

L'immunité contre les leishmanies

Christophe Filippi
Laurent Malherbe
Valérie Julia
Nicolas Glaichenhaus

Les leishmanies sont essentiellement connues en tant qu'outils indispensables pour comprendre le fonctionnement du système immunitaire. C'est par l'étude de souris infectées par des leishmanies qu'une partie des mécanismes qui gouvernent la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en cellules de type Th1 productrices d'interféron γ ou en cellules de type Th2 productrices d'interleukines (IL-4, IL-5, IL-13) a été élucidée. Cela a aussi permis de préciser les cinétiques d'activation, de différenciation et d'expansion des lymphocytes auxiliaires au cours d'une réponse immunitaire physiologique. Les travaux en cours devraient permettre d'identifier les molécules intervenant dans les phénomènes de coopération entre les nombreux types cellulaires qui participent à la réponse immunitaire et d'identifier de nouveaux gènes impliqués.

Les leishmanies sont des protozoaires qui parasitent les macrophages de plusieurs espèces de mammifères, dont l'espèce humaine. Comme de très nombreux autres pathogènes, ces parasites ont également la particularité d'utiliser un hôte invertébré, en l'occurrence des insectes appelés phlébotomes, pour leur dissémination et leur transmission. Chez l'homme, les manifestations cliniques de l'infection sont différentes selon l'espèce de *Leishmania* et selon le statut immunologique de l'hôte. Dans la majorité des cas, l'infection est asymptomatique ou se traduit par des lésions cutanées qui guérissent spontanément. Dans d'autres cas, les lésions affectent aussi le derme (leishmanioses mucocutanées), ou

les organes internes (leishmanioses viscérales). Les leishmanioses sont largement répandues sur tous les continents excepté l'Océanie. Recensées dans 88 pays, 90 % des leishmanioses viscérales sont concentrées au Bangladesh, au Brésil, en Inde et au Soudan ; 90 % des leishmanioses mucocutanées surviennent en Bolivie, au Brésil et au Pérou tandis que 90 % des leishmanioses cutanées se manifestent en Afghanistan, en Algérie, au Brésil, en Iran, au Pérou, en Arabie Saoudite et en Syrie. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 12 millions d'individus sont actuellement atteints de leishmaniose et 2 millions de nouveaux cas sont répertoriés chaque année. Enfin, les leishmanioses constituent pour des individus immunodéprimés des para-

ADRESSE

C. Filippi, L. Malherbe, V. Julia, N. Glaichenhaus: Cnrs UMR 6097, Université de Nice-Sophia Antipolis, 660, route des Lucioles, 06560 Valbonne, France.
E-mail : glaichenhaus@ipmc.cnrs.fr

sitoses qualifiées d'opportunistes souvent associées à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), notamment dans le Sud de l'Europe.

Les leishmanies : un parasite idéal pour comprendre le fonctionnement du système immunitaire

Bien que les leishmanioses constituent un important problème de santé publique à l'échelle de la planète, les leishmanies sont surtout connues au sein de la communauté des immunologistes parce que ces parasites ont été, et sont toujours, des outils très utiles pour comprendre le fonctionnement du système immunitaire. En particulier, c'est en étudiant des souris de laboratoire infectées par des leishmanies que les immunologistes ont réussi à élucider une partie des mécanismes qui gouvernent la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en cellules de type Th1 productrices d'interféron- γ (IFN- γ) ou en cellules de type Th2 productrices d'interleukine-4 (IL-4), d'IL-5 et d'IL-13. C'est encore en étudiant des souris atteintes de leishmaniose qu'il a été possible de préciser les cinétiques d'activation, de différenciation et d'expansion des lymphocytes auxiliaires au cours d'une réponse immunitaire physiologique. L'objectif de cette revue est de faire le point sur ce que nous savons aujourd'hui de l'immunité anti-leishmanies chez la souris, mais également de donner au lecteur des indications sur ce que ce modèle expérimental pourra peut être nous apporter dans les prochaines années. Pour plus de simplicité, nous nous limiterons aux données expérimentales obtenues avec le parasite *Leishmania major*, une espèce de leishmanies qui ne provoque que des lésions bénignes chez l'homme mais qui peut provoquer la mort de souches de souris génétiquement sensibles comme la souris BALB/c.

Les premières étapes de l'invasion

Heureusement pour les immunologistes, il n'est pas nécessaire d'élever des phlébotomes dans son labora-

toire pour travailler sur les leishmanies. Il est en effet possible de propager la forme infectieuse du parasite, dite promastigote métacyclique, dans des fioles contenant du milieu de culture. Les promastigotes peuvent alors être purifiés, puis injectés dans le coussinet plantaire ou le derme de l'oreille de souris adultes. Selon le nombre de promastigotes injectés, l'infection provoque plus ou moins rapidement l'apparition de lésions cutanées au site de l'injection. Une grande majorité des souches de souris sont capables de contrôler la répllication du parasite, et les lésions cutanées régressent spontanément. Le parasite n'est toutefois jamais complètement éliminé et des formes dormantes peuvent être trouvées dans le foie et les organes lymphoïdes de souris infectées plus de 2 ans après l'infection.

Une fois injectés, les promastigotes sont confrontés à une première barrière: les protéines du complément. L'activation de ces protéines par la voie dite classique entraîne la fixation de C3 sur la membrane plasmique des parasites et son clivage en C3b. C3b peut alors se fixer au lipophosphoglycane (LPG) ou à la protéine gp63 du parasite, et induire sa destruction en déclenchant la formation du complexe lytique C5b-9. Toutefois, les promastigotes utilisent des

stratagèmes qui leur permettent de résister à la lyse par le complément. Ainsi, la protéine parasitaire gp63 favorise la protéolyse de C3b et sa conversion en molécule inactive C3bi. De plus, les promastigotes possèdent sur la face externe de leur membrane plasmique des protéines kinases capables d'inactiver C3 et C3b en les phosphorylant. Enfin, même si ces mécanismes ne sont pas complètement efficaces pour empêcher la formation du complexe C5b-9, les promastigotes sont partiellement protégés de la lyse par la présence à leur surface de LPG qui bloque l'accès des complexes C5b-9 à la membrane plasmique (figure 1).

Les leishmanies sont également rapidement confrontées aux polynucléaires neutrophiles, des phagocytes professionnels normalement présents dans le sang mais que l'on trouve en abondance au niveau du site inflammatoire 1 à 2 heures après l'infection [1]. L'élimination des neutrophiles entraîne une aggravation des lésions et une augmentation transitoire de la charge parasitaire. Toutefois, des souris dépourvues de neutrophiles finissent par guérir. Ces cellules ne sont donc pas indispensables pour la résistance au parasite, même si leur mobilisation rapide contribue à limiter la multiplication des leishmanies au début de l'infection.

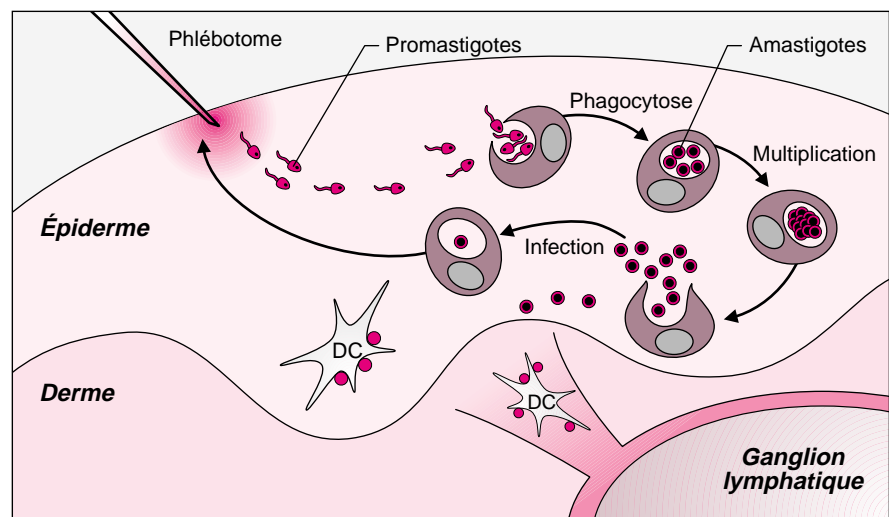


Figure 1. **Les premières étapes de l'invasion.** Le schéma représente l'invasion des macrophages par les promastigotes, leur métamorphose en amastigotes, et la capture des leishmanies ou de leurs antigènes par les cellules dendritiques (DC). La capture des leishmanies par les cellules dendritiques induit leur maturation et leur migration vers le ganglion lymphatique drainant le site de l'infection.

Comme les neutrophiles, les macrophages peuvent capturer des micro-organismes par phagocytose. Dans le cas des leishmanies, la phagocytose des promastigotes est mise en route par l'engagement des récepteurs CR1 et CR3 avec les protéines C3b et C3bi fixées à la surface des promastigotes [2]. Une fois à l'intérieur des macrophages, les promastigotes induisent la formation de vacuoles parasitophores (VP) où ils se métamorphosent en amastigotes. Dans le cas de l'infection par *L. major*, ces vacuoles sont de petite taille et abritent chacune un seul ou un petit nombre de parasites. Comme les vésicules des compartiments prélysosomiaux ou lysosomiaux, les vacuoles parasitophores se caractérisent par un pH acide inférieur à 5. Les vacuoles parasitophores contiennent des quantités importantes de protéines lysosomiales et leur membrane est associée à plusieurs protéines impliquées dans les processus de dégradation et d'apprêtement des antigènes. Contrairement à d'autres pathogènes, les leishmanies résistent relativement bien à l'environnement inhospitalier des vacuoles parasitophores. Ainsi, les amastigotes sont des organismes acidophiles dont le métabolisme est optimal entre pH 4 et 5,5 [3]. Ils sont résistants aux hydrolases et notamment aux protéases lysosomiales, vraisemblablement parce que les protéines qu'ils expriment à leur surface sont masquées par des glyco-inositol-phospholipides.

L'infection des macrophages par des pathogènes intracellulaires induit généralement la production rapide de facteurs chimiotactiques (MIP-1 α , MCP-1) et de cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12) qui provoquent et amplifient la réaction inflammatoire en attirant et en activant d'autres cellules du système immunitaire. De même, les macrophages infectés par des microorganismes produisent généralement des molécules toxiques comme les dérivés actifs de l'oxygène et le monoxyde d'azote (NO). Même si ces phénomènes sont observés chez les souris infectées par les leishmanies, celles-ci ont évolué de manière à limiter la production de ces molécules qui pourraient leur être fatales. Ainsi, les leishmanies bloquent partiellement la production

par les macrophages de dérivés actifs de l'oxygène et du NO. Les molécules parasitaires responsables de cette inhibition sont le LPG et gp63 qui inhibent la production de dérivés actifs de l'oxygène en agissant sur la protéine kinase C [4] ou en dégradant l'un de ses substrats: la protéine MRP. Les glyco-inositol-phospholipides, qui sont présents en abondance dans la membrane plasmique des leishmanies, sont eux responsables de l'inhibition de la production de NO. Enfin, les macrophages infectés par les leishmanies ne produisent que peu ou pas d'IL-12 [5], une cytokine pourtant déterminante dans le développement d'une immunité protectrice. Une stratégie d'échappement similaire est utilisée par le virus de la rougeole et par le VIH pour limiter le développement d'une réponse immunitaire qui pourrait entraîner leur destruction.

Le transport des parasites et la première rencontre avec les lymphocytes T

Comme nous l'avons vu plus haut, les leishmanies ont développé des stratégies qui limitent leur destruction par le complément et les cellules de l'immunité innée. Heureusement pour les individus infectés, les mammifères possèdent d'autres cellules, les lymphocytes T CD4⁺, qui nécessitent plus de temps pour se mobiliser mais dont l'activation permet de contrôler la multiplication et la propagation du parasite. Contrairement aux cellules de l'immunité innée qui reconnaissent des structures ou des molécules chimiques qui ne se trouvent que chez les microorganismes pathogènes (par exemple le LPG dans le cas des leishmanies), les lymphocytes T CD4⁺ possèdent à leur surface des récepteurs (RcT) qui reconnaissent des complexes formés par des peptides antigéniques associés de manière non covalente à des molécules de surface codées par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Grâce à des mécanismes de recombinaison permettant d'engendrer un grand nombre de RcT différents à partir d'un petit nombre de segments génétiques, le compartiment T du système immunitaire des mammifères est constitué

de plusieurs millions de lymphocytes T reconnaissant chacun un ligand peptide/CMH particulier. Un nombre considérable de lymphocytes T de spécificités différentes sont ainsi produits chaque jour dans le thymus. Ces cellules, que l'on qualifie de naïves parce qu'elles n'ont encore jamais rencontré leur ligand spécifique, passent ensuite dans le sang et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires: les ganglions lymphatiques et la rate. En l'absence de situation inflammatoire, ces lymphocytes T naïfs ne séjournent que quelques heures dans ces organes qu'ils quittent en passant dans la lymphe (dans le cas des cellules des ganglions) ou dans le sang (dans le cas des cellules de la rate). Étant donné la grande diversité des RcT, la proportion des lymphocytes T spécifiques d'un micro-organisme est très faible. Pour que ces lymphocytes T puissent jouer un rôle dans le développement d'une immunité anti-infectieuse, une phase d'expansion est donc nécessaire. Dans le cas des leishmanies, l'activation et l'expansion sélective des lymphocytes T anti-parasite s'effectue dans le ganglion lymphatique qui draine le site de l'infection. Cette activation n'est toutefois possible que grâce à des cellules spécialisées dans le transport des antigènes: les cellules dendritiques de l'épiderme ou cellules de Langerhans (*figure 2*). Lorsque les promastigotes pénètrent dans l'organisme, ces cellules qui résident dans l'épiderme migrent dans le derme où elles phagocytent des fragments de parasites ou des parasites ayant échappé à la destruction. Si la nature des récepteurs impliqués dans la phagocytose des leishmanies est controversée, il a été établi que l'ingestion des leishmanies par les cellules dendritiques immatures induisait leur maturation et leur migration du site inflammatoire vers le ganglion lymphatique drainant [6]. Au cours de ce phénomène de maturation, les cellules dendritiques, ou peut-être certaines sous-populations de ces cellules, dégradent les antigènes parasitaires en peptides et représentent ces peptides à leur surface sous la forme de complexes stables avec les molécules du CMH de classe II. *In vitro*, il a également été montré que ce phénomène de maturation s'accompa-

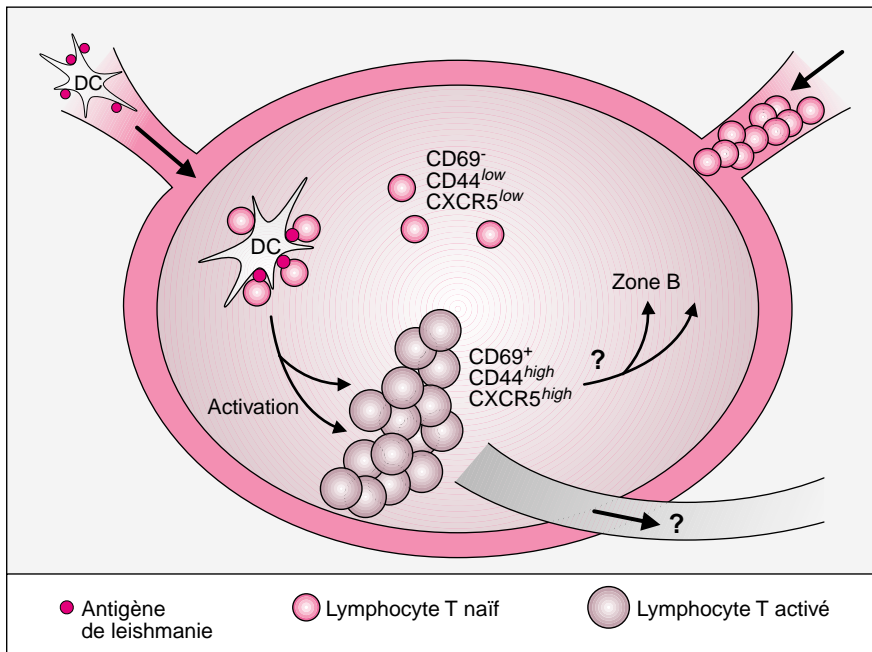


Figure 2. **L'activation et la différenciation des lymphocytes T CD4⁺.** Les cellules dendritiques chargées en antigènes parasitaires activent les lymphocytes T naïfs présents dans le ganglion lymphatique. L'activation provoque une augmentation de la taille des cellules, leur progression à travers le cycle cellulaire, et des modifications phénotypiques comme l'expression à leur surface de la molécule CD69 ou l'augmentation de l'expression de la molécule CD44 ou du récepteur de la chimiokine CXCR5. Une fois activés, les lymphocytes T activés migrent vraisemblablement vers la zone B du ganglion ou quittent le ganglion par les vaisseaux lymphatiques efférents.

gnait d'une augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86 à la surface des cellules dendritiques [7]. Curieusement, très peu de données expérimentales sont actuellement disponibles sur le phénotype des cellules dendritiques qui présentent les antigènes de leishmanies *in vivo*.

Activation, différenciation et migration des lymphocytes T

Des cellules dendritiques présentant à leur surface des molécules du CMH associées à des peptides de *L. major* commencent à être détectées dans le ganglion 24 heures après l'infection. Même si il n'a pas encore été possible de déterminer dans quelle région du ganglion se trouvaient ces cellules, des études effectuées dans d'autres modèles expérimentaux suggèrent fortement qu'elles sont localisées dans la zone T du ganglion. Les cellules dendritiques chargées en

antigène se trouvant à proximité des lymphocytes T, les conditions sont donc *a priori* réunies pour que les lymphocytes anti-parasite soient activés et prolifèrent. Cette hypothèse a été confirmée expérimentalement dans notre laboratoire grâce à la production et à l'utilisation de sondes fluorescentes se fixant sélectivement à des lymphocytes T spécifiques d'un antigène parasitaire [8]. Les résultats de cette étude montrent que l'infection par *L. major* induit une expansion à la fois transitoire et très rapide des lymphocytes T anti-parasite dans le ganglion drainant. Cette expansion s'accompagne d'une progression rapide de ces lymphocytes à travers le cycle cellulaire et de changements phénotypiques caractéristiques de l'activation lymphocytaire: expression de CD69, augmentation de l'expression de CD44 et du récepteur des chimiokines CXCR5. L'expansion des lymphocytes T anti-parasite dans le ganglion est maximale 3 jours après l'infection. Ces cellules apparaissent ensuite dans la

circulation sanguine, dans la rate et, curieusement, dans le foie. Une fois activés, les lymphocytes T anti-parasite se différencient en cellules effectrices productrices de cytokines. Chez les souris génétiquement résistantes au parasite, c'est-à-dire chez la très grande majorité des souches de laboratoire, les lymphocytes T anti-parasite se différencient principalement en lymphocytes T de type Th1 qui sécrètent de l'IFN- γ , une cytokine indispensable au contrôle de la multiplication du parasite [9]. Ainsi, l'introduction d'une mutation dans le gène de l'IFN- γ ou l'administration d'anticorps anti-IFN- γ à des souris de génotype sauvage, provoque une augmentation de la charge parasitaire et une nécrose progressive des lésions (figure 3).

La différenciation des lymphocytes T anti-parasite en cellules de type Th1 étant déterminante pour le contrôle de l'infection, de nombreux chercheurs ont voulu identifier les molécules qui jouaient un rôle dans ce processus. Il semble maintenant acquis que des interactions moléculaires déterminantes se produisent au niveau de la synapse immunologique, la structure qui permet des contacts étroits entre cellules dendritiques et lymphocytes T [10]. Cette synapse a été étudiée en détail dans de nombreux systèmes expérimentaux et d'excellentes revues ont été publiées récemment sur ce sujet. Contrairement aux résultats obtenus dans d'autres modèles, certaines interactions moléculaires ne semblent jouer qu'un rôle limité dans la différenciation des lymphocytes T anti-parasite en cellules Th1. Ainsi, des souris porteuses d'une mutation dans le gène de la molécule de co-stimulation CD28 sont toujours capables de développer une réponse de type Th1 et de contrôler la multiplication du parasite [11]. De même, le blocage des interactions entre les molécules CD27, 4-1BB, CD30, OX40 et leurs ligands respectifs n'affecte pas la capacité des souris infectées à contrôler l'infection [12]. A l'inverse, la différenciation des lymphocytes T en cellules Th1 nécessite l'interaction entre CD154, une protéine de la famille du TNF- α exprimée à la surface des lymphocytes T, et son récepteur CD40 présent à la surface des cellules dendritiques et des lympho-

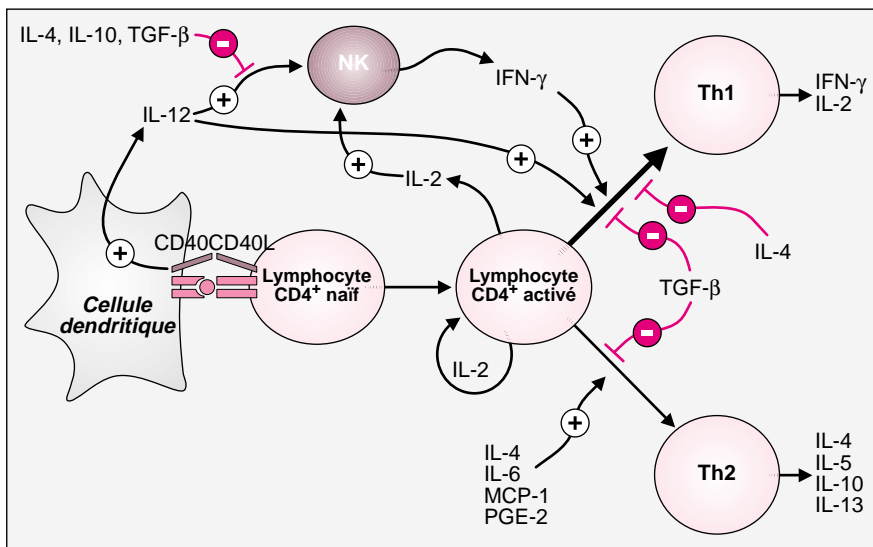


Figure 3. **Les paramètres influençant la différenciation des lymphocytes T CD4⁺.** L'activation des lymphocytes T naifs dépend de l'interaction entre le R_cT exprimé à la surface de ces cellules et le ligand peptide/CMH présenté par les cellules dendritiques. La fixation de CD40L à son récepteur CD40 induit la production d'IL-12 par les cellules dendritiques. L'IL-12 stimule la production d'IFN- γ par les cellules NK et favorise la différenciation des lymphocytes T naifs en cellules Th1. Le schéma met également en évidence la polarisation préférentielle des lymphocytes T naifs en cellules de type Th1 et le rôle de différentes cytokines dans l'orientation de cette polarisation.

cytes B. Ainsi, des souris porteuses de mutations dans les gènes de CD40 ou de CD154 sont incapables de développer une réponse protectrice de type Th1 [13] à moins de recevoir quotidiennement une injection d'IL-12 recombinante. La fixation de CD154 à CD40 semble donc avoir pour fonction principale de stimuler la production d'IL-12, un mécanisme compatible avec le rôle déterminant de cette cytokine dans la différenciation des lymphocytes T en cellules Th1 [14]. Curieusement, il existe encore une controverse sur la nature des cellules qui produisent de l'IL-12 chez les souris infectées [5, 7]. De plus, il est difficile de déterminer si l'IL-12 agit de manière directe sur les lymphocytes T ou de manière indirecte en favorisant la production d'IFN- γ par les cellules NK (*natural killer*). Ces deux hypothèses ne sont d'ailleurs pas exclusives l'une de l'autre et il est très probable que les deux phénomènes se produisent simultanément. En effet, l'IL-12 est un activateur puissant des cellules NK, et l'élimination des cellules NK au moment de l'infection provoque une dissémination plus rapide du parasite sans toutefois compromettre

la guérison des animaux [15]. De plus, des études *in vitro* ont montré que l'IL-12 agissait directement sur les cellules T CD4⁺ naives en activant la transcription du gène de l'IFN- γ et en inhibant celle du gène de l'IL-4 *via* le facteur de transcription STAT-4 et la protéine T-BET. D'autres cytokines agissent en synergie avec l'IL-12 pour favoriser la polarisation des lymphocytes T naifs en cellules de type Th1. Ainsi, outre son rôle tardif dans l'activation des fonctions leishmanicides des macrophages, l'IFN- γ agit au début de l'infection en favorisant la production d'IL-1. De plus, la présence d'IFN- γ permet aux lymphocytes T de conserver leur capacité de réponse à l'IL-12 en maintenant à leur surface des niveaux d'expression élevés de son récepteur. Enfin, l'IFN- γ favorise indirectement le développement d'une réponse Th1 en limitant l'expansion des lymphocytes Th2. Comme l'IFN- γ , l'IL-18 agit en synergie avec l'IL-12 pour favoriser la différenciation des lymphocytes en cellules de type Th1 [16]. Ainsi, des souris de la souche CD1 porteuses d'une mutation dans le gène de l'IL-18 produisent des quantités réduites

d'IFN- γ et présentent une résistance diminuée à *L. major* [17]. Une augmentation transitoire de la charge parasitaire sans diminution de la production d'IFN- γ a également été observée chez des souris C57BL/6 déficientes en IL-18.

La destruction des leishmanies

Une fois activés dans le ganglion drainant le site de l'infection, les lymphocytes T anti-parasite sont vraisemblablement recrutés au niveau du site inflammatoire. Cette hypothèse communément admise n'a toutefois jamais été démontrée expérimentalement puisqu'il n'a pas encore été techniquement possible de visualiser les lymphocytes T anti-parasite au niveau du site inflammatoire. Il semble toutefois acquis que la mobilisation des lymphocytes T anti-parasite conduit à une élimination des parasites par deux mécanismes complémentaires qui mettent en jeu les macrophages. Un de ces mécanismes est la destruction des macrophages infectés et le relargage des amastigotes dans le milieu extracellulaire. Ce phénomène dépend de l'interaction entre CD95L, une molécule de la famille du TNF- α exprimée à la surface des lymphocytes Th1, et son récepteur CD95, une molécule dont l'engagement induit la mort par apoptose et dont l'expression à la surface des macrophages infectés est augmentée par l'IFN- γ [18]. Le deuxième mécanisme par lequel les lymphocytes T participent à l'élimination des leishmanies est l'activation des propriétés leishmanicides des macrophages. Cette activation est principalement due à l'induction par l'IFN- γ de l'expression de la NO synthase (iNOS) [19], une enzyme qui catalyse la synthèse d'un composé toxique pour les amastigotes, le monoxyde d'azote (NO) (figure 4). Ainsi, la protéine iNOS a pu être détectée en quantité importante dans les sites inflammatoires et dans les ganglions lymphatiques de souris infectées par *L. major* [20]. En outre, des souris porteuses d'une mutation dans le gène de iNOS succombent à l'infection [21]. Un résultat similaire a été obtenu en traitant des souris de génotype sauvage avec un inhibiteur de iNOS. L'induction de la synthèse

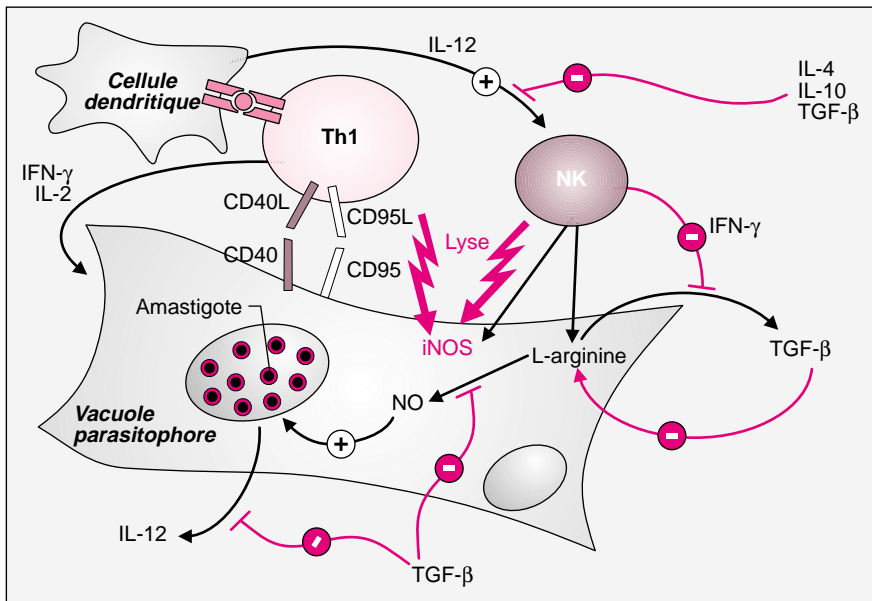


Figure 4. **La destruction des leishmanies.** Le schéma représente un macrophage infecté et sa vacuole parasitophore contenant des amastigotes. Chez les souris des souches résistantes, les macrophages infectés sont activés par l'IFN- γ produit par les lymphocytes Th1 et les cellules NK. Cette activation stimule la production de l'enzyme iNOS qui catalyse la formation de NO à partir de L-arginine. Le schéma met également en évidence le rôle de l'IL-12 produite par les cellules dendritiques et les macrophages dans la stimulation des cellules NK. Le rôle de l'IL-4, de l'IL-10 et du TGF- β dans l'inhibition des fonctions leishmanicides des macrophages est également indiqué.

de iNOS par les macrophages dépend à la fois de la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T et les cellules NK et de la sécrétion auto-crine de TNF- α par les macrophages. L'effet du TNF- α sur la synthèse de iNOS est toutefois modeste puisque des souris porteuses de mutations dans les gènes du TNF- α ou de son récepteur p55, restent capables de limiter la multiplication de *L. major*.

Persistence du parasite et mémoire immunitaire

Grâce à l'action des lymphocytes T sur les macrophages, les souris infectées réussissent à contrôler la multiplication des leishmanies et à limiter leur dissémination. Ainsi, quelques semaines après l'infection, la charge parasitaire mesurée au niveau du site inflammatoire ou dans les ganglions lymphatiques est considérablement réduite par rapport à celle mesurée quelques jours après l'injection du parasite. Toutefois, des techniques sensibles de détection ont montré qu'un petit nombre de parasites pouvait persister dans les ganglions lymphatiques,

la rate et la moelle osseuse plusieurs mois après la guérison des lésions cutanées [22]. Ces parasites sont parfois trouvés dans des macrophages ou des cellules dendritiques, mais le plus souvent dans des fibroblastes réticulés, des cellules qui constituent un refuge pour les amastigotes car elles ne disposent que d'un pouvoir leishmanicide limité [23]. Le maintien de l'infection sous forme latente dépend de la synthèse continue de NO, une réaction chimique catalysée par la protéine iNOS. Ainsi, des quantités élevées d'iNOS continuent à être détectées au niveau des sites inflammatoires et dans les ganglions lymphatiques plusieurs mois après l'infection. De plus, l'administration d'un inhibiteur de iNOS à des souris guéries depuis plusieurs mois entraîne une multiplication massive du parasite et l'apparition de nouvelles lésions. Enfin, il est maintenant acquis que le maintien d'une expression élevée de iNOS plusieurs mois après l'infection dépend de la stimulation chronique de lymphocytes T CD4⁺ anti-parasite. Ainsi, l'élimination sélective, même par-

tielle, de ces cellules chez des souris ayant survécu à l'infection entraîne une augmentation de la charge parasitaire, un phénomène comparable à celui observé chez l'homme dans le cas de patients infectés par le VIH. Malgré ce dernier résultat, très peu d'informations sont actuellement disponibles sur le phénotype, la durée de vie et la fréquence de renouvellement des lymphocytes T anti-parasite chez des souris résistantes. Il semble néanmoins que le maintien d'une immunité protectrice contre le parasite nécessite la production continue d'IL-12. Ainsi, le contrôle de la multiplication du parasite par des souris déficientes en IL-12 n'est possible que si ces souris sont traitées périodiquement avec de l'IL-12 recombinante (l'interruption du traitement entraîne la multiplication massive du parasite) [24].

Les souris BALB/c

Contrairement à la très grande majorité des souches de souris utilisées en laboratoire, les souris BALB/c sont incapables de contrôler la multiplication des leishmanies et succombent à l'infection. Ces animaux constituent donc un modèle expérimental particulièrement bien adapté à l'identification des gènes impliqués dans le développement d'une réponse immunitaire. Pour cela, une démarche classique consiste à croiser des souris résistantes (C57BL/6 ou B10.D2) avec des souris BALB/c. Les souris obtenues sont ensuite croisées entre elles, et les descendants analysés individuellement pour leur capacité de résistance à l'infection et pour la présence dans leur génome de marqueurs caractéristiques de chacune des deux souches parentales. Ce type d'analyse a montré que la résistance aux leishmanies était un phénotype complexe déterminé par plusieurs gènes. Une de ces études a permis de localiser trois locus: *lmr1* qui correspond au locus du CMH sur le chromosome 17, *lmr2* sur le chromosome 9 et *lmr3* sur le chromosome X [25]. Une stratégie complémentaire consiste à sélectionner les souris F2 les plus résistantes au parasite, et à les croiser avec des souris BALB/c. Cette opération, si elle est effectuée pendant plusieurs générations, permet d'obtenir des souris congéniques

qui ne diffèrent des souris BALB/c que par la présence dans leur génome de un ou plusieurs locus provenant des souris résistantes. L'utilisation de cette approche a permis d'identifier 6 locus génétiques supplémentaires localisés sur les chromosomes 6, 7, 10, 11, 15 et 16 [26]. De manière intéressante, aucun de ces locus ne confère à lui seul la résistance aux leishmanies. La souris BALB/c apparaît donc comme un animal porteur de plusieurs mutations dont l'accumulation permet la multiplication du parasite. Un des enjeux importants pour les prochaines années sera l'identification de ces gènes, de leur mode d'action et des cellules dans lesquels ils s'expriment. Même si pratiquement aucune information n'est actuellement disponible sur ce sujet, la construction de souris chimériques dont les compartiments « T » et « non T » proviennent de différentes souches parentales a permis de montrer que ces deux compartiments étaient déficients chez les souris BALB/c [27].

Parallèlement aux approches génétiques, des études plus descriptives ont comparé qualitativement et quantitativement les réponses immunitaires innées et adaptatives chez les souris BALB/c et chez les autres souches. Ainsi, bien que les polynucléaires neutrophiles soient rapidement recrutés au niveau du site inflammatoire chez toutes les souris étudiées, la proportion de ces cellules dans l'infiltrat diminue rapidement chez les souris résistantes alors qu'elle reste élevée chez les souris BALB/c [1]. D'autres différences concernent les macrophages qui sont deux fois plus nombreux dans les sites inflammatoires des souris résistantes que dans ceux des souris sensibles. De plus, contrairement à ceux des autres souches, les macrophages des souris BALB/c présentent la particularité de perdre rapidement leur capacité de produire de l'IL-12 lorsqu'ils sont stimulés par du LPS et de l'IFN- γ . De plus, l'activité des cellules NK est plus importante chez les souris résistantes que chez les souris sensibles [28]. Ce phénomène pourrait avoir pour origine une expression différente des chimiokines IP-10 et MCP-1 et de la lymphotactine dans les ganglions des souris résistantes et

dans ceux des souris sensibles [29]. Enfin, il est possible que des cytokines inhibitrices de l'activité NK soient présentes en plus grande quantité chez les souris sensibles que chez les souris résistantes. En accord avec cette hypothèse, la neutralisation chez les souris BALB/c de l'IL-4, de l'IL-10 et surtout du TGF- β , conduit à une restauration de l'activité NK, à une dissémination plus lente du parasite, et à une diminution de la charge parasitaire [15, 30]. Comme les réponses innées, les réponses adaptatives sont qualitativement différentes chez les souris BALB/c et chez les souris des autres souches [9]. Ainsi, alors que les lymphocytes T CD4⁺ anti-parasite des souris résistantes sont principalement de type Th1, ceux des souris BALB/c sont majoritairement de type Th2. D'autres études ont montré qu'il existait une relation de cause à effet entre la réponse de type Th2 développée par les souris BALB/c et leur incapacité à contrôler la multiplication des leishmanies. Ainsi, toute manipulation immunologique ou génétique capable de limiter cette réponse Th2 chez la souris BALB/c conduit à une augmentation de la réponse Th1 et à une diminution de la charge parasitaire. L'étude de ce phénomène a été à l'origine de très nombreuses publications et a permis de préciser le rôle de différentes molécules (cytokines, molécules de costimulation) dans la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ en cellules Th1 ou Th2. Toutefois, malgré de nombreux efforts, il n'a pas encore été possible de déterminer pourquoi les souris BALB/c montent une réponse de type Th2 et pas une réponse de type Th1. Bien que les différences observées au niveau de la réponse innée puissent expliquer en partie celles observées au niveau de la réponse adaptative, il a également été montré que l'infection par les leishmanies induisait une production très rapide d'IL-4 dans le ganglion drainant des souris BALB/c mais pas dans ceux de certaines souches résistantes. Les cellules responsables de cette production d'IL-4 sont des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques d'un antigène parasite appelé LACK [31-33]. Ces lymphocytes T anti-LACK jouent un rôle déterminant dans la sensibilité au parasite puisque

des souris BALB/c chez lesquelles ces cellules ont été éliminées par des manipulations génétiques ou immunologiques développent une réponse de type Th1 et deviennent résistantes aux leishmanies. Parallèlement à ces travaux, d'autres études ont montré que les lymphocytes T des souris BALB/c et ceux des souris résistantes n'avaient pas les mêmes capacités intrinsèques de se différencier en cellules de type Th1 ou Th2. Ainsi, dans des conditions de stimulation « neutres », des lymphocytes T naifs de souris BALB/c produisent plus d'IL-4 lorsqu'ils sont stimulés *in vitro* que ceux des souris C57BL/6 ou B10.D2 [34]. Ce phénotype est contrôlé par un locus appelé *dice-1* localisé sur le chromosome 16. Malgré ce phénotype particulier, les lymphocytes T des souris BALB/c peuvent se différencier en cellules Th1 en présence d'IL-12. Toutefois, à la différence des lymphocytes T des souris résistantes, la production d'IFN- γ par les cellules des souris BALB/c n'est maximale qu'en présence d'IL-1 β ou de TNF- α . Une autre particularité des lymphocytes T des souris BALB/c est que ces cellules perdent rapidement leur capacité de réponse à l'IL-12 sous l'influence de l'IL-4 et du TGF- β . Ce phénomène a pour cause la diminution de l'expression d'une des sous-unités du récepteur de l'IL-12. Il a été observé *in vivo* dans les ganglions de souris infectées [35], et *in vitro* après stimulation antigénique [36]. Ce phénotype est sous le contrôle d'au moins deux locus génétiques: *Tpm1* sur le chromosome 11 et *Tpm2* sur le chromosome 15 [37].

In vitro, la synthèse de iNOS par les macrophages est augmentée en présence d'IFN- γ et inhibée par le TGF- β , l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 [38]. Ainsi, l'incapacité des souris BALB/c de limiter la multiplication du parasite peut facilement s'expliquer par leur faible réponse Th1 et leur forte réponse Th2. En accord avec cette hypothèse, iNOS est présent en moins grande quantité dans les ganglions lymphatiques et les lésions des souris BALB/c que dans ceux des souris résistantes [20]. De plus, la neutralisation du TGF- β chez les souris BALB/c conduit à une restauration de l'expression de iNOS et à la guérison des lésions [39], un résultat

qui suggère que cette cytokine joue un rôle déterminant dans l'inhibition de l'activité leishmanicide *in vivo*. En accord avec le caractère multigénique de la sensibilité des souris BALB/c aux leishmanies, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages de ces souris présentent des particularités qui les distinguent de ceux des autres souches. Ainsi, les polynucléaires neutrophiles des souris BALB/c détruisent moins efficacement les leishmanies que ceux des souris résistantes [1]. De plus, les macrophages des souris BALB/c produiraient des quantités particulièrement faibles d'IL-12, un résultat qui pourrait s'expliquer par les quantités différentes de GM-CSF et d'IL-3 produites en réponse à l'infection chez les souris BALB/c et chez les souris résistantes [40].

Des modèles expérimentaux plus physiologiques

Dans la très grande majorité des études effectuées sur la leishmaniose murine, des promastigotes de *L. major* sont cultivés *in vitro* et des nombres relativement importants (10^5 à 10^7) sont injectés avec des seringues dans le coussinet plantaire de souris de laboratoire. Malgré la quantité considérable d'informations que ces travaux ont permis d'obtenir, il est légitime de se poser la question de la signification biologique de ces résultats. En effet, les phlébotomes peuvent difficilement être assimilés à des seringues volantes. De plus, le nombre de promastigotes injectés à une souris par l'expérimentateur est généralement 1 000 à 10 000 fois supérieur à celui injecté par les phlébotomes. Pour l'ensemble de ces raisons, certains chercheurs ont essayé d'injecter à des souris des nombres faibles de promastigotes, soit seuls, soit en présence d'extraits de glandes salivaires de phlébotome. De manière encore plus physiologique, il a été possible de transmettre le parasite à des souris de laboratoire en les mettant en présence des phlébotomes infestés. L'étude de ces nouveaux modèles animaux devrait nous permettre de compléter nos connaissances dans le domaine de l'immunité anti-infectieuse et de découvrir des mécanismes de coopération cellu-

laire et moléculaire de plus en plus complexes.

Conclusions

L'étude de souris de laboratoire infectées expérimentalement par les leishmanies nous a permis de mieux comprendre comment le système immunitaire des mammifères pouvait contrôler, si ce n'est éliminer complètement, les micro-organismes pathogènes. Ces études ont en particulier permis de mettre en évidence le très grand degré de complexité de la réponse immunitaire chez les mammifères, et l'existence de phénomènes de coopération très étroits entre les nombreux types cellulaires qui participent à cette réponse. Les travaux effectués actuellement dans de nombreux laboratoires devraient permettre de préciser quelles molécules interviennent dans ces phénomènes de coopération, et éventuellement d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le développement de l'immunité protectrice ■

RÉFÉRENCES

1. Tacchini-Cottier F, Zweifel C, Belkaid Y, *et al*. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4⁺ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* 2000; 165: 2628-36.
2. Rosenthal LA, Sutterwala FS, Kehrl ME, Mosser DM. *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infect Immun* 1996; 64: 2206-15.
3. Zilberstein D, Shapira M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48: 449-70.
4. Turco SJ. Adversarial relationship between the *Leishmania* lipophosphoglycan and protein kinase C of host macrophages. *Parasite Immunol* 1999; 21: 597-600.
5. Belkaid Y, Butcher B, Sacks DL. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur J Immunol* 1998; 28: 1389-400.
6. Moll H, Langerhans cells transport *Leishmania major*. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation

to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* 1993; 23: 1595-601.

7. von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin-12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med* 1998; 188: 1547-52.

8. Malherbe L, Filippi C, Julia V, *et al*. Selective activation and expansion of high-affinity CD4⁺ T cells in resistant mice upon infection with *Leishmania major*. *Immunity* 2000; 13: 771-82.

9. Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 151-77.

10. Lanzavecchia A, Sallusto F. From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 92-8.

11. Corry DB SL, Reiner SL, Linsley PS, Locksley RM. Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 1994; 153: 4142-8.

12. Akiba H, Miyahira Y, Atsuta M, *et al*. Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis. *J Exp Med* 2000; 191: 375-80.

13. Campbell KA, Owendale PJ, Kennedy MK, Fanslow WC, Reed SG, Maliszewski CR. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. *Immunity* 1996; 4: 283-9.

14. Sypek JP, Chung CL, Mayor SE, *et al*. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin-12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med* 1993; 177: 1797-802.

15. Scharton TM, Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J Exp Med* 1993; 178: 567-77.

16. Robinson D, Shibuya K, Mui A, *et al*. IGF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for IFN- γ production and activates IRAK and NF κ B. *Immunity* 1997; 7: 571-81.

17. Wei XQ, Leung BP, Niedbala W, *et al*. Altered immune responses and susceptibility to *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* infection in IL-18-deficient mice. *J Immunol* 1999; 163: 2821-8.

18. Conceicao-Silva F, Hahne M, Schroter M, Louis J, Tschoop J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. *Eur J Immunol* 1998; 28: 237-45.

19. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 2000; 173: 17-26.

RÉFÉRENCES

20. Stenger S, Thuring H, Rollinghoff M, Bogdan C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med* 1994; 180: 783-93.
21. Wei XQ, Charles IG, Smith A, et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 375: 408-11.
22. Aebischer T, Moody SF, Handman E. Persistence of virulent *Leishmania major* in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host. *Infect Immun* 1993; 61: 220-6.
23. Bogdan C, Donhauser N, Doring R, Rollinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med* 2000; 191: 2121-30.
24. Park AY, Hondowicz BD, Scott P. IL-12 Is Required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. *J Immunol* 2000; 165: 896-902.
25. Roberts LJ, Baldwin TM, Curtis JM, Handman E, Foote SJ. Resistance to *Leishmania major* is linked to the H2 region on chromosome 17 and to chromosome 9. *J Exp Med* 1997; 185: 1705-10.
26. Beebe AM, Mauze S, Schork NJ, Coffman RL. Serial backcross mapping of multiple loci associated with resistance to *Leishmania major* in mice. *Immunity* 1997; 6: 551-7.
27. Shankar AH, Titus EG. T cell and non-T cell compartments can independently determine resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med* 1995; 181: 845-55.
28. Scharton-Kersten T, Afonso LC, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 1995; 154: 5320-30.
29. Vester B, Muller K, Solbach W, Laskay T. Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. *Infect Immun* 1999; 67: 3155-9.
30. Laskay T, Diefenbach A, Rollinghoff M, Solbach W. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2220-7.
31. Launois P, Maillard I, Pingel S, et al. IL-4 rapidly produced by V β 4 V α 8 CD4⁺ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity* 1997; 6: 541-9.
32. Julia V, Rassoulzadegan M, Glaichenhaus N. Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science* 1996; 274: 421-3.
33. Julia V, McSorley SS, Malherbe L, et al. Priming by microbial antigens from the intestinal flora determines the ability of CD4⁺ T cells to rapidly secrete IL-4 in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* 2000; 165: 5637-45.
34. Bix M, Wang ZE, Thiel B, Schork NJ, Locksley RM. Genetic regulation of commitment to interleukin-4 production by a CD4⁺ T cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med* 1998; 188: 2289-99.
35. Himmelrich H, Launois P, Maillard I, et al. In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. *J Immunol* 2000; 164: 4819-25.
36. Guler ML, Jacobson NG, Gubler U, Murphy KM. T cell genetic background determines maintenance of IL-12 signaling: effects on BALB/c and B10.D2 T helper cell type 1 phenotype development. *J Immunol* 1997; 159: 1767-74.
37. Guler ML, Gorham JD, Dietrich WF, et al. *Tpml*, a locus controlling IL-12 responsiveness, acts by a cell-autonomous mechanism. *J Immunol* 1999; 162: 1339-47.
38. Vouldoukis I, Becherel PA, Riveros-Moreno V, et al. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur J Immunol* 1997; 27: 860-5.
39. Li J, Hunter CA, Farrell JP. Anti-TGF- β treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing *in vivo* nitric oxide production. *J Immunol* 1999; 162: 974-9.
40. Doherty TM, Coffman RL. Ability of macrophage subsets to transfer resistance to murine leishmaniasis is dependent on IL-12 production. *Eur J Immunol* 1999; 29: 522-9.

Summary

Immunity against *Leishmania*

Inbred strains of mice infected with *Leishmania major* have provided a very useful system to understand how the immune system can mount a protective T cell response and eventually control the growth of an intracellular parasite. More specifically, studies aimed at elucidating the molecular basis of immunity to *L. major* have exemplified the complexity of the interactions between the different cell subsets which constitute the immune system. Current studies using mice which are either susceptible or resistant to this parasite should pave the way for the identification of new genes which are critical for the development of an anti-parasite protective T cell response.

TIRÉS À PART

N. Glaichenhaus.

11^e Forum PEAU HUMAINE ET SOCIÉTÉ

Lyon, mercredi 5 juin 2002

organisé par Daniel Schmitt et Valéry Noly

- La dermatologie en France avant les dermatologues (J. Chevallier, Vaulx-en-Velin)
- Piercing, une mode, une décoration ou une décorporation (dé-corps-portion) ? (C. Grogard, Paris)
 - La peau dissociée du temps dans la société moderne (G. Guillet, Brest)
 - Cosmétique et qualité de la vie (J.-L. Levêque, Paris)
 - La peau comme une page d'écriture (A. Besse, Mantes-la-Jolie)
 - L'éthique de la peau (D. Folscheid, Paris)
 - Histoire de la dermatologie lyonnaise (A. Claudy, Lyon)

Pour les modalités d'inscription contacter : (les places sont limitées)

Madame Valérie Noly, Hôpital Édouard-Herriot, Dermatologie, Pavillon R, 69437 Lyon Cedex 03, France.
Tél. : 04.72.11.02.92 - Fax : 04.72.11.02.90