. K. Humphries. 1991. CD24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. *J Immunol* 147:1412-1416.
53. Dobрева, Z. G., L. D. Miteva, and S. A. Stanilova. 2009. The inhibition of JNK and p38 MAPKs downregulates IL-10 and differentially affects c-Jun gene expression in human monocytes. *Immunopharmacology and immunotoxicology* 31:195-201.
54. Bode, J. G., C. Ehrling, and D. Haussinger. 2012. The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis. *Cellular signalling* 24:1185-1194.
55. Hou, J., L. Wang, R. Quan, Y. Fu, H. Zhang, and W. H. Feng. 2012. Induction of interleukin-10 is dependent on p38 mitogen-activated protein kinase pathway in macrophages infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology journal* 9:165.
56. Lucas, M., X. Zhang, V. Prasanna, and D. M. Mosser. 2005. ERK activation following macrophage FcγR ligation leads to chromatin modifications at the IL-10 locus. *J Immunol* 175:469-477.
57. Yi, A. K., J. G. Yoon, S. J. Yeo, S. C. Hong, B. K. English, and A. M. Krieg. 2002. Role of mitogen-activated protein kinases in CpG DNA-mediated IL-10 and IL-12 production: central role of extracellular signal-regulated kinase in the negative feedback loop of the CpG DNA-mediated Th1 response. *J Immunol* 168:4711-4720.
58. Cao, S., J. Liu, M. Chesi, P. L. Bergsagel, I. C. Ho, R. P. Donnelly, and X. Ma. 2002. Differential regulation of IL-12 and IL-10 gene expression in macrophages by the basic leucine zipper transcription factor c-Maf fibrosarcoma. *J Immunol* 169:5715-5725.
59. Cao, S., J. Liu, L. Song, and X. Ma. 2005. The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. *J Immunol* 174:3484-3492.
60. Xu, J., Y. Yang, G. Qiu, G. Lal, Z. Wu, D. E. Levy, J. C. Ochando, J. S. Bromberg, and Y. Ding. 2009. c-Maf regulates IL-10 expression during Th17 polarization. *J Immunol* 182:6226-6236.
61. Matsumoto, M., Y. Fujii, A. Baba, M. Hikida, T. Kurosaki, and Y. Baba. 2011. The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production. *Immunity* 34:703-714.
62. Hanihara, F., Y. Takahashi, A. Okuma, T. Ohba, and T. Muta. 2013. Transcriptional and post-transcriptional regulation of IkappaB-zeta upon engagement of the BCR, TLRs and FcγR. *International immunology* 25:531-544.



63. Cantor, J., and K. Haskins. 2005. Effector function of diabetogenic CD4 Th1 T cell clones: a central role for TNF-alpha. *J Immunol* 175:7738-7745.
64. Pawelec, G., K. Schaudt, A. Rehbein, and F. W. Busch. 1989. Differential secretion of tumor necrosis factor-alpha and granulocyte/macrophage colony-stimulating factors but not interferon-gamma from CD4+ compared to CD8+ human T cell clones. *European journal of immunology* 19:197-200.
65. Cheekatla, S. S., A. Aggarwal, and S. Naik. 2012. mTOR signaling pathway regulates the IL-12/IL-10 axis in *Leishmania donovani* infection. *Medical microbiology and immunology* 201:37-46.
66. Alves, C. F., I. F. de Amorim, E. P. Moura, R. R. Ribeiro, M. S. Michalick, E. Kalapothakis, O. Bruna-Romero, W. L. Tafuri, M. M. Teixeira, and M. N. Melo. 2009. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary immunology and immunopathology* 128:349-358.
67. Nylén, S., and D. Sacks. 2007. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends in immunology* 28:378-384.
68. Bacellar, O., A. D'Oliveira, Jr., S. Jeronimo, and E. M. Carvalho. 2000. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine* 12:1228-1231.
69. Gasim, S., A. M. Elhassan, E. A. Khalil, A. Ismail, A. M. Kadaru, A. Kharazmi, and T. G. Theander. 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. *Clinical and experimental immunology* 111:64-69.
70. Freitas-Teixeira, P. M., D. Silveira-Lemos, R. C. Giunchetti, A. Baratta-Masini, W. Mayrink, V. Peruhype-Magalhaes, R. D. Rocha, A. C. Campi-Azevedo, A. Teixeira-Carvalho, and O. A. Martins-Filho. 2012. Distinct pattern of immunophenotypic features of innate and adaptive immunity as a putative signature of clinical and laboratorial status of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Scandinavian journal of immunology* 76:421-432.
71. Duddy, M., M. Niino, F. Adatia, S. Hebert, M. Freedman, H. Atkins, H. J. Kim, and A. Bar-Or. 2007. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol* 178:6092-6099.
72. Perise-Barrios, A. J., M. A. Munoz-Fernandez, and M. Pion. 2012. Direct phenotypical and functional dysregulation of primary human B cells by human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in vitro. *PloS one* 7:e39472.

73. Pensieroso, S., L. Galli, S. Nozza, N. Ruffin, A. Castagna, G. Tambussi, B. Hejdeman, D. Misciagna, A. Riva, M. Malnati, F. Chiodi, and G. Scarlatti. 2013. B-cell subset alterations and correlated factors in HIV-1 infection. *AIDS* 27:1209-1217.
74. Bruce, J., F. W. Symington, T. J. McKearn, and J. Sprent. 1981. A monoclonal antibody discriminating between subsets of T and B cells. *J Immunol* 127:2496-2501.
75. Hardy, R. R., C. E. Carmack, S. A. Shinton, J. D. Kemp, and K. Hayakawa. 1991. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *The Journal of experimental medicine* 173:1213-1225.
76. Caparros, E., P. Munoz, E. Sierra-Filardi, D. Serrano-Gomez, A. Puig-Kroger, J. L. Rodriguez-Fernandez, M. Mellado, J. Sancho, M. Zubiaur, and A. L. Corbi. 2006. DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood* 107:3950-3958.
77. Kingeter, L. M., and X. Lin. 2012. C-type lectin receptor-induced NF-kappaB activation in innate immune and inflammatory responses. *Cellular & molecular immunology* 9:105-112.
78. Hughes, C. E., A. Y. Pollitt, J. Mori, J. A. Eble, M. G. Tomlinson, J. H. Hartwig, C. A. O'Callaghan, K. Futterer, and S. P. Watson. 2010. CLEC-2 activates Syk through dimerization. *Blood* 115:2947-2955.
79. Yamasaki, S., E. Ishikawa, M. Sakuma, H. Hara, K. Ogata, and T. Saito. 2008. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nature immunology* 9:1179-1188.
80. Caparros, E., D. Serrano, A. Puig-Kroger, L. Riola, F. Lasala, I. Martinez, F. Vidal-Vanaclocha, R. Delgado, J. L. Rodriguez-Fernandez, L. Rivas, A. L. Corbi, and M. Colmenares. 2005. Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in *Leishmania* interaction with host phagocytes. *Immunobiology* 210:185-193.
81. Lefevre, L., G. Lugo-Villarino, E. Meunier, A. Valentin, D. Olganier, H. Authier, C. Duval, C. Dardenne, J. Bernad, J. L. Lemesre, J. Auwerx, O. Neyrolles, B. Pipy, and A. Coste. 2013. The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to *Leishmania infantum*. *Immunity* 38:1038-1049.
82. Pelletier, I., T. Hashidate, T. Urashima, N. Nishi, T. Nakamura, M. Futai, Y. Arata, K. Kasai, M. Hirashima, J. Hirabayashi, and S. Sato. 2003. Specific recognition of *Leishmania major* poly-beta-galactosyl epitopes by galectin-9: possible implication of galectin-9 in interaction between *L. major* and host cells. *The Journal of biological chemistry* 278:22223-22230.

83. Pelletier, I., and S. Sato. 2002. Specific recognition and cleavage of galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope. *The Journal of biological chemistry* 277:17663-17670.
84. Wilson, M. E., and R. D. Pearson. 1984. Stage-specific variations in lectin binding to *Leishmania donovani*. *Infection and immunity* 46:128-134.
85. Dwyer, D. M. 1977. *Leishmania donovani*: surface membrane carbohydrates of promastigotes. *Experimental parasitology* 41:341-358.
86. Dawidowicz, K., A. G. Hernandez, R. B. Infante, and J. Convit. 1975. The surface membrane of *Leishmania*. I. The effects of lectins on different stages of *Leishmania braziliensis*. *The Journal of parasitology* 61:950-953.
87. Revaz-Breton, M., C. Ronet, A. Ives, Y. H. Torre, S. Masina, F. Tacchini-Cottier, and P. Launois. 2010. The MyD88 protein 88 pathway is differently involved in immune responses induced by distinct substrains of *Leishmania major*. *European journal of immunology* 40:1697-1707.
88. Weinkopff, T., A. Mariotto, G. Simon, Y. Hauyon-La Torre, F. Auderset, S. Schuster, H. Zangger, N. Fasel, A. Barral, and F. Tacchini-Cottier. 2013. Role of Toll-like receptor 9 signaling in experimental *Leishmania braziliensis* infection. *Infection and immunity* 81:1575-1584.
89. Liese, J., U. Schleicher, and C. Bogdan. 2007. TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. *European journal of immunology* 37:3424-3434.
90. Flandin, J. F., F. Chano, and A. Descoteaux. 2006. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *European journal of immunology* 36:411-420.
91. Hawn, T. R., A. Ozinsky, D. M. Underhill, F. S. Buckner, S. Akira, and A. Aderem. 2002. *Leishmania major* activates IL-1 alpha expression in macrophages through a MyD88-dependent pathway. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 4:763-771.
92. de Veer, M. J., J. M. Curtis, T. M. Baldwin, J. A. DiDonato, A. Sexton, M. J. McConville, E. Handman, and L. Schofield. 2003. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *European journal of immunology* 33:2822-2831.
93. Kurosaki, T. 1997. Molecular mechanisms in B cell antigen receptor signaling. *Current opinion in immunology* 9:309-318.

94. Kurosaki, T. 2000. Functional dissection of BCR signaling pathways. *Current opinion in immunology* 12:276-281.
95. Carpenter, C. L. 2004. Btk-dependent regulation of phosphoinositide synthesis. *Biochemical Society transactions* 32:326-329.
96. Guo, B., T. T. Su, and D. J. Rawlings. 2004. Protein kinase C family functions in B-cell activation. *Current opinion in immunology* 16:367-373.
97. Morva, A., S. Lemoine, A. Achour, J. O. Pers, P. Youinou, and C. Jamin. 2012. Maturation and function of human dendritic cells are regulated by B lymphocytes. *Blood* 119:106-114.
98. Tian, J., D. Zekzer, L. Hanssen, Y. Lu, A. Olcott, and D. L. Kaufman. 2001. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 167:1081-1089.
99. Stack, G., M. A. Stacey, and I. R. Humphreys. 2012. Herpesvirus exploitation of host immune inhibitory pathways. *Viruses* 4:1182-1201.
100. Redford, P. S., A. Boonstra, S. Read, J. Pitt, C. Graham, E. Stavropoulos, G. J. Bancroft, and A. O'Garra. 2010. Enhanced protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection in IL-10-deficient mice is accompanied by early and enhanced Th1 responses in the lung. *European journal of immunology* 40:2200-2210.
101. Chau, T. A., M. L. McCully, W. Brintnell, G. An, K. J. Kasper, E. D. Vines, P. Kubes, S. M. Haeryfar, J. K. McCormick, E. Cairns, D. E. Heinrichs, and J. Madrenas. 2009. Toll-like receptor 2 ligands on the staphylococcal cell wall downregulate superantigen-induced T cell activation and prevent toxic shock syndrome. *Nature medicine* 15:641-648.
102. Frodermann, V., T. A. Chau, S. Sayedyahosseini, J. M. Toth, D. E. Heinrichs, and J. Madrenas. 2011. A modulatory interleukin-10 response to staphylococcal peptidoglycan prevents Th1/Th17 adaptive immunity to *Staphylococcus aureus*. *The Journal of infectious diseases* 204:253-262.
103. Gaddis, D. E., C. L. Maynard, C. T. Weaver, S. M. Michalek, and J. Katz. 2013. Role of TLR2-dependent IL-10 production in the inhibition of the initial IFN-gamma T cell response to *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of leukocyte biology* 93:21-31.
104. Murray, H. W., C. M. Lu, S. Mauze, S. Freeman, A. L. Moreira, G. Kaplan, and R. L. Coffman. 2002. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infection and immunity* 70:6284-6293.

105. Padigel, U. M., J. Alexander, and J. P. Farrell. 2003. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J Immunol* 171:3705-3710.
106. Stager, S., T. Joshi, and R. Bankoti. 2010. Immune evasive mechanisms contributing to persistent *Leishmania donovani* infection. *Immunologic research* 47:14-24.

## Figure legends

**Figure 1. *L. infantum* amastigotes activate human B cells.** Purified human B cells were either left alone (used as a control) or incubated overnight with *L. infantum* amastigotes (AMA) at a 3:1 parasites to cell ratio. Cells and the cell-parasite mixture were intensively washed with a galactose-modified PBS/EDTA solution and stained with anti-CD25, -CD54, -CD69, -CD80, -CD83, -CD86 and -CD19 antibodies. Samples were read using a BD FACSCanto flow cytometer. A) Representative histograms displaying expression of each cell surface marker studied are shown in this panel. B) Results represent mean values of samples from 5 to 7 different healthy donors and are expressed as the percentages of positive cells for the indicated cell surface marker. C) Results represent mean values of samples from 5 to 7 different healthy donors and are expressed as the mean fluorescence intensities for the indicated cell surface marker. P values were calculated by two-tailed Student's t-test (ns: not significant).

**Figure 2. Incubation of human B cells with *L. infantum* amastigotes induces IL-10 production.** A) Purified human B cells were either left alone (used as a control) or incubated overnight with *L. infantum* amastigotes at the listed parasite:cell ratios. Next, IL-10 mRNA expression was measured by quantitative real-time PCR. Results are expressed as fold increase relative to cells left alone. P values were calculated by two-tailed Student's t-test (n=5). B) Cells were treated as in a panel A and IL-10 secretion was measured in cell-free supernatants by ELISA. Results are expressed as means +/- standard errors of the means (SEM) and P values were calculated by two-tailed Student's t-test (n=7). C) Purified human B cells were incubated overnight either with live *L. infantum*

amastigotes, heat-killed (HK) *L. infantum* amastigotes, live *L. infantum* promastigotes (PRO), or heat-killed *L. infantum* promastigotes at a 5:1 parasites to cell ratio before assessing IL-10 mRNA by quantitative real-time PCR. Results are expressed as fold increase relative to cells left alone. *P* values were calculated by two-tailed Student's t-test (n=5). D) Purified human B cells were incubated overnight either with live *L. infantum* amastigotes or live *L. infantum* promastigotes at a 5:1 parasite to cell ratio before assessing IL-10 production by ELISA. Results are expressed as means +/- SEM and *P* values were calculated by two-tailed Student's t-test (n=7). E) A representative dot plot of IL-10-expressing CD19<sup>+</sup> B cells either left alone or incubated with *L. infantum* amastigotes (AMA) is shown on the left portion while percentages of IL-10-positive cells are displayed on the right portion of the panel. Results are expressed as means +/- SEM and *P* value is calculated by two-tailed Student's t-test (n=7).

**Figure 3. IL-10-secreting B cells and CD27 marker.** Purified human B cells were either left alone (used as a control) or incubated overnight with *L. infantum* amastigotes at a 3:1 parasites to cell ratio. Cells and the cell-parasite mixture were intensively washed with a galactose-modified PBS/EDTA solution, fixed, permeabilized and stained for CD27 and intracellular IL-10. Dead cells were excluded by fixable viability dye staining. A) Representative histograms showing CD27 expression are shown on the left while percentages of CD27-positive cells are displayed on the right portion of the panel (n=7). B) Percentages of CD27-expressing B cells in the two studied subpopulations (i.e. IL-10<sup>-</sup> and IL-10<sup>+</sup>) are shown (n=7). C) Purified human B cells were separated in two distinct subpopulations (i.e. CD27<sup>+</sup> and CD27<sup>-</sup>) and cells were either left alone (used as a control) or incubated overnight with *L. infantum* amastigotes at a 3:1 parasite to cell ratio. Finally,

IL-10 production was quantified by ELISA. Results are expressed as means +/- SEM and *P* values are calculated by two-tailed Student's t-test (n=6).

**Figure 4. IL-10-secreting B cells and CD24 marker.** Purified human B cells were either left alone (used as a control) or incubated overnight with *L. infantum* amastigotes at a 3:1 parasites to cell ratio. Cells and the cell-parasite mixture were intensively washed with a galactose-modified PBS/EDTA solution, fixed, permeabilized and stained for CD24, CD38 and intracellular IL-10. Dead cells were excluded by fixable viability dye staining. A) Representative histograms showing CD24 expression are shown on the left while percentages of CD24-positive cells are displayed on the right portion of the panel (n=7). B) Representative histograms showing CD38 expression are shown on the left while percentages of CD38-positive cells are displayed on the right portion of the panel (n=7). C) Representative dot plots of CD24 and CD38 in IL-10<sup>-</sup> and IL-10<sup>+</sup> B cells either left alone or incubated with *L. infantum* amastigotes are shown on the left portion while percentages of cells expressing CD24 and CD38 in the studied subpopulations (i.e. IL-10<sup>-</sup> and IL-10<sup>+</sup>) are displayed on the right portion of the panel (n=7). D) Purified human B cells were either left unseparated or separated in three distinct subpopulations (i.e. CD24<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> and CD24<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>). Next, cells were either left alone (used as a control) or incubated overnight with *L. infantum* amastigotes at a 3:1 parasites to cell ratio. Finally, IL-10 production was quantified by ELISA. Results are expressed as means +/- SEM and *P* values are calculated by two-tailed Student's t-test.



**Figure 5. IL-10 secretion depends on p38, PI3K, Syk and calcium mobilization.**

Purified human B cells were either pretreated for 45 min with the vehicle (used as a control) or increasing concentrations of the listed specific inhibitors. Next, cells were incubated overnight with *L. infantum* amastigotes at a 3:1 parasite to cell ratio. Finally, IL-10 production was quantified by ELISA. Results are expressed as means +/- SEM of the percentages of inhibition compared to the vehicle. Statistical significance was evaluated by two-tailed Student's t-test (n=5 to 7).

**Figure 6. Conditioned medium from human B cells incubated with *L. infantum* amastigotes modulate CD4<sup>+</sup> T-cell activation and proliferation.**

A) Purified human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells were activated with plate-bound anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence of cell-free supernatants from B cells either left untreated (Control) or incubated overnight with *L. infantum* amastigotes at a 3:1 parasite to cell ratio. Seventy-two hours later, CD4<sup>+</sup> T cells were analyzed for cell surface expression of CD25 and CD69 by flow cytometry. Dead cells were excluded by 7-AAD staining. The left panel displays one representative dot plot whereas the right panel depicts the results from 2 different CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cell donors incubated with cell-free supernatants from up to 7 different B-cell donors. B) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells were first labeled with CFSE and activated, as previously described. After 5 days, cell proliferation was assessed by CFSE dilution and dead cells were excluded by 7-AAD staining. One representative histogram is shown on the left. Proliferation index for experiments performed with 2 different CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cell donors incubated with cell-free supernatants from up to 7 different B-cell donors are shown on the right. Statistical significance was evaluated by two-tailed Student's t-test.

**Figure 7. Parasite-mediated modulation of CD4<sup>+</sup> T-cell functions is partially dependent on IL-10.** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells were activated for 72 h with plate-bound anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence of cell-free supernatants from B cells either left untreated (Control) or incubated overnight with *L. infantum* amastigotes at a 3:1 parasite to cell ratio. In some cases, cell-free supernatants from B cells incubated with parasites were treated with a soluble IL-10 receptor (1 µg/ml) before being used with activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells. During the last 5 h of incubation, cells were further stimulated with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (1 µg/ml) and Golgiplug™ was added (1 µl per 1 x 10<sup>6</sup> cells). Finally, cells were fixed, permeabilized and stained for intracellular TNFα before being analyzed by flow cytometry. Dead cells were excluded by 7-AAD staining. Results are expressed as percentages of TNFα-positive cells multiplied by the mean fluorescence intensities (MFI). Data shown are the results from 2 different CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cell donors incubated with cell-free supernatants from up to 4 different B-cell donors. Statistical significance was evaluated by two-tailed Student's t-test.

# Figures

## Figure 1

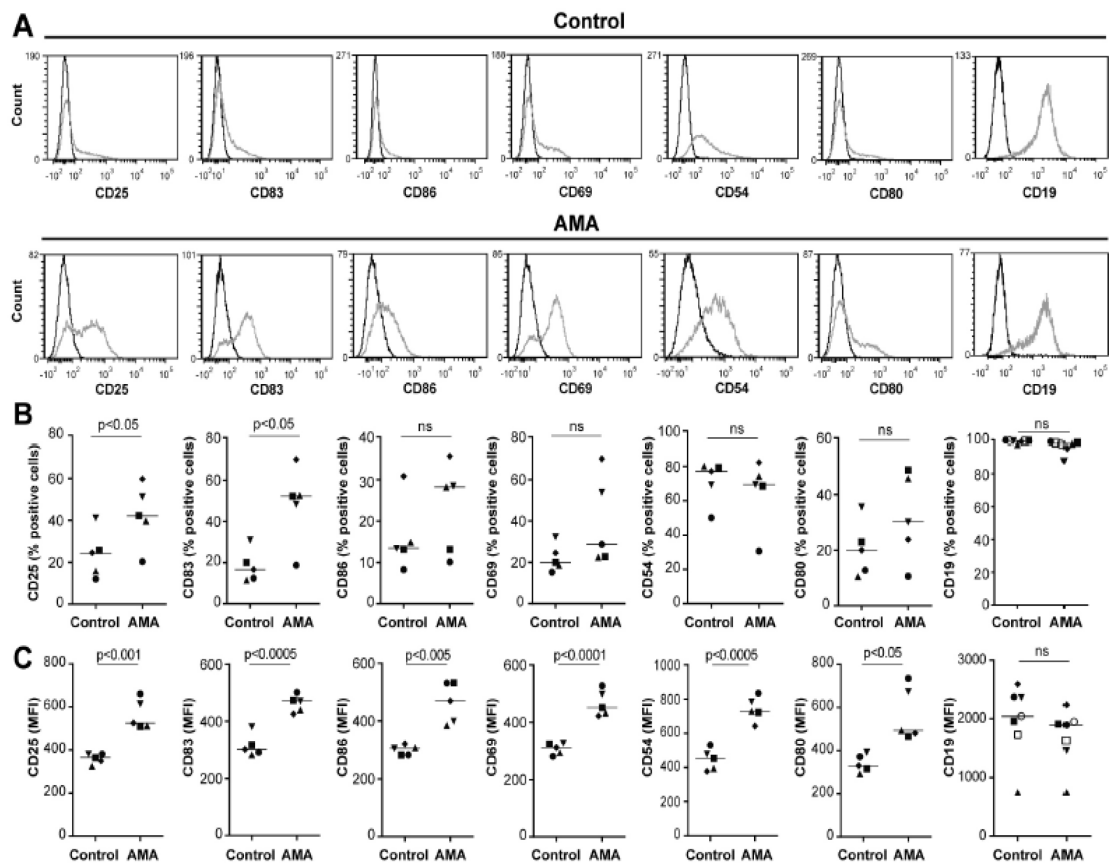


Figure 2

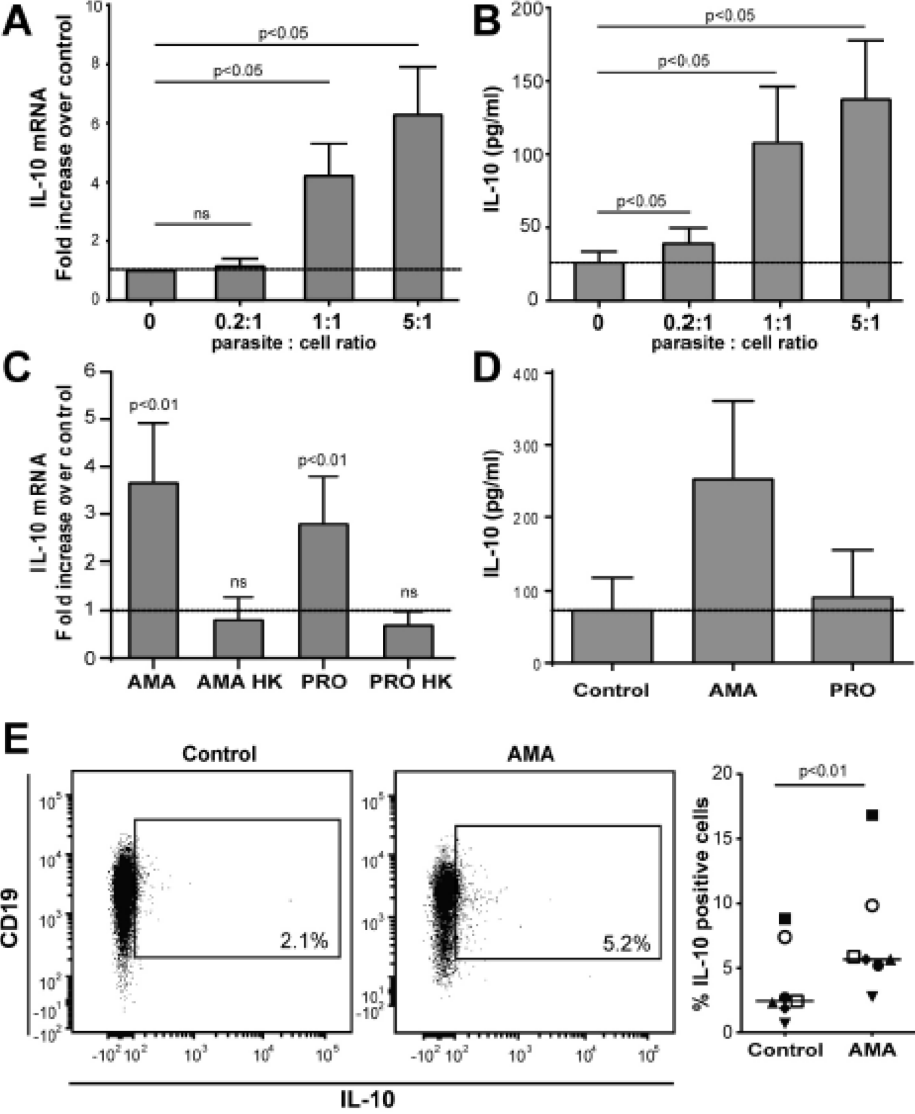


Figure 3

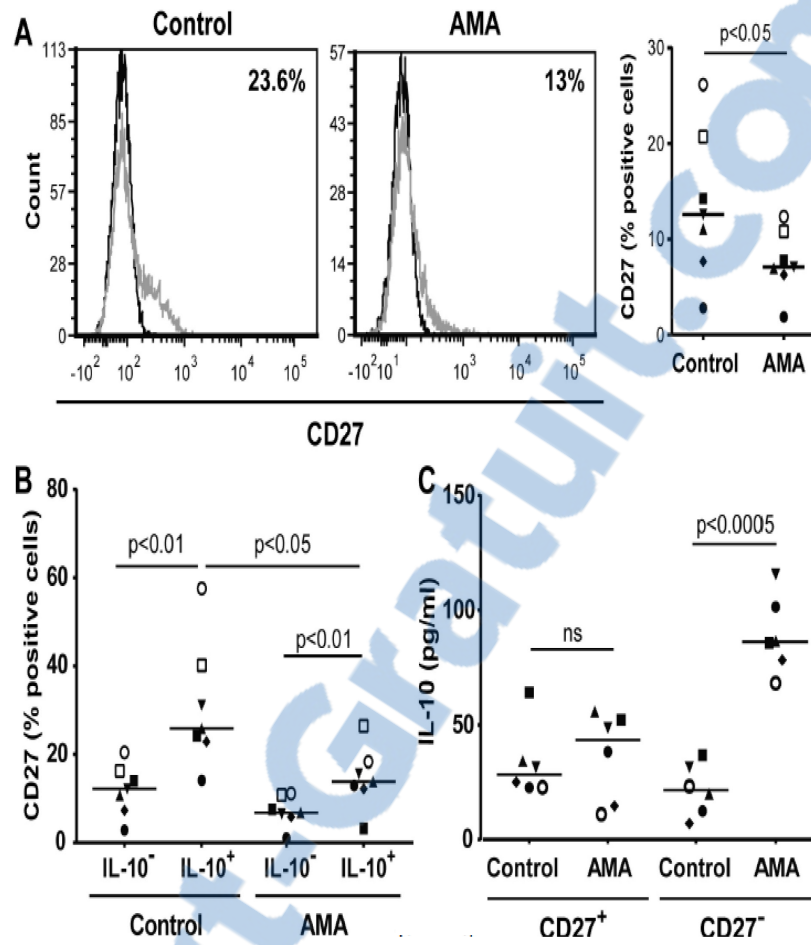


Figure 4

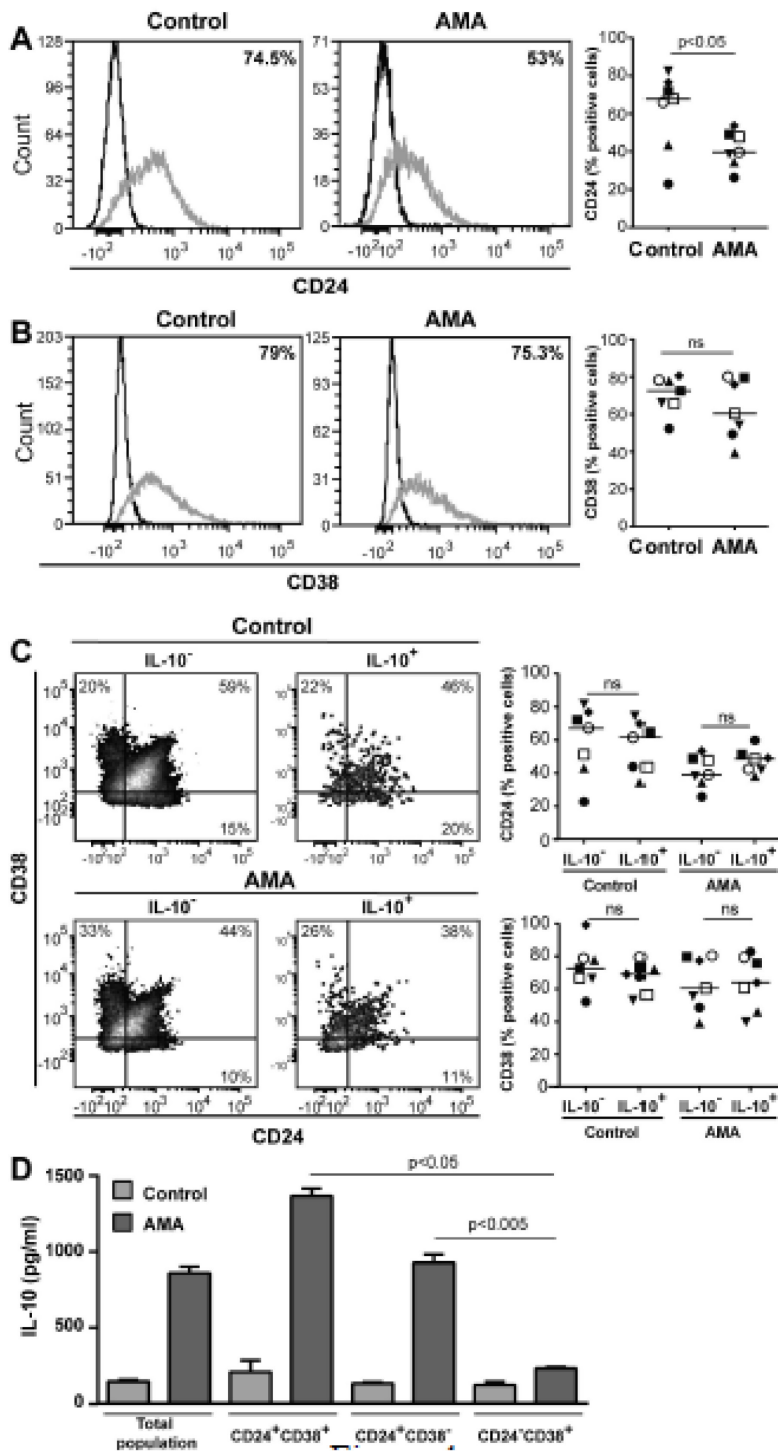


Figure 5

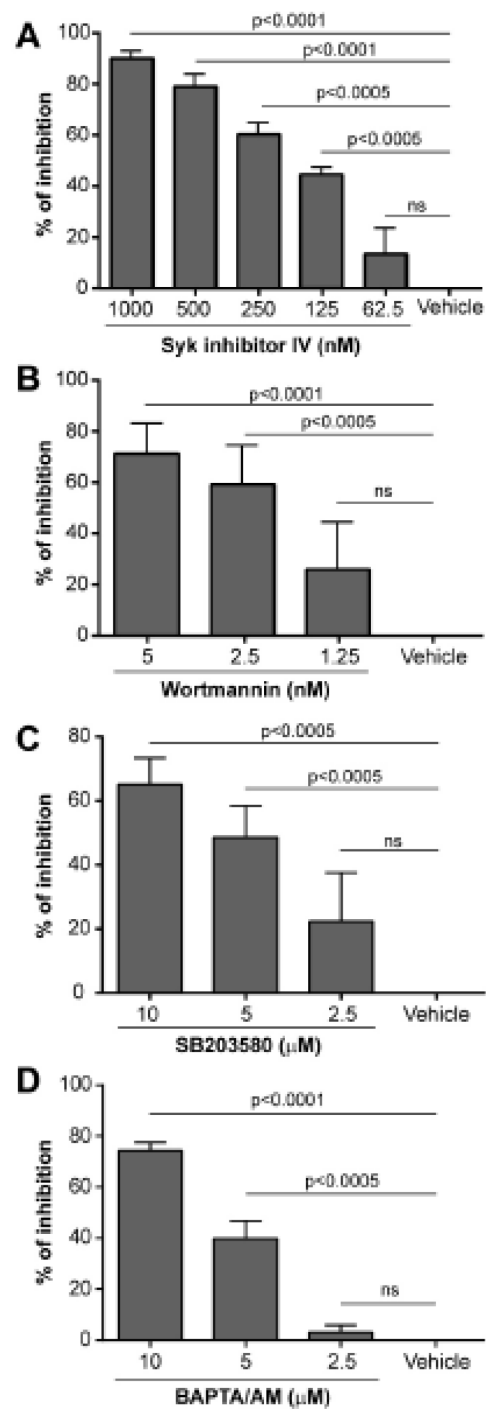


Figure 6

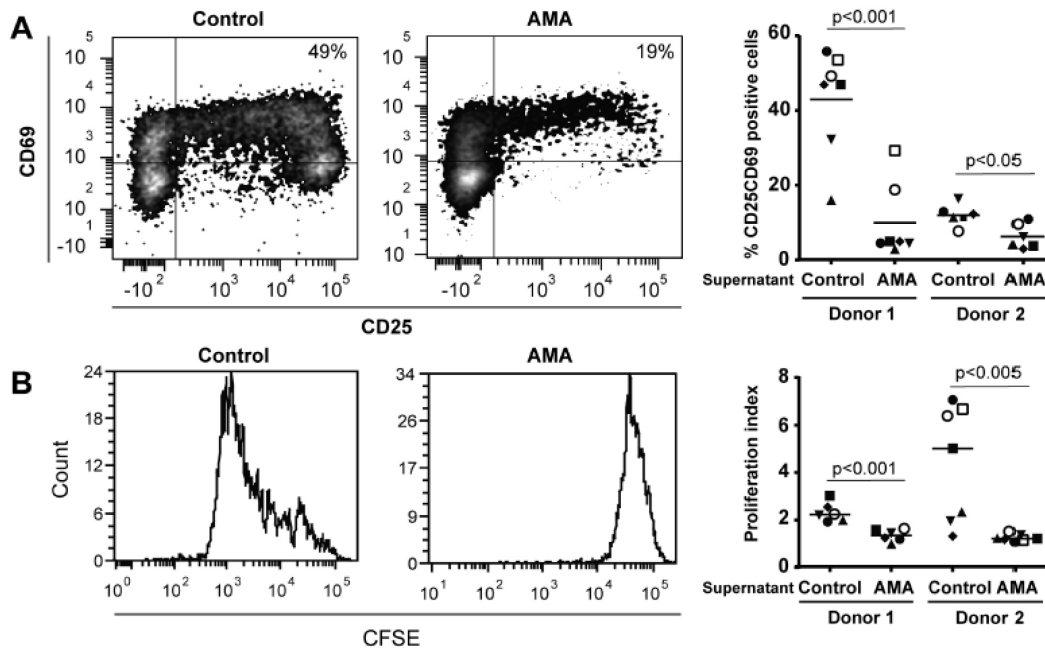
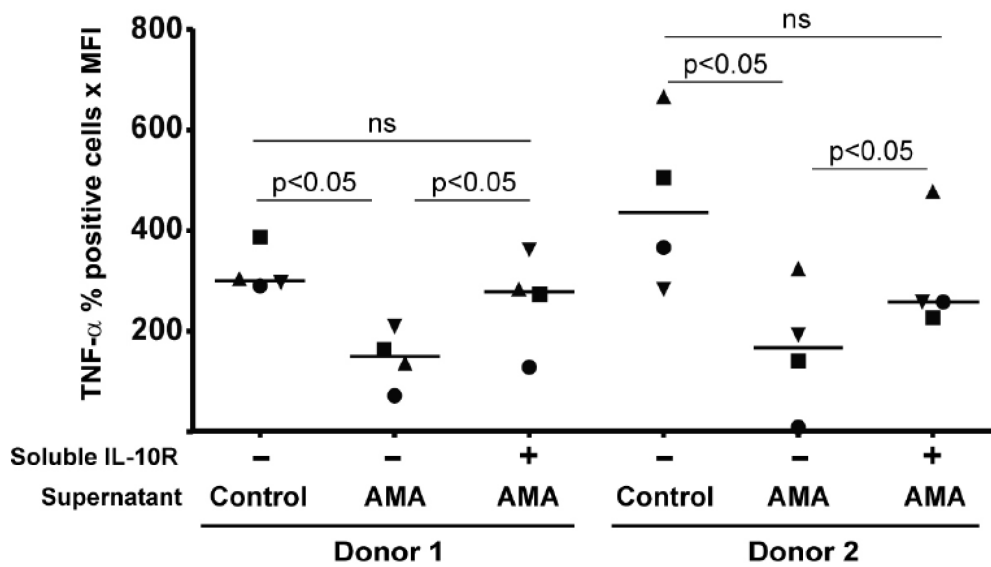


Figure 7





## **6. Chapitre VI : Matériel et méthodes supplémentaires**

### **6.1 Culture de la lignée cellulaire 293T**

La lignée cellulaire 293T, provenant de tissu épithélial de rein humain, a été décongelée et amplifiée dans du milieu D-MEM High Glucose 1X (Invitrogen, Burlington, ON) supplémenté de 10 % de FBS, de la pénicilline (50 U/mL) et de la streptomycine (50 ug/mL). Lorsqu'une confluence de 50 à 75 % était atteinte, les cellules ont été détachées avec 5 mL de trypsine-EDTA 0.5 % (GIBCO, Burlington, ON) puis remises en culture dans un flacon de 75 cm<sup>2</sup> à raison de  $2 \times 10^6$  cellules dans 10 mL de milieu de culture.

### **6.2 Production virale par transfection de cellules 293T au phosphate de calcium**

Le vecteur plasmidique pNL4-3 code pour un virus complet à tropisme X4 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program). Les cellules 293T ont été mises en culture la veille de la transfection à une concentration de  $7 \times 10^6$  cellules dans 20 mL de milieu de culture dans un flasque de 175 cm<sup>2</sup>. La solution de transfection contenait 50 µg d'ADN plasmidique viral (pNL4-3), 125 µL de CaCl<sub>2</sub> (2 M) et 825 µL d'H<sub>2</sub>O stérile puis additionnée de 1000 µL HBS IX (hepes buffer solution) pour favoriser la formation de cristaux dans un volume final de 2 mL. La solution de transfection a été ajoutée goutte par goutte aux cellules 293T qui ont été incubées à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> pendant 16 h. Par la suite, ces cellules ont été lavées avec du PBS 1X (phosphate buffered saline) et remises en incubation à 37°C sous 5 % de CO<sub>2</sub> dans 20 mL de D-MEM complet pendant 24 h supplémentaires. Le surnageant contenant la production virale a été récolté puis filtré à 0,22 µm. Le virus filtré a été ultracentrifugé à 28 000 g à 4°C pendant 45 minutes dans une ultracentrifugeuse (Optima L90-K, Beckman Coulter), puis resuspendu dans 2 mL de RPMI complet afin de le concentrer 10 fois. La production virale a été alors quantifiée grâce au test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) dirigé contre la protéine p24 de la capsid virale.

### **6.3 Quantification de la production et la réplication virale par ELISA p24**

La production virale a été quantifiée grâce à un ELISA p24 maison développé par notre laboratoire. En résumé, l'anticorps IgG1 anti-p24 183.H12.5C (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, cat # 1513) a été ajouté (Barnstead International, modèle 4625) à 4°C pendant 16 h à l'intérieur des puits d'une microplaque 96 puits (BD Falcon, cat # 353072). Par la suite, une étape de blocage de 60 minutes avec du PBS IX-0,05% Tween 20 (Thermo Fisher, cat # BP337500)- 1% BSA (Bovine serum albumin) (Fitzgerald Industries, cat # 30-AB75) a été faite afin d'éviter l'adhésion non spécifique des antigènes aux sites inoccupés de la microplaque. Une courbe standard comprenant 7 dilutions de protéine p24 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) dans du PBS IX-0,05% Tween 20- 1% BSA (31,25pg/ml, 62,5pg/ml, 125pg/ml, 250pg/ml, 500pg/ml, 1000pg/ml et 2000pg/ml) ainsi que les dilutions en série de nos productions virales ou de nos échantillons ont été placées en présence de tampon de lyse (10% PBS 10X, 0,05% Tween 20-2,5% Triton X100 et 1% bleu de trypan) dans les puits de la microplaque et incubées 60 minutes avec agitation à température pièce. Par la suite, l'anticorps anti-p24 31-90-25 biotinylé (ATCC, cat # HB-9725) a été ajouté aux puits pour une période de 60 minutes avec agitation toujours à température pièce et l'HRP-streptavidine (horseradish peroxydase) (Fitzgerald, cat # 65R-S104PHRP) (1 :10000) a été ajoutée. Après 20 minutes d'attente, le substrat TMB-S (3,3', 5,5 '-tetramethylbenzidine substrate) (Neogen, cat # 308177) a été ajouté. La réaction colorimétrique a été arrêtée par l'ajout d'acide phosphorique (0,5 M) et une lecture d'absorbance à 450 nm a été effectuée à l'aide d'un lecteur d'absorbance (Bio-Tek Instrument inc., modèle ELX 808). Des étapes de lavages automatisées au PBS IX-0,05% Tween ont été effectuées entre chaque étape jusqu'à l'étape de l'ajout du substrat TMB-S.

## 7. Chapitre VII: Résultats supplémentaires

### Mesure de la réplication virale dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

#### Les surnageants conditionnés de *Leishmania infantum* en coculture avec les cellules B diminuent la réplication du VIH-1 dans les Ly T CD4<sup>+</sup>

Afin de connaître l'effet des surnageants conditionnés sur la réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, nous avons procédé à l'activation des LyT CD4<sup>+</sup> à l'aide d'un cocktail d'anticorps dirigés contre le CD3 et le CD28, en présence des surnageants conditionnés de trois donneurs de cellules B avec ou sans les amastigotes de *Leishmania infantum*. Après 72 h, les LyT ont été infectés avec le VIH-1 (clone moléculaire NL4-3WT) pendant 2 heures, lavés à trois reprises avec du PBS 1X et resuspendus dans du RPMI complet. La réplication virale a été mesurée grâce à un ELISA p24 72 heures plus tard. Les résultats obtenus avec deux donneurs différents de LyT CD4<sup>+</sup> montrent que la réplication virale diminue lorsque les cellules T sont mises en contact avec les surnageants de cellules B avec *Leishmania*. Pour le premier donneur (figure 8A), la réplication virale est passée d'une moyenne de 14 2800 à 9 0433 pg/mL ( $p=0.0052$ ). Pour le donneur 2 (figure 8b) la réplication virale est passée d'une moyenne de 15 202 à 6 510 pg/mL ( $p=0.0557$ ).

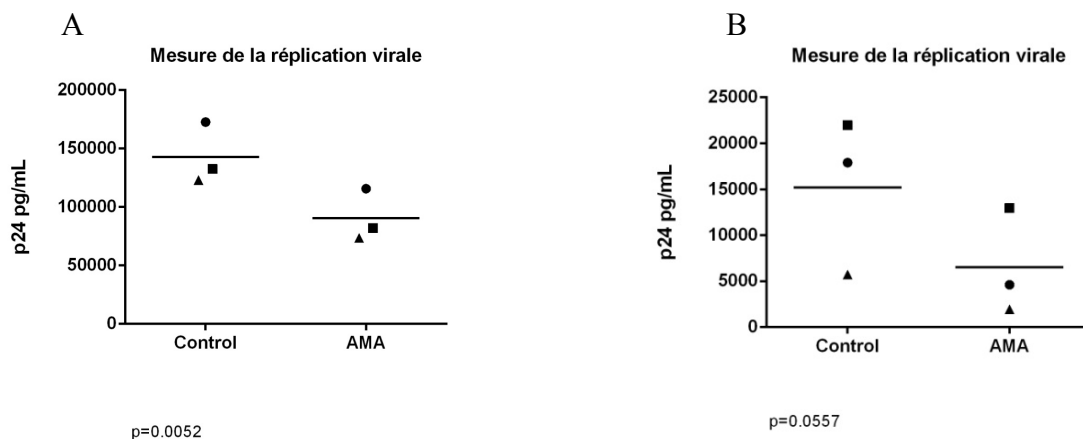


Figure 6. Mesure de la réplication virale du VIH-1 dans les LyTCD4<sup>+</sup>

Quantification de la p24 en pg/mL associée au virus NL4-3 WT en présence de surnageants conditionnés de cellules B avec ou sans *Leishmania*. (A) Donneur # 1 LyT CD4<sup>+</sup> ( $p=0.0052$ ). (B) Donneur # 2 LyT CD4<sup>+</sup> ( $p=0.0557$ ).



## 8. Chapitre VIII : Discussion et perspective

La réponse immunitaire à la suite d'une infection microbienne se caractérise par la sécrétion de plusieurs molécules inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-12 et l'IFN- $\alpha$  [119]. Ces cytokines sont produites par plusieurs types cellulaires dont les cellules dendritiques et les macrophages, des cellules de l'immunité innée formant une des premières lignes de défense du système immunitaire.

S'ensuit alors l'activation des lymphocytes T et B au niveau des ganglions lymphatiques les plus proches du site d'infection. Ces cellules vont ensuite proliférer, se différencier et migrer au site de l'infection dans le but d'éliminer le pathogène impliqué.

Toutefois, une fois l'infection maîtrisée, la réponse immunitaire doit revenir à un niveau basal afin d'éviter une inflammation chronique et des dommages tissulaires [109]. C'est pourquoi diverses cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- $\beta$  secrétées, entre autres, par les NK, les Tregs et par les Bregs sont nécessaires pour contrôler cette réponse immunitaire.

Plusieurs pathogènes, tels que le parasite *Leishmania*, ont tiré avantage de ce phénomène de régulation de la réponse immunitaire pour pouvoir échapper au système immunitaire et se répliquer en toute tranquillité à travers plusieurs mécanismes.

En effet, plusieurs études conduites sur des modèles animaux *in vivo*, ainsi que chez des patients atteints de leishmanioses, ont démontré le rôle de l'IL-10 dans la régulation de la réponse immunitaire contre *Leishmania* [78] et dans la viscéralisation du parasite [94, 95, 127, 128]. De hautes concentrations d'IL-10 sont retrouvées chez les patients infectés par *Leishmania* et l'implication directe de cette cytokine dans la persistance du parasite a déjà été prouvée [108]. Cependant, le rôle joué par les cellules B dans ce phénomène reste encore mal défini.

Dans la présente étude, nous nous sommes penchés, dans un premier temps, sur l'effet de l'exposition des amastigotes axéniques de la souche *Leishmania infantum* sur les lymphocytes B. Nous avons décidé de mener nos expériences sur les cellules B provenant

d'amygdales car très peu d'études ont été faites sur les ganglions, qui pourtant sont les premiers organes à être colonisés par les leishmanioses viscérales [129].

Pour y arriver, nous avons commencé par regarder si le parasite pouvait activer les cellules B en analysant l'expression de différents marqueurs d'activation (CD25, CD54, CD69, CD80, CD83 et CD86). Les résultats de la figure 1 montrent qu'il y a une augmentation de l'expression de tous les marqueurs d'activation analysés lorsque les cellules B sont exposées aux amastigotes. Cette augmentation a été mesurée grâce à l'intensité de fluorescence moyenne qui reflète la quantité de molécules présentes à la surface des cellules B. Nous avons pu voir que les amastigotes de *Leishmania infantum* induisent l'activation des Ly B, identifiés comme étant des cellules CD19<sup>+</sup> en accord avec d'autres travaux [97, 130].

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la cytokine IL-10, plus précisément à la capacité de *Leishmania* à induire les cellules B provenant d'amygdales à sécréter cette cytokine.

Les résultats montrés dans la figure 2 A mesurés en PCR en temps réel, montrent qu'il y a une augmentation dose-dépendante de l'expression des ARN Messagers (ARNm) codant pour la cytokine IL-10, lorsque les LyB sont exposés à *Leishmania*. Nous avons confirmé ces résultats à l'aide d'un kit ELISA commercial anti-IL-10, mesurant la présence de cette cytokine dans les surnageants que nous avons préparés. On peut voir dans la figure 2 B qu'il y a une augmentation significative de la sécrétion de l'IL-10 dans les surnageants de cellules B exposées à *Leishmania infantum* par rapport à notre contrôle comprenant seulement des cellules B.

Cette sécrétion de l'IL-10 médiée par le parasite n'a pas été observée chez les parasites sous la forme promastigote ni chez les amastigotes tués au paraformaldéhyde (figure 2 D). Nous sommes donc en mesure de dire que c'est la forme amastigote (retrouvée dans les phagolysosomes des macrophages) qui est responsable de ce phénomène et que c'est par un processus actif que les amastigotes déclenche la production de l'IL-10 par les LyB.

Ces résultats concordent avec ceux obtenus chez les patients infectés atteints de leishmanies où on a pu constater une augmentation de l'expression des ARNm codant pour l'IL-10 dans les tissus infectés, ainsi qu'une augmentation des niveaux d'IL-10 dans le sérum [79-81].

Lorsque nous avons examiné l'expression des ARNm spécifiques à l'IL-10, on a pu observer une augmentation de l'expression de ces ARNm aussi bien chez les amastigotes, les promastigotes que chez les amastigotes tués au paraformaldéhyde. On peut alors penser que c'est au niveau de la traduction de la cytokine ou de sa sécrétion qu'il y a une restriction. Il serait intéressant de confirmer ces résultats en vérifiant si le contact du parasite aux cellules B est obligatoire pour la sécrétion de l'IL-10 et que celle-ci ne serait pas due à des facteurs solubles relâchés par le parasite induisant l'expression du gène codant pour l'IL-10.

Le TGF-beta (*Transforming growth factor*), une cytokine anti-inflammatoire souvent associée à l'IL-10 [129, 131, 132], joue un rôle important dans la régulation et la modulation de la réponse immunitaire [133, 134]. Nous avons donc essayé de détecter la présence de cette cytokine dans les surnageants que nous avons préparés. Nous avons utilisé un kit commercial d'ELISA anti-TGF- $\beta$  et avons procédé à une activation chimique de la cytokine en question avant de faire notre expérience. Les résultats obtenus étaient négatifs à deux reprises avec tous les surnageants utilisés, montrant ainsi que cette cytokine ne se retrouvait pas parmi les facteurs solubles de nos surnageants ou que la concentration de cette cytokine était en dessous de la limite de détection de la méthode utilisée.

Par la suite, nous avons voulu vérifier la présence d'IL-6, une cytokine impliquée dans la phase aigüe de l'inflammation. Nous avons donc procédé à un ELISA anti-IL-6 et avons observé une augmentation significative de la sécrétion de cette cytokine avec des concentrations allant de 600 à 4 000 pg/mL dans les surnageants de cellules B exposées à *Leishmania*. Nos résultats vont de concert avec ceux obtenus par Bouaziz et collaborateurs, où il a été démontré que la stimulation de cellules B avec un agoniste du TLR-9 et un anticorps anti-Ig induisait la sécrétion de l'IL-10, de l'IL-6, de l'IL-12 de l'IFN- $\gamma$  mais pas celle du TGF- $\beta$  [135].

Comme notre population totale de cellules B (CD19<sup>+</sup>) contenait autant des cellules mémoires, des cellules naïves que des cellules transitionnelles, on peut penser que différentes cellules B ont répondu à une même stimulation mais de manière différente, ce

qui expliquerait la présence de deux cytokines diamétralement opposées, à savoir l'IL-6 et l'IL-10.

Puisque les facteurs solubles contenus dans les surnageants contiennent, entre autres, une cytokine immunorégulatrice, nous nous sommes intéressés à l'effet qu'auraient ces facteurs solubles sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, un type cellulaire très important pour la réponse immunitaire à médiation cellulaire et cible de choix pour le VIH-1. Ainsi, les cellules T CD4<sup>+</sup> ont été soumises à une activation par l'ajout d'anti-CD3 et d'anti-CD28 pendant 72 heures en présence du surnageant de cellules B, seules ou avec les amastigotes de *Leishmania infantum*, afin de mesurer l'expression de deux marqueurs d'activation, le CD25 et le CD69. Le CD25 représente la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2, alors que le CD69 est un des premiers antigènes de surface à être exprimé après l'activation des lymphocytes T [136, 137]. La stimulation du complexe du récepteur de la cellule T via la chaîne CD3ε par l'anticorps anti-CD3 (OKT3) se traduit par l'activation de plusieurs voies de signalisation menant à la production de divers facteurs dont NF-κB, la MAP kinase et NFAT. La stimulation du CD28, quant à elle, induit l'activation de plusieurs voies de signalisation dont la cascade des MAP kinases (MAPK) médiée par la protéine G Rac [138]. L'activation de ces voies mène à l'augmentation de l'expression de divers gènes dont celui codant pour la cytokine IL-2 nécessaire à la survie et à la prolifération des lymphocytes T [139].

Avant de procéder à nos expériences avec les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, une sélection positive anti-CD25 a été effectuée afin d'éliminer les lymphocytes Tregs, eux aussi capables de sécréter la cytokine anti-inflammatoire. Ainsi, nous nous sommes assurés que l'effet obtenu provenait bien des facteurs solubles contenus dans nos surnageants conditionnés.

Les résultats de la figure 6 A montrent que lorsque les cellules T CD4<sup>+</sup> sont exposées aux surnageants de cellules B en présence du parasite *Leishmania infantum*, on observe une diminution du pourcentage de cellules doublement positives pour les deux marqueurs d'activation (CD25 et CD69) comparativement à notre contrôle. Ceci signifie que les



facteurs solubles présents dans les surnageants conditionnés de LyB avec *Leishmania* baissent le niveau d'activation des LyT CD4<sup>+</sup>.

Lorsque nous avons effectué un test de dilution du CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*), qui mesure la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup>, nous avons observé que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> proliféraient moins lorsqu'exposés aux surnageants de cellules B avec *Leishmania infantum* (figure 6 B). Cette diminution a été mesurée grâce à l'index de prolifération qui représente le nombre de divisions sur le nombre de cellules en cours de division.

Les résultats que nous avons obtenus concordent avec ceux retrouvés dans la littérature, où il a été démontré que les lymphocytes B régulent les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> à travers plusieurs mécanismes incluant des facteurs solubles comme l'IL-10 [97, 135] et que cette régulation se traduisait par une diminution de la prolifération des LyT [135]. Outre cela, il a déjà été démontré que l'IL-10 prévenait indirectement la prolifération des lymphocytes T antigène-spécifique en diminuant l'expression des molécules de CMH-II ou des molécules de costimulation des cellules présentatrices d'antigènes [78, 140-142].

De façon surprenante, lorsque nous avons ajouté un récepteur soluble de l'IL-10 à nos surnageants conditionnés, nous n'avons pas observé une récupération de la prolifération cellulaire des LyT CD4<sup>+</sup>; contrairement aux résultats publiés par Bouaziz et collaborateurs qui ont rapporté que l'inhibition de la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> était causée en partie par la cytokine IL-10 sécrétée par les LyB, puisque son blocage a partiellement inversé l'effet inhibiteur [135]. Ceci impliquerait donc que, dans notre cas, c'est un facteur soluble autre que l'IL-10 qui serait responsable de la diminution de la prolifération des LyT CD4<sup>+</sup>, lorsqu'ils sont exposés aux surnageants de cellules B en présence de *Leishmania*.

Finalement, pour clore cette section, nous avons mesuré l'expression du TNF- $\alpha$  intracellulaire, une cytokine sécrétée par les LyT après leur activation et reconnue pour son activité pro-inflammatoire [143-145]. De plus, il est connu que la signalisation via l'IL-10 peut inhiber la production de TNF- $\alpha$ , ainsi que d'IFN- $\gamma$  dans les macrophages [146]. Nous avons donc décidé de regarder de plus près l'effet des facteurs solubles contenus dans les surnageants conditionnés sur la production de cette cytokine.

Les résultats obtenus dans la figure 4 indiquent que, pour chacun de nos deux donneurs, il y a une diminution significative du TNF- $\alpha$  lorsque les cellules T CD4<sup>+</sup> sont mises en contact avec les surnageants de cellules B exposées aux amastigotes. Cette fois-ci, lorsque nous avons ajouté le récepteur soluble de l'IL-10 aux cellules T exposées aux surnageants de cellules B avec *Leishmania*, nous avons obtenu une restauration partielle du TNF- $\alpha$  à un niveau comparable à celui de notre contrôle (figure 7). On peut donc en conclure que les facteurs solubles contenus dans nos surnageants conditionnés baissent le niveau de TNF- $\alpha$  et que cette diminution est en grande partie due à la cytokine IL-10.

Globalement, ces résultats révèlent que les facteurs solubles contenus dans les surnageants de LyB en coculture avec *Leishmania infantum*, incluant l'IL-10 et l'IL-6, baissent l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> en diminuant par le fait même leur prolifération ainsi que l'expression du TNF- $\alpha$  et ce malgré la présence de la cytokine pro-inflammatoire IL-6. Il est important de mentionner que l'IL-10 est partiellement impliquée dans la diminution de la production du TNF- $\alpha$  mais pas dans la diminution de la prolifération des Ly T CD4<sup>+</sup>.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu observer les effets de ces surnageants sur la réplication du VIH-1 dans les LyT CD4<sup>+</sup>. Comme les cellules T CD4<sup>+</sup> activées sont les principales cellules cibles de ce virus et que ces mêmes cellules semblent être affectées par le parasite *Leishmania infantum*, nous avons décidé de regarder si les facteurs solubles contenus dans les surnageants conditionnés affecteraient la réplication virale du VIH-1.

Les résultats de la figure 8, obtenus avec deux donneurs différents de LyT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, montrent qu'il y a une diminution de la réplication virale lorsque les lymphocytes T sont exposés aux surnageants de cellules B en coculture avec les amastigotes de *Leishmania*, passant d'une moyenne de 14 2800 à 9 0433 pg/mL de p24 pour le premier donneur et d'une moyenne de 15 202 à 6 510 pg/mL de p24 pour le deuxième donneur. Ces résultats semblent logiques puisque, pour se répliquer, le VIH-1 a besoin de cellules T CD4<sup>+</sup> activées qui, contrairement aux cellules quiescentes, ne présentent pas de blocage dans le cycle de vie du virus [147-150]. Effectivement, plusieurs études ont démontré que le virus de l'immunodéficience humaine n'infecte que très peu ou pas les cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes. Divers facteurs en sont la cause comme la diminution de l'expression de récepteurs tels que le CCR5, le bas niveau de dNTP nécessaires à la transcription inverse et

la barrière physique formée par le cytosquelette [151, 152]. Or, les résultats présentés plus haut montraient qu'il y avait une diminution de l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> ainsi qu'une diminution de leur prolifération à la suite de l'exposition aux surnageants d'amastigotes. On pouvait donc s'attendre à voir la quantité de p24 quantifiant la réplication du virus diminuer.

Lorsqu'on regarde nos résultats de plus près, on peut remarquer que le donneur 2 a moins bien répondu à la diminution de la réplication virale comparativement au donneur 1 pour qui, la diminution de la réplication du VIH-1 était significative. Comme les donneurs de LyT CD4<sup>+</sup> répondent différemment à l'activation cellulaire et à l'infection par le VIH-1, il serait important de refaire ces expériences avec plusieurs donneurs différents pour mieux voir la tendance.

La diminution de la réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en présence de la cytokine IL-10, entre autres, reflète un peu les résultats obtenus avec les macrophages intestinaux qui sont restrictifs à la réplication du VIH. Cette restriction serait causée par les fortes concentrations d'IL-10 et du TGF- $\beta$  retrouvées au niveau des intestins [153]. Dans une autre étude, il a été démontré que lorsque les MDM (*monocyte-derived macrophages*) étaient exposés à l'IL-10, la réplication virale était diminuée, voire complètement inhibée. Selon les résultats, cette inhibition aurait lieu à un niveau post-traductionnel [154].

Toujours en accord avec les résultats que nous avons obtenus, une autre équipe a montré l'effet direct de la cytokine IL-10 dans la diminution de la réplication virale chez des femmes enceintes infectées par le VIH-1, ainsi que son effet inhibiteur sur la prolifération de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Encore une fois, cet effet a été renversé par l'ajout d'un anticorps anti-IL-10 [155].

D'un autre côté, il est connu que l'IL-10 augmente l'expression du CCR5 et des molécules de costimulation (CD80/86), augmentant ainsi la réplication virale et par le fait même la charge virale [155]. Cependant, on ne peut pas vraiment parler de contradictions avec nos résultats, puisque ces études ont été menées sur des macrophages et qu'en plus, dans notre cas, une souche virale de tropisme X4 (utilisant donc le CXCR4 comme récepteur) a été utilisée. Il serait tout de même intéressant de voir l'effet de nos facteurs solubles sur les

corécepteurs de nos cellules T CD4<sup>+</sup>. Il serait également intéressant de refaire nos expériences, en utilisant cette fois-ci une souche de tropisme R5.

Fait curieux, les résultats que nous avons obtenus vont dans un sens opposé à ceux obtenus avec les macrophages et chez les patients infectés par les deux pathogènes. Toutes les données concernant la co-infection VIH-1/*Leishmania* parlent de synergisme entre les deux pathogènes. En effet, il est connu que cette co-infection a un grand impact sur les fonctions des macrophages, notamment sur la production de cytokines et sur la phagocytose [122]. Ainsi, en infectant les macrophages, le VIH-1 augmente la phagocytose de *Leishmania* par les macrophages [123, 124, 156, 157] et induit la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-8, des cytokines qui favorisent grandement la réplication de *Leishmania* [158]. Réciproquement, *Leishmania* augmente la réplication virale en induisant la production du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\alpha$  [118, 159]. En mettant nos résultats en contexte, on peut penser que l'effet synergique de la co-infection de *Leishmania* et du VIH-1 serait probablement plus grand s'il n'y avait pas une régulation de la réplication virale obtenue lors de l'infection de cellules T CD4<sup>+</sup>.

En résumé, les cellules B ne sont infectées ni par le VIH-1 ni par *Leishmania*. Par contre, chacun des deux pathogènes affectent grandement les fonctions de l'autre en causant de nombreux déséquilibres dans le compartiment de cellules B. Voilà pourquoi nous nous sommes intéressés à ce type cellulaire, aux facteurs solubles qu'il sécrète après exposition au parasite *Leishmania* et, finalement, à l'effet de ces derniers sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, un des acteurs principaux de l'immunité cellulaire adaptative et la cible de choix pour le VIH-1.

Il serait cependant intéressant d'investiguer plus en profondeur et d'essayer de trouver quelles autres cytokines sont impliquées dans la modulation des fonctions des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et dans la diminution de la réplication virale dans ces mêmes cellules. Il serait également intéressant de voir si l'IL-10 est directement impliquée dans la diminution de la réplication virale en ajoutant, par exemple, un récepteur soluble de l'IL-10 aux cellules T CD4<sup>+</sup> exposées aux surnageants conditionnés. Pour finir, nous aimerions également refaire nos expériences mais en commençant par infecter les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> avec une

souche virale toujours dans les mêmes conditions (10 ng/10<sup>5</sup> cellules pendant 72 heures) puis ajouter les surnageants conditionnés pendant 48 heures et mesurer la réplication virale à l'aide de la méthode ELISA dirigée contre la p24. Ces expériences permettront de simuler les cas d'infection au VIH-1 suivi d'une infection par un pathogène opportuniste.



## 9. Chapitre IX : Conclusions

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire importante pour la régulation de la réponse immunitaire. Elle peut être sécrétée par divers types cellulaires, dont les cellules B appelées alors Bregs. Ces dernières ont la capacité d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires, permettant ainsi la persistance de plusieurs pathogènes. C'est notamment le cas du parasite protozoaire *Leishmania* qui utilise ce mécanisme de régulation pour pouvoir échapper au système immunitaire. Ainsi, nous voulions savoir si les amastigotes de *Leishmania infantum* pouvaient activer les cellules B provenant d'amygdales. Nos résultats montrent que le parasite active les LyB et induit la sécrétion de plusieurs cytokines dont l'IL-10 et l'IL-6. Il est connu que l'IL-10 diminue la prolifération et qu'elle régule les fonctions de plusieurs cellules dont les LyT, les macrophages et les cellules dendritiques. Nos résultats ont révélé que des facteurs solubles contenus dans les surnageants conditionnés diminuaient l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup>, leur prolifération et la production du TNF- $\alpha$ . Cependant, dans nos expériences, l'IL-10 ne semblait pas être responsable de la diminution de la prolifération des LyT CD4<sup>+</sup> mais plutôt dans la diminution de la production du TNF- $\alpha$ , puisque la neutralisation de l'IL-10 a permis la récupération de la production du TNF- $\alpha$  intracellulaire. On peut donc supposer que la modulation des fonctions des LyT CD4<sup>+</sup>, exercée par les milieux conditionnés provenant de cellules B exposées à *Leishmania*, est due à un processus multifactoriel qui comprend l'IL-10.

Finalement, lorsque nous avons mesuré la réplication du VIH-1, nous avons constaté que lorsque les cellules T étaient exposées aux surnageants conditionnés de cellules B traitées avec *Leishmania*, la réplication virale diminuait. Ces résultats ont permis de mettre en évidence une partie de la réponse immunitaire induite dans un organe lymphoïde secondaire très tôt après exposition aux amastigotes de *Leishmania infantum* et de connaître l'effet de cette réponse sur la réplication virale dans le cas de co-infection au VIH-1. Cependant, il est important de mentionner que des cellules B provenant de la rate ou des échantillons cliniques de patients infectées par *Leishmania* auraient été un meilleur outil pour effectuer nos expériences. En effet *Leishmania infantum* colonisant les viscères, les amygdales ne

constituent pas l'organe par excellence pour la réplication du parasite. Les cellules B provenant d'amygdales restent toutefois un excellent moyen d'étude puisqu'il est connu que *Leishmania* infectent les organes lymphoïdes secondaires très tôt après l'infection vue la difficulté à avoir accès aux autres organes.

À travers ces résultats, nous avons pu constater que malgré le synergisme existant entre *Leishmania* et le VIH-1 dans les macrophages, la réponse immunitaire peut différer lorsqu'un autre type cellulaire est impliqué, comme nous avons pu le constater. De plus, ces expériences miment une situation ayant lieu très tôt après l'infection et permettent de mieux comprendre la réponse immunitaire qui se développe à la suite de l'infection par les deux microorganismes.



## Bibliographie

1. ONUSIDA, *2013 Global Report Epidemiology Slides*. 2013.
2. Gobeil, L.A., *Étude de l'endocytose du VIH-1 dans les macrophages dérivés de monocytes humains*, in *Faculté de Médecine*. 2013, Université Laval: Québec.
3. Vidricaire, G., *Études des étapes précoces du cycle de réplication du virus d'immunodéficience humaine de type 1 dans les cellules trophoplastiques: vers une compréhension de la transmission materno-foetale*, in *Faculté de Médecine*. 2006, Université Laval: Québec.
4. Barre-Sinoussi, F., *HIV: a discovery opening the road to novel scientific knowledge and global health improvement*. *Virology*, 2010. **397**(2): p. 255-9.
5. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. *Science*, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
6. ONUSIDA, *Le SIDA en chiffres*. 2013.
7. Brenchley, J.M., D.A. Price, and D.C. Douek, *HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe?* *Nat Immunol*, 2006. **7**(3): p. 235-9.
8. Speck, R.R., et al., *Comparison of human immunodeficiency virus type 1 Pr55(Gag) and Pr160(Gag-pol) processing intermediates that accumulate in primary and transformed cells treated with peptidic and nonpeptidic protease inhibitors*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. **44**(5): p. 1397-403.
9. Starcich, B.R., et al., *Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS*. *Cell*, 1986. **45**(5): p. 637-48.
10. Sattentau, Q.J. and J.P. Moore, *The role of CD4 in HIV binding and entry*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1993. **342**(1299): p. 59-66.
11. Speck, R.F., et al., *Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop*. *J Virol*, 1997. **71**(9): p. 7136-9.
12. Feng, Y., et al., *Pillars article: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. *Science*. 1996. 272: 872-877. *J Immunol*, 2011. **186**(11): p. 6076-81.
13. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. *Science*, 1996. **272**(5263): p. 872-7.
14. Dragic, T., et al., *HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5*. *Nature*, 1996. **381**(6584): p. 667-73.
15. Deng, H., et al., *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1*. *Nature*, 1996. **381**(6584): p. 661-6.
16. Greene, W.C. and B.M. Peterlin, *Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy*. *Nature medicine*, 2002. **8**(7).
17. Moore, J.P., *Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy*. *Science*, 1997. **276**(5309): p. 51-2.
18. Clapham, P.R. and R.A. Weiss, *Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of coreceptors*. *Nature*, 1997. **388**(6639): p. 230-1.
19. Ji, J.P. and L.A. Loeb, *Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase copying RNA in vitro*. *Biochemistry*, 1992. **31**(4): p. 954-8.

20. Jones, K.A. and B.M. Peterlin, *Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 717-43.
21. Sherman, M.P. and W.C. Greene, *Slipping through the door: HIV entry into the nucleus*. Microbes Infect, 2002. **4**(1): p. 67-73.
22. Turner, B.G. and M.F. Summers, *Structural biology of HIV*. J Mol Biol, 1999. **285**(1): p. 1-32.
23. Schroder, A.R., et al., *HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots*. Cell, 2002. **110**(4): p. 521-9.
24. Tazi, J., et al., *Alternative splicing: regulation of HIV-1 multiplication as a target for therapeutic action*. FEBS J, 2010. **277**(4): p. 867-76.
25. Nguyen, D.H. and J.E. Hildreth, *Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts*. J Virol, 2000. **74**(7): p. 3264-72.
26. Corbin, A., et al., *Une nouvelle vision de l'assemblage du VIH-1*. Med Sci (Paris), 2008. **24**: p. 49-55.
27. Henderson, L.E., et al., *Direct identification of class II histocompatibility DR proteins in preparations of human T-cell lymphotropic virus type III*. J Virol, 1987. **61**(2): p. 629-32.
28. Le Tortorec, A. and S.J. Neil, *Antagonism to and intracellular sequestration of human tetherin by the human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein*. J Virol, 2009. **83**(22): p. 11966-78.
29. Annunziato, F. and S. Romagnani, *Heterogeneity of human effector CD4+ T cells*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(6): p. 257.
30. Singh, H., *Shaping a helper T cell identity*. Nat Immunol, 2007. **8**(2): p. 119-20.
31. Fevrier, M., K. Dorgham, and A. Rebollo, *CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: role of apoptosis*. Viruses, 2011. **3**(5): p. 586-612.
32. Lassen, K., et al., *The multifactorial nature of HIV-1 latency*. Trends Mol Med, 2004. **10**(11): p. 525-31.
33. Geeraert, L., G. Kraus, and R.J. Pomerantz, *Hide-and-seek: the challenge of viral persistence in HIV-1 infection*. Annu Rev Med, 2008. **59**: p. 487-501.
34. Alvarez, Y., et al., *Preferential HIV infection of CCR6+ Th17 cells is associated with higher levels of virus receptor expression and lack of CCR5 ligands*. J Virol, 2013. **87**(19): p. 10843-54.
35. Crowe, S., T. Zhu, and W.A. Muller, *The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(5): p. 635-41.
36. Balestra, E., et al., *Macrophages: a crucial reservoir for human immunodeficiency virus in the body*. J Biol Regul Homeost Agents, 2001. **15**(3): p. 272-6.
37. Sharova, N., et al., *Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans*. EMBO J, 2005. **24**(13): p. 2481-9.
38. Verani, A., G. Gras, and G. Pancino, *Macrophages and HIV-1: dangerous liaisons*. Mol Immunol, 2005. **42**(2): p. 195-212.
39. Tremblay, M.J., *HIV-1 and pattern-recognition receptors: a marriage of convenience*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 363-5.
40. Geijtenbeek, T.B., et al., *DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells*. Cell, 2000. **100**(5): p. 587-97.

41. Cavrois, M., et al., *Human immunodeficiency virus fusion to dendritic cells declines as cells mature*. J Virol, 2006. **80**(4): p. 1992-9.
42. Kwon, D.S., et al., *DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection*. Immunity, 2002. **16**(1): p. 135-44.
43. Lambert, A.A., et al., *The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1299-307.
44. Dong, C., et al., *Characterization of human immunodeficiency virus type 1 replication in immature and mature dendritic cells reveals dissociable cis- and trans-infection*. J Virol, 2007. **81**(20): p. 11352-62.
45. Moir, S. and A.S. Fauci, *Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals*. Immunol Rev, 2013. **254**(1): p. 207-24.
46. Liu, J., et al., *IL-10-producing B cells are induced early in HIV-1 infection and suppress HIV-1-specific T cell responses*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e89236.
47. Hart, M., et al., *Loss of discrete memory B cell subsets is associated with impaired immunization responses in HIV-1 infection and may be a risk factor for invasive pneumococcal disease*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 8212-20.
48. Martin, G., et al., *Human immunodeficiency virus type 1-associated CD40 ligand transactivates B lymphocytes and promotes infection of CD4+ T cells*. J Virol, 2007. **81**(11): p. 5872-81.
49. Guermonprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 621-67.
50. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. Philadelphia: Saunders. 2006-2007: p. 324.
51. Blaak, H., et al., *In vivo HIV-1 infection of CD45RA(+)CD4(+) T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1269-74.
52. Regoes, R.R. and S. Bonhoeffer, *The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective*. Trends Microbiol, 2005. **13**(6): p. 269-77.
53. Mitsuya, H., et al., *3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(20): p. 7096-100.
54. Chun, T.W. and A.S. Fauci, *Latent reservoirs of HIV: obstacles to the eradication of virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 10958-61.
55. Coffin, J.M., *HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy*. Science, 1995. **267**(5197): p. 483-9.
56. Stockdale, L. and R. Newton, *A review of preventative methods against human leishmaniasis infection*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(6): p. e2278.
57. OMS, *Leishmaniose*. 2014.
58. Alvar, J., et al., *Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e35671.
59. van Griensven, J., et al., *Leishmaniasis in immunosuppressed individuals*. Clin Microbiol Infect, 2014. **20**(4): p. 286-99.
60. Zilberstein, D. and M. Shapira, *The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites*. Annu Rev Microbiol, 1994. **48**: p. 449-70.

61. Desjardins, M. and A. Descoteaux, *Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan*. J Exp Med, 1997. **185**(12): p. 2061-8.
62. Brittingham, A., et al., *Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis*. J Immunol, 1995. **155**(6): p. 3102-11.
63. McNeely, T.B. and S.J. Turco, *Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of Leishmania donovani within human monocytes*. J Immunol, 1990. **144**(7): p. 2745-50.
64. Zangger, H., J.C. Mottram, and N. Fasel, *Cell death in Leishmania induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis?* Cell Death Differ, 2002. **9**(10): p. 1126-39.
65. Ouellette, M., J. Drummel-Smith, and B. Papadopoulou, *Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments*. Drug Resist Updat, 2004. **7**(4-5): p. 257-66.
66. Sundar, S., et al., *Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India*. N Engl J Med, 2007. **356**(25): p. 2571-81.
67. Baiocco, P., et al., *Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis*. J Med Chem, 2009. **52**(8): p. 2603-12.
68. Forget, G., *Étude des mécanismes de régulation négative utilisés par Leishmania pour contrer la réponse immunitaire innée*, in Faculté de Médecine. 2004, Université Laval: Québec.
69. Filipi, C., et al., *L'immunité contre leishmanies*. 2001.
70. Mougneau, E., F. Bihl, and N. Glaichenhaus, *Cell biology and immunology of Leishmania*. Immunol Rev, 2011. **240**(1): p. 286-96.
71. Ghalib, H.W., et al., *IL-12 enhances Th1-type responses in human Leishmania donovani infections*. J Immunol, 1995. **154**(9): p. 4623-9.
72. Sacks, D.L., et al., *An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar*. J Immunol, 1987. **138**(3): p. 908-13.
73. Ghalib, H.W., et al., *Interleukin 10 production correlates with pathology in human Leishmania donovani infections*. J Clin Invest, 1993. **92**(1): p. 324-9.
74. Karp, C.L., et al., *In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma*. J Clin Invest, 1993. **91**(4): p. 1644-8.
75. Kenney, R.T., et al., *Splenic cytokine responses in Indian kala-azar before and after treatment*. J Infect Dis, 1998. **177**(3): p. 815-8.
76. White, A.C., Jr., et al., *Leishmania chagasi antigens recognized in cured visceral leishmaniasis and asymptomatic infection*. Am J Trop Med Hyg, 1992. **46**(2): p. 123-31.
77. Garg, R., et al., *Immunostimulatory cellular responses of cured Leishmania-infected patients and hamsters against the integral membrane proteins and non-membranous soluble proteins of a recent clinical isolate of Leishmania donovani*. Clin Exp Immunol, 2005. **140**(1): p. 149-56.
78. Groux, H., et al., *A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells*. J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1723-9.
79. Babaloo, Z., P.M. Kaye, and M.B. Eslami, *Interleukin-13 in Iranian patients with visceral leishmaniasis: relationship to other Th2 and Th1 cytokines*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2001. **95**(1): p. 85-8.

80. Gama, M.E., et al., *Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis*. Braz J Med Biol Res, 2004. **37**(1): p. 129-36.
81. Nylen, S., et al., *Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis*. J Exp Med, 2007. **204**(4): p. 805-17.
82. Verma, S., et al., *Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10107.
83. Gautam, S., et al., *IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis*. J Infect Dis, 2011. **204**(7): p. 1134-7.
84. Murphy, M.L., et al., *IL-10 mediates susceptibility to Leishmania donovani infection*. Eur J Immunol, 2001. **31**(10): p. 2848-56.
85. Coelho, Z.C., et al., *In vitro initial immune response against Leishmania amazonensis infection is characterized by an increased production of IL-10 and IL-13*. Braz J Infect Dis, 2010. **14**(5): p. 476-82.
86. Anderson, C.F., et al., *CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis*. J Exp Med, 2007. **204**(2): p. 285-97.
87. Stager, S., et al., *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, 2006. **36**(7): p. 1764-71.
88. Owens, B.M., et al., *IL-10-producing Th1 cells and disease progression are regulated by distinct CD11c(+) cell populations during visceral leishmaniasis*. PLoS Pathog, 2012. **8**(7): p. e1002827.
89. Belkaid, Y., et al., *The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of Leishmania major in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure*. J Exp Med, 2001. **194**(10): p. 1497-506.
90. Svensson, M., et al., *Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells*. Immunity, 2004. **21**(6): p. 805-16.
91. Miles, S.A., et al., *A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen Leishmania*. J Exp Med, 2005. **201**(5): p. 747-54.
92. Charmoy, M., et al., *Leishmania major induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(2): p. 288-99.
93. Maroof, A., et al., *Posttranscriptional regulation of III10 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function*. Immunity, 2008. **29**(2): p. 295-305.
94. Ronet, C., et al., *Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with Leishmania major through IL-10 production*. J Immunol, 2010. **184**(2): p. 886-94.
95. Deak, E., et al., *Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation*. Eur J Immunol, 2010. **40**(5): p. 1355-68.
96. Rosser, E.C., P.A. Blair, and C. Mauri, *Cellular targets of regulatory B cell-mediated suppression*. Mol Immunol, 2014.

97. Blair, P.A., et al., *CD19(+)**CD24(hi)**CD38(hi)* B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*, 2010. **32**(1): p. 129-40.
98. Morva, A., et al., *Maturation and function of human dendritic cells are regulated by B lymphocytes*. *Blood*, 2012. **119**(1): p. 106-14.
99. Bankoti, R., et al., *Marginal zone B cells regulate antigen-specific T cell responses during infection*. *J Immunol*, 2012. **188**(8): p. 3961-71.
100. Casato, M., et al., *Mixed cryoglobulinemia secondary to visceral Leishmaniasis*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(9): p. 2007-11.
101. Louzir, H., et al., *Natural autoantibodies, IgG antibodies to tetanus toxoid and CD5+ B cells in patients with Mediterranean visceral leishmaniasis*. *The Leishmania Study Group*. *Clin Exp Immunol*, 1994. **95**(3): p. 479-84.
102. Galvao-Castro, B., et al., *Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis*. *Clin Exp Immunol*, 1984. **56**(1): p. 58-66.
103. Bohme, M.W., et al., *Occurrence of autoantibodies to intermediate filament proteins in human visceral leishmaniasis and their induction by experimental polyclonal B-cell activation*. *Immunology*, 1986. **59**(4): p. 583-8.
104. Ronet, C., et al., *Leishmania major-specific B cells are necessary for Th2 cell development and susceptibility to L. major LV39 in BALB/c mice*. *J Immunol*, 2008. **180**(7): p. 4825-35.
105. Mitchell, G.F., *Murine cutaneous leishmaniasis: resistance in reconstituted nude mice and several F1 hybrids infected with Leishmania tropica major*. *J Immunogenet*, 1983. **10**(5): p. 395-412.
106. Rossi-Bergmann, B., I. Muller, and E.B. Godinho, *TH1 and TH2 T-cell subsets are differentially activated by macrophages and B cells in murine leishmaniasis*. *Infect Immun*, 1993. **61**(5): p. 2266-9.
107. Stager, S., T. Joshi, and R. Bankoti, *Immune evasive mechanisms contributing to persistent Leishmania donovani infection*. *Immunol Res*, 2010. **47**(1-3): p. 14-24.
108. Cabral, S.M., et al., *A Leishmania infantum cytosolic trypanredoxin activates B cells to secrete interleukin-10 and specific immunoglobulin*. *Immunology*, 2008. **123**(4): p. 555-65.
109. Mege, J.L., et al., *The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases*. *Lancet Infect Dis*, 2006. **6**(9): p. 557-69.
110. Desjeux, P., *Therapeutic options for visceral leishmaniasis*. *Med Mal Infect*, 2005. **35** (2): p. S74-6.
111. Singh, N., et al., *Natural product based leads to fight against leishmaniasis*. *Bioorg Med Chem*, 2014. **22**(1): p. 18-45.
112. Monge-Maillo, B. and R. Lopez-Velez, *Therapeutic options for visceral leishmaniasis*. *Drugs*, 2013. **73**(17): p. 1863-88.
113. Sundar, S. and J. Chakravarty, *Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy*. *Expert Opin Pharmacother*, 2013. **14**(1): p. 53-63.
114. Alvar, J., et al., *The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years*. *Clin Microbiol Rev*, 2008. **21**(2): p. 334-59, table of contents.
115. Garg, R., et al., *Leishmania infantum amastigotes enhance HIV-1 production in cocultures of human dendritic cells and CD4 T cells by inducing secretion of IL-6 and TNF-alpha*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2009. **3**(5): p. e441.



116. Preiser, W., et al., *Immunological findings in HIV-Leishmania coinfection*. Intervirology, 1996. **39**(4): p. 285-8.
117. Andreani, G., et al., *Mechanisms of interaction between protozoan parasites and HIV*. Curr Opin HIV AIDS, 2012. **7**(3): p. 276-82.
118. Zhao, C., B. Papadopoulou, and M.J. Tremblay, *Leishmania infantum enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network*. Clin Immunol, 2004. **113**(1): p. 81-8.
119. Beignon, A.S., et al., *Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3265-75.
120. Barral-Netto, M., et al., *Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis*. J Infect Dis, 1991. **163**(4): p. 853-7.
121. Bernier, R., et al., *The lipophosphoglycan of Leishmania donovani up-regulates HIV-1 transcription in T cells through the nuclear factor-kappaB elements*. J Immunol, 1998. **160**(6): p. 2881-8.
122. Lodge, R., et al., *HIV-1 promotes intake of Leishmania parasites by enhancing phosphatidylserine-mediated, CD91/LRP-1-dependent phagocytosis in human macrophages*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32761.
123. Azzam, R., et al., *Impaired complement-mediated phagocytosis by HIV type-1-infected human monocyte-derived macrophages involves a cAMP-dependent mechanism*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2006. **22**(7): p. 619-29.
124. Kedzierska, K., et al., *Defective phagocytosis by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection: underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy*. J Clin Virol, 2003. **26**(2): p. 247-63.
125. Molina, R., L. Gradoni, and J. Alvar, *HIV and the transmission of Leishmania*. Ann Trop Med Parasitol, 2003. **97** (1): p. 29-45.
126. Kumar, P., et al., *Nelfinavir, an HIV-1 protease inhibitor, induces oxidative stress-mediated, caspase-independent apoptosis in Leishmania amastigotes*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(3): p. e642.
127. Bacellar, O., et al., *IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis*. Cytokine, 2000. **12**(8): p. 1228-31.
128. Gasim, S., et al., *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, 1998. **111**(1): p. 64-9.
129. Alves, C.F., et al., *Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi*. Vet Immunol Immunopathol, 2009. **128**(4): p. 349-58.
130. Iwata, Y., et al., *Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells*. Blood, 2011. **117**(2): p. 530-41.
131. Tian, J., et al., *Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice*. J Immunol, 2001. **167**(2): p. 1081-9.
132. Hejazi, S., et al., *Interleukin-10 and Transforming Growth Factor-beta in Early and Late Lesions of Patients with Leishmania major induced Cutaneous Leishmaniasis*. Iran J Parasitol, 2012. **7**(2): p. 53-60.

133. Li, M.O., et al., *Transforming growth factor-beta regulation of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 99-146.
134. Sabat, R., et al., *Biology of interleukin-10*. Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(5): p. 331-44.
135. Bouaziz, J.D., et al., *IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro*. Eur J Immunol, 2010. **40**(10): p. 2686-91.
136. Ziegler, S.F., F. Ramsdell, and M.R. Alderson, *The activation antigen CD69*. Stem Cells, 1994. **12**(5): p. 456-65.
137. Santis, A.G., et al., *Structure of the gene coding for the human early lymphocyte activation antigen CD69: a C-type lectin receptor evolutionarily related with the gene families of natural killer cell-specific receptors*. Eur J Immunol, 1994. **24**(7): p. 1692-7.
138. Goldsby, R., T. Kindt, and B. Osborne, *Immunologie, Le Cours de Janis Kuby 2001*. Paris: Dunod: p. 252-254.
139. Goldsby, R.A., T.J. Kindt, and B.A. Osborne, *Immunologie: le cours de Janis Kuby: avec questions de révision*. Paris: Dunod. 2001.
140. Koppelman, B., et al., *Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 861-71.
141. Chang, C.H., M. Furue, and K. Tamaki, *Selective regulation of ICAM-1 and major histocompatibility complex class I and II molecule expression on epidermal Langerhans cells by some of the cytokines released by keratinocytes and T cells*. Eur J Immunol, 1994. **24**(11): p. 2889-95.
142. Willems, F., et al., *Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes*. Eur J Immunol, 1994. **24**(4): p. 1007-9.
143. Magombedze, G., et al., *Cellular and population plasticity of helper CD4(+) T cell responses*. Front Physiol, 2013. **4**: p. 206.
144. Cantor, J. and K. Haskins, *Effector function of diabetogenic CD4 Th1 T cell clones: a central role for TNF-alpha*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7738-45.
145. Pawelec, G., et al., *Differential secretion of tumor necrosis factor-alpha and granulocyte/macrophage colony-stimulating factors but not interferon-gamma from CD4+ compared to CD8+ human T cell clones*. Eur J Immunol, 1989. **19**(1): p. 197-200.
146. Tubo, N.J. and M.K. Jenkins, *CD4+ T Cells: Guardians of the Phagosome*. Clin Microbiol Rev, 2014. **27**(2): p. 200-13.
147. Barat, C., C. Gilbert, and M.J. Tremblay, *Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 in resting CD4+ T lymphocytes is induced by coculture with autologous dendritic cells in the absence of foreign antigens*. J Virol, 2009. **83**(6): p. 2778-82.
148. Bukrinsky, M.I., et al., *Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection*. Science, 1991. **254**(5030): p. 423-7.
149. Stevenson, M., et al., *HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration*. EMBO J, 1990. **9**(5): p. 1551-60.
150. Zack, J.A., et al., *HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure*. Cell, 1990. **61**(2): p. 213-22.
151. Lassen, K.G., et al., *Nuclear retention of multiply spliced HIV-1 RNA in resting CD4+ T cells*. PLoS Pathog, 2006. **2**(7): p. e68.



152. Cameron, P.U., et al., *Establishment of HIV-1 latency in resting CD4+ T cells depends on chemokine-induced changes in the actin cytoskeleton*. Proc Natl Acad Sci USA, 2010. **107**(39): p. 16934-9.
153. Krombach, F., et al., *Cell size of alveolar macrophages: an interspecies comparison*. Environ Health Perspect, 1997. **105** p. 1261-3.
154. Kootstra, N.A., et al., *Interference of interleukin-10 with human immunodeficiency virus type 1 replication in primary monocyte-derived macrophages*. J Virol, 1994. **68**(11): p. 6967-75.
155. Kwon, D.S. and D.E. Kaufmann, *Protective and detrimental roles of IL-10 in HIV pathogenesis*. Eur Cytokine Netw, 2010. **21**(3): p. 208-14.
156. Kedzierska, K., et al., *HIV-1 down-modulates gamma signaling chain of Fc gamma R in human macrophages: a possible mechanism for inhibition of phagocytosis*. J Immunol, 2002. **168**(6): p. 2895-903.
157. Pugliese, A., et al., *Phagocytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection*. Clin Diagn Lab Immunol, 2005. **12**(8): p. 889-95.
158. Zhao, C., et al., *In primary human monocyte-derived macrophages exposed to Human immunodeficiency virus type 1, does the increased intracellular growth of Leishmania infantum rely on its enhanced uptake?* J Gen Virol, 2006. **87**(5): p. 1295-302.
159. Zhao, C., B. Papadopoulou, and M.J. Tremblay, *Leishmania infantum promotes replication of HIV type 1 in human lymphoid tissue cultured ex vivo by inducing secretion of the proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1 alpha*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 3086-93.