
EFFETS IMMUNO-MODULATEURS DES VECTEURS D'EXPRESSIONS EUCARYOTES DE L'IL-12 ET DU GM-CSF EN ASSOCIATION AVEC LA VACCINATION A BASE D'ADN CONTRE LA LEISHMANIOSE CUTANEE EXPERIMENTALE CHEZ LA SOURIS BALB/C

S. BEN HADJ AHMED¹, K. DELLAGI¹ & C. BAHLOUL^{1*}

¹ *Laboratory of Immunology, Vaccinology and Molecular Genetics, Institut Pasteur de Tunis, 13, Place Pasteur BP-74, 1002 Tunis-Belvedere, Tunisia.*

* *Auteur correspondant: Tél: (+216) 71 843755; Fax: 71 791833; E-mail : cbokri.babloul@pasteur.rns.tn*

RESUME

*Différents travaux de vaccination à base d'ADN contre les leishmanioses témoignent de la complexité des réponses immunitaires pour lutter contre ce parasite. Dans le cadre de ce travail, nous avons tenté d'explorer les propriétés de l'IL-12 et du GM-CSF, qui sont capables d'activer les médiateurs et effecteurs cellulaires des réponses immunitaires et d'induire préférentiellement une réponse de type Th1 productrice d'IFN- γ , plus apte à lutter contre les infections parasitaires. En s'appuyant sur ces activités immuno-modulatrices, nous avons associé des vecteurs d'expressions eucaryotes qui codent pour l'IL-12 et le GM-CSF murins à la vaccination à base d'ADN avec plusieurs candidats antigènes de *L. (L.)* major. Ces travaux sont réalisés contre la leishmaniose cutanée expérimentale chez la souris BALB/c afin d'améliorer les niveaux de protections engendrés par la vaccination à base d'ADN. Il en ressort, qu'avec des challenges avec des fortes charges parasitaires au niveau du coussinet plantaire aucun effet protecteur supplémentaire n'a pu être engendré. Cependant, quand le challenge est effectué au niveau de l'oreille avec une faible charge parasitaire, l'association de plasmides qui codent pour des cytokines aux candidats vaccins à base d'ADN, a amélioré les niveaux de protections engendrés.*

Mots clés: *Immuno-modulation, IL-12, GM-CSF, vaccin ADN, leishmaniose.*

ABSTRACT

*Different works of DNA based vaccination against leishmaniasis highlight the complexity of the induced immune responses to fight against the disease. In this work, we exploited the capacity of IL-12 and GM-CSF to activate immune cell mediators and effectors to induce a Th1 response, more capable of clearing the parasite. To generate these immuno-modulating activities, we associated eukaryotic expressing vectors of murine IL-12 and GM-CSF to several DNA based vaccine candidates encoding to several *L. (L.)* major antigens, in the BALB/c mouse. When mice were challenged with a high parasitic load in the hind footpad, no additional protective effect could be generated. However, when the challenge was carried out in the inner face of the ear with a small parasitic load, the association of plasmids encoding to IL-12 and GM-CSF to DNA based vaccination, the protective effects were increased.*

Key words: *Immuno-modulation, IL-12, GM-CSF, DNA Vannine, leishmaniasis.*

INTRODUCTION

Les leishmanioses représentent un ensemble de parasitoses causées par des protozoaires flagellés du genre *Leishmania*. En plus de leur vaste distribution géographique, elles sont caractérisées par un spectre clinique très large allant des formes cutanées bénignes auto-résolutives jusqu'aux atteintes viscérales, mortelles en absence de traitement. Sur le plan épidémiologique, la situation des leishmanioses est caractérisée par l'émergence de nouvelles souches parasitaires de plus en plus virulentes¹. En plus, avec l'avènement du VIH, la forme viscérale a gagné du terrain dans le sud de l'Europe en se comportant comme une maladie opportuniste chez les patients immuno-déprimés¹. Ces maladies, largement répandues dans le monde (plus de 300 millions de personnes à risque à travers le monde), constituent un problème important^{2, 3}. Malgré les nombreux travaux qui ont été entrepris, les leishmanioses n'ont pas joui d'un progrès thérapeutique notable. En effet, le traitement de la maladie reste toujours fondé sur des produits chimiques relativement toxiques, d'un coût de revient très élevé et inaccessible à bon nombre de pays en voie de développement. De même, les stratégies de contrôle contre les vecteurs et les réservoirs des leishmanies sont très difficiles à appliquer en raison de la grande diversité des foyers d'infections. Par conséquent, la mise au point d'un vaccin efficace contre ce fléau peut réduire son impact. Différentes tentatives de vaccination basées sur des parasites atténués ou tués, ou sur des extraits parasitaires sous forme d'antigènes sous-unitaires ont été testés⁴. Cependant, aucun vaccin dont l'efficacité soit prouvée pour la prévention des leishmanioses chez les humains ou les animaux n'a vu le jour.

Ces dernières années, la vaccination à base d'ADN a connu des progrès notables et elle a ciblé des champs d'application très diversifiés. Contrairement aux vaccins tués, atténués ou ceux sous-unitaires natifs ou recombinants, cette technologie est beaucoup plus efficace et peu coûteuse. En plus, elle contribue à l'amélioration de l'éventail, de la qualité et de la durée des réponses immunitaires⁵. En effet, en plus de l'induction des réponses humorale et cellulaire de type Th (« T helper »), avec le vaccin à base d'ADN il y a stimulation des cellules T CD8 et leur différenciation en Tc (T cytotoxiques), à la différence des vaccins inactivés et sous-unitaires⁶. Par ailleurs, il a été démontré, dans de nombreux modèles infectieux, que la vaccination à base d'ADN induit des réponses

immunitaires plus persistantes dans le temps comparativement à la vaccination classique^{7, 8}. Une réponse Th puissante et une expression continue de l'antigène à l'intérieur de l'organisme stimulent et prolongent les réponses immunitaires. Contre les leishmanioses la vaccination à base d'ADN est encore à son stade expérimental. Dans le modèle murin de la leishmaniose cutanée, la liste des candidats vaccins ADN ne cesse de s'allonger, incluant les antigènes gp63^{9, 10, 11}, LACK^{12, 13, 14, 15, 16}, PSA2¹⁷, LmSTII¹⁸, TSA¹⁸ cysteine protéinases¹⁹, LiPO (« Acidic Protein Ribosomal P0 »)²⁰, P4 nuclease²¹, *Leishmania* meta antigen²², ORFF²³, LeIF²⁴, Signal Peptidase type I²⁵ et autres avec des succès variables et parfois des résultats controversés^{4, 26, 27}.

Pour renforcer les réponses immunitaires induites par les différents vaccins à base d'ADN^{28, 29, 30}, la co-administration de plasmides qui codent pour des cytokines, des chimiokines ou des molécules de co-stimulation ont permis d'améliorer la nature, la qualité et la durée des réponses immunitaires. Dans le cadre des leishmanioses, le pouvoir immuno-modulateur de l'IL-12 dans le développement d'une réponse Th1 a été largement documenté. Le traitement par l'IL-12 de souris de lignées susceptibles, réduit considérablement la production de l'IL-4, augmente la production de l'IFN- γ et guérit l'infection leishmanienne³¹. L'IL-12 n'exerce cet effet protecteur que si elle est administrée 48h avant l'infection³².

Réciproquement, l'injection d'un anticorps anti-IL-12 ou la délétion de l'IL-12 à des souris résistantes inhibe la réponse protectrice Th1 et développe une réponse Th2 aboutissant à l'aggravation de l'infection. Des travaux récents ont démontré que la vaccination à base d'ADN peut être améliorée par l'adjonction de l'IL-12 (sous une forme recombinante^{33, 34} ou plasmidique^{14, 28}). Des souris BALB/c recevant le virus de la vaccine recombinant exprimant l'IL-12 développent une réponse de type Th1, générant une protection partielle contre l'infection leishmanienne³⁵. La co-administration, par voie intradermique, d'un vecteur d'expression eucaryote codant pour l'IL-12 aux antigènes leishmaniens solubles (SLA) à des souris BALB/c génère un effet protecteur à un challenge parasitaire, qui n'est pas observé chez les souris administrées soit le plasmide vide associé au SLA soit le plasmide codant pour l'IL-12 seul³⁶.

Cet effet adjuvant de l'IL-12 a été prouvé également en association avec les antigènes LACK¹⁶, LmSTII³⁷ et TSA³⁷. D'un autre côté, Gurunathan *et al.*¹⁴ ont démontré que l'antigène LACK sous sa forme recom-

binante associé à l'IL-12 recombinante induit le même effet protecteur que celui généré par le vaccin ADN exprimant le même candidat. L'immunisation de souris BALB/c par des plasmides qui codent pour LACK p36, IL-12 et IL-18 et après un rappel avec le virus de la vaccine recombinant exprimant LACKp36, était capable d'engendrer une bonne protection contre l'infection leishmanienne³⁸. Dans d'autres travaux, l'effet adjuvant de l'IL-12 est plutôt négligeable. En effet, l'adjonction de l'IL-12 au PSA2 en tant que vaccin à base d'ADN, a ôté tout effet protecteur apporté par la PSA2 ou l'IL-12 seuls³⁹. De même, dans le modèle canin, la vaccination avec une préparation contenant les cystéines peptidases et l'IL-12 recombinant n'a pu protéger les chiens contre un challenge parasite avec *Leishmania (L.) infantum*⁴⁰.

Le GM-CSF qui est capable d'attirer un afflux de cellules dendritiques au niveau du site d'inoculation, favorise le développement d'une réponse Th1. Différentes approches vaccinales contre le VIH^{41,42} et les leishmanioses⁴³, ont démontré l'efficacité du GM-CSF en tant qu'immuno-modulateur.

Dans le cadre de ce travail nous avons exploité l'approche de vaccination à base d'ADN contre la leishmaniose cutanée expérimentale chez la souris BALB/c avec plusieurs candidats antigènes en association avec des vecteurs d'expressions eucaryotes qui codent pour l'IL-12 et le GM-CSF murins. Ces associations visent d'éventuels effets adjuvants des différentes cytokines testées afin d'améliorer les niveaux de protections engendrés par la vaccination à base d'ADN.

MATERIEL ET METHODES

Souche parasitaire

Nous avons utilisé la souche GLC94 (MOHM/TN/95/GLC94, zymodeme Mon-25) de *Leishmania (Leishmania) major*. Cette souche a été isolée chez un patient tunisien, atteint d'une leishmaniose cutanée zoonotique et qui est originaire de la région d'El-Ktar. L'étude de virulence de cette souche, réalisée à l'Institut Pasteur de Tunis⁴⁴, montre qu'elle fait partie des souches les plus virulentes en Tunisie. Cette souche est maintenue par passages successifs sur les coussinets plantaires des souris BALB/c.

Constructions plasmidiques

Différents candidats vaccins à base d'ADN ont été construits. Ces candidats codent pour les antigènes suivants: LACK, PSA2, Gp63, Ribosomal S4, LeIF, TSA, LmSTI1 et CPa^{45,46}. Par ailleurs, nous avons

utilisé les deux constructions plasmidiques pUMVC1-mGM-CSF et pUMVC1-mIL12 (Aldevron, Street South- fargo, ND) qui codent respectivement pour l'IL-12 (les deux sous unités p35 et p40) et le GM-CSF et qui sont déjà rapportés en tant qu'immuno-modulateurs pour la vaccination à base d'ADN^{47,48}. Ces deux plasmides sont des vecteurs d'expression eucaryotes sous le contrôle du Promoteur/ "Enhancer" CMVie (Cytomégalo virus «Immédiat Early»).

Production et purification de plasmides

Pour la production et la purification des différents plasmides, des Kits Qiagen (Qiagen GmbH, Allemagne) ont été utilisés, en suivant exactement le protocole recommandé par le fournisseur.

Animaux d'expérimentation

Des souris de lignée BALB/c de sexe féminin, âgées de 5 à 8 semaines, ont été utilisées. Ces souris sont fournies par IFFA CREDO et élevées dans l'animalerie de l'Institut Pasteur de Tunis.

Anesthésie des souris

Chaque souris est administrée en intra-péritonéale 200µl de sérum physiologique contenant 1,8mg de pentobarbital sodique.

Protocole vaccinal

Après anesthésie au pentobarbital sodique, chaque souris reçoit la dose appropriée du ou des plasmides solubilisés dans 100µl du tampon PBS. Le plasmide est administré par la voie intramusculaire au niveau des muscles tibiaux antérieurs, à raison de 50µl au niveau de chacun des deux muscles. Les souris qui reçoivent les cocktails composés des différents candidats vaccin à base d'ADN, à raison de 50µg de chaque plasmide, sont groupées de la façon suivante: Cocktail 1 (pCMV3ISS-LACKp24 et pCMV3ISS-TSA); Cocktail 2 (pCMV3ISS-LACKp24, pCMV3ISS-TSA et pCMV3ISS-LmSTI1); Cocktail 3 (pCMV3ISS-LACKp24, pCMV3ISS-TSA et pCMV3ISS-CPa); Cocktail 4 (pCMV3ISS-LACKp24, pCMV3ISS-TSA, pCMV3ISS-CPa et pCMV3ISS-LmSTI1). Pour le Cocktail 5 (pCMV3ISS-LACKp24, pCMV3ISS-TSA, pCMV3ISS-CPa, pCMV3ISS-LmSTI1, pCMV3ISS-Ribosomale S4, pCMV3ISS-LeIF, pCMV3ISS-PSA2 et pCMV3ISS-Gp63), il est composé de 10µg de chaque plasmide. Les souris des groupes contrôles non vaccinés sont administrées soit le plasmide vide (pCMV3ISS 50µg)

soit du PBS. Chaque groupe est composé de 10 souris. Deux semaines après la vaccination, les souris sont challengées avec une charge parasitaire de 5×10^5 promastigotes de *L. major* au niveau du coussinet plantaire. Le suivi de l'effet de la vaccination sur l'évolution clinique de l'infection parasitaire est effectué par des mesures de l'évolution de la taille de lésion de la patte infectée comparativement à la patte collatérale non infectée. Quand le challenge est effectué selon la voie intradermique au niveau de l'oreille droite de la souris, 500 promastigotes métacycliques sont administrées deux semaines après le démarrage du même protocole vaccinal. Les souris sont observées chaque semaine pour déceler la présence d'une lésion spécifique au niveau de l'oreille infectée.

Challenge parasitaire des souris

Pour la préparation de l'inoculum d'amastigotes, les pattes des souris BALB/c infectées sont préalablement désinfectées à l'éthanol 70%, lavées avec du RPMI contenant 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 2 mM de glutamine (RPMI-PS/Glu), puis broyées dans un tamis stérile, tout en ajoutant du RPMI. Afin de pouvoir éliminer les débris tissulaires, le broyat est récupéré et centrifugé à 700 rpm pendant 10 mn à +4°C. Le surnageant est placé dans un broyeur (« Dounce ») de 25 ml pour éclater les macrophages et libérer les amastigotes des vésicules parasitophores. Les amastigotes sont récupérées par centrifugation pendant 10 min à 3000 rpm à 4°C. Elles sont resuspendues dans 30 ml de RPMI et centrifugées (3000 rpm/4°C/10 min) et la même opération est répétée une deuxième fois. En fin, les amastigotes sont resuspendues dans 10 ml de RPMI-PS/Glu et énumérées sur cellule de Malassez. Pour préparer des promastigotes nous avons adopté la technique de culture sur milieu RPMI.

Pour cela il faut ajouter au milieu RPMI du Pénicilline (100 U/ml), Streptomycine (100 µg/ml), Amphotéricine B (0,25 µg/ml), Glutamine (2 mM) et 10 à 20 % de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (par chauffage à 56°C pendant 30 min). Ensemencer 1 ml de ce milieu avec 0,1 ml de surnageant de la culture de promastigotes sur sérum de lapin coagulé et incubé à 22°C. Au fur et à mesure que les promastigotes se multiplient, il faut rajouter du RPMI (10% SVF) pour augmenter le volume de la culture. Au cinquième jour après le dernier rajout de RPMI, les promastigotes atteignent la phase stationnaire de croissance et deviennent métacycliques

(forme infectante du parasite). Collecter les promastigotes métacycliques par centrifugation (3000 rpm/15 mn/4°C) et compter sur cellule de Malassez. Elles peuvent être soit directement injectées à des souris, soit congelées en présence de 30% SVF et 15% DMSO dans du RPMI à -80°C ou dans l'azote liquide pour une utilisation ultérieure.

La concentration appropriée (5×10^5) d'amastigotes ou des promastigotes est injectée dans un volume de 50 µl, au niveau du coussinet plantaire d'une des pattes postérieures de la souris BALB/c. Le développement de la lésion spécifique au niveau du coussinet plantaire est suivi chaque semaine par la mesure de son enflure par le biais d'un pied à coulisse. Le diamètre de la lésion correspond à la différence de taille entre la patte infectée et la patte collatérale non infectée et les valeurs correspondent à la moyenne représentative des souris de chaque groupe. La lésion se manifeste par une augmentation de l'enflure de la patte. Par la suite la nécrose s'installe et les souris perdent leurs pattes malades. Pour le challenge avec des faibles charges parasitaires, la souris est injectée en intradermique au niveau de l'oreille droite, 10 µl de RPMI contenant 500 promastigotes ou amastigotes de *L. (L.) major*. Chaque semaine, les souris sont observées pour déceler une éventuelle présence de lésions spécifiques au niveau des oreilles infectées. La lésion apparaît sous forme d'un point de nécrose qui diffuse ensuite sur toute la surface de l'oreille entraînant sa perforation. Les résultats représentent les cinétiques d'évolution des pourcentages de souris qui développent des lésions spécifiques.

Analyses statistiques

Pour la comparaison de la représentativité statistique des différences entre deux proportions ou deux moyennes avec un intervalle de confiance de 95%, la valeur t du test de "student" et la "p-value" ont été calculés en utilisant le logiciel "EpiCalc 2000, version 1.02".

RESULTATS

Rôle adjuvant des cytokines à la vaccination à base d'ADN suite à des challenges avec fortes charges parasitaires

Dans nos travaux antérieurs, nous avons démontré que les plasmides qui codent pour LACKp24, TSA, LmSTI1 et CPa⁴⁵ sont les meilleurs candidats vaccins à base d'ADN et que leur association chez la souris

BALB/c est capable d'engendrer des niveaux de protections très satisfaisants, sans pour autant qu'elle soit stérilisante ⁴⁶. Pour optimiser davantage la protection conférée par la vaccination à base d'ADN, nous avons utilisé des plasmides qui codent pour les cytokines IL-12 ou GM-CSF en tant qu'immuno-modulateurs. Dans un premier temps, nous avons administré à des souris BALB/c plusieurs combinaisons de plasmides qui codent pour l'IL-12 ou pour la GM-CSF. Deux semaines plus tard, nous les avons challengées avec 5×10^5 promastigotes au niveau du coussinet plantaire.

Conformément à la figure 1, les groupes de souris qui ont reçu un plasmide qui code pour l'IL-12 ou le GM-CSF, en une ou deux injections, dont la deuxième est juste avant le challenge parasitaire, présentent des cinétiques d'évolution clinique des lésions au niveau des pattes infectées comparables à celle observé chez le groupe contrôle ayant reçu le plasmide vide pCMV3ISS. L'administration simultanée de l'IL-12 et du GM-CSF, en une seule injection à deux semaines avant le challenge, ou avec un rappel identique juste avant le challenge parasitaire, a engendré des résultats différents. Alors qu'une seule injection a engendrait une évolution clinique semblable à celle du groupe témoin inoculé, le plasmide vide, l'injection de rappel était capable d'induire un effet protecteur significatif par rapport à tous les autres groupes. En effet, leurs lésions progressent lentement pour atteindre un maximum de 2,3 mm à la 8^{ème} semaine après le challenge, comparativement à 3,9 mm chez les souris du groupe administré le plasmide vide (p-value 0,011537). Par conséquent, l'immuno-modulation des réponses immunitaires, induites avec des plasmides qui codent aussi bien pour l'IL-12 que le GM-CSF, se confondent avec celles induites par les séquences ISS (« Immuno Stimulating Sequences ») issues du squelette du plasmide et sont donc insignifiantes. Cependant, il ne faut pas utiliser les plasmides qui codent pour les deux cytokines à la fois en plusieurs fois pour adjuver des préparations vaccinales, au risque d'interférer les effets des réponses immunitaires spécifiques avec les effets protecteurs issus de l'immuno-modulation.

Dans un deuxième temps, nous avons testé l'association des effets immuno-modulateurs des cytokines à la vaccination à base d'ADN. Ainsi, des souris BALB/c ont été immunisées par des combinaisons de plasmides qui codent pour LACKp24, TSA, IL12 et GM-CSF. Deux semaines après la vaccination, les

souris sont challengées avec une charge parasitaire de 5×10^5 promastigotes de *Leishmania (Leishmania) major* au niveau du coussinet plantaire.

Conformément à la figure 2, les souris vaccinées par

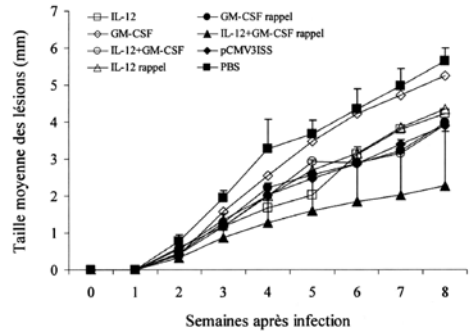


Figure 1. Cinétique des lésions chez des souris BALB/c administrées des plasmides qui codent pour différentes cytokines. Dix souris par groupe sont immunisées avec 50µg de plasmides qui codent pour IL-12, ou GM-CSF, ou IL-12 et GM-CSF en une seule injection ou en deux injections à deux semaines d'intervalle, dont la deuxième injection le jour même du challenge parasitaire. Les souris contrôles ont reçu soit le plasmide vide (pCMV3ISS) soit du PBS. Deux semaines plus tard, les souris sont challengées avec 5×10^5 promastigotes de *L. (L.) major* au niveau du coussinet plantaire de la patte droite. Les tailles des lésions sont mesurées chaque semaine pour la détermination des moyennes représentatives des souris de chaque groupe.

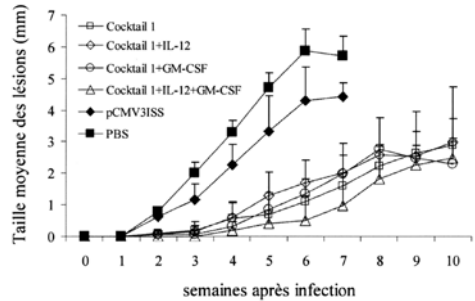


Figure 2. Cinétique des lésions chez des souris BALB/c immunisées avec des plasmides qui codent pour différentes cytokines en association avec différents cocktails de vaccins candidats à base d'ADN. Dix souris par groupe sont inoculées l'une des préparations suivantes : Cocktail 1 (pCMV3ISS-LACKp24 et pCMV3ISS-TSA), Cocktail 1 et pUMVC1-mIL12, Cocktail 1 et pUMVC1-mGM-CSF, Cocktail 1, pUMVC1-mGM-CSF et pUMVC1-mIL12, à raison de 50µg de chaque plasmide. Les souris des groupes contrôles non vaccinés sont immunisées soit avec le plasmide vide (pCMV3ISS) soit du PBS. Deux semaines plus tard, les souris sont challengées avec 5×10^5 promastigotes de *L. major* au niveau du coussinet plantaire de la patte droite. Les tailles des lésions sont mesurées chaque semaine pour la détermination des moyennes représentatives des souris de chaque groupe.

l'association qui code pour LACKp24 et TSA, en plus de l'IL-12, ou du GM-CSF, ou des deux cytokines à la fois, présentent un ralentissement de l'évolution des lésions comparativement aux groupes contrôles non vaccinés (PBS et pCMV3ISS). En effet, les lésions apparaissent tardivement à la troisième semaine pour toutes les souris qui ont reçu au moins les plasmides qui codent pour LACKp24 et TSA sans pour autant dépasser le 1,6 mm de diamètre à la 7^{ème} semaine après le challenge, comparativement à plus de 4,44 mm pour les souris administrées le plasmide vide (p-value 0,000002). Néanmoins, la moyenne des tailles des lésions observées chez le groupe immunisé par l'association codant pour LACKp24, TSA, IL-12 et GM-CSF est inférieure à 0,5 mm pendant les 7 semaines après challenge, mais la différence n'est pas statistiquement significative ($p=0,43887$) par rapport aux autres groupes vaccinés.

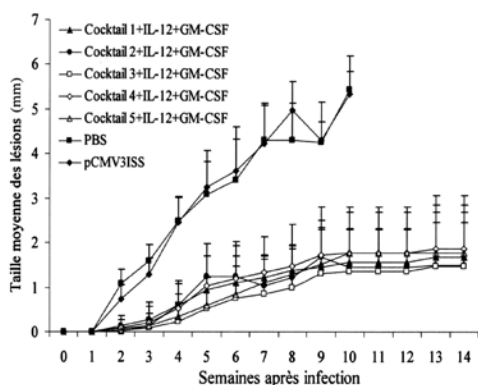


Figure 3. Cinétique des lésions chez des souris BALB/c immunisées avec des plasmides qui codent pour différentes cytokines en association avec différents cocktails de candidats vaccins à base d'ADN. Dix souris par groupe sont vaccinées en présence de pUMVC1-mGM-CSF et pUMVC1-mIL12 par les préparations suivantes, Cocktail 1, Cocktail 2 (pCMV3ISS-LACKp24, pCMV3ISS-TSA et pCMV3ISS-CPa), Cocktail 3 (pCMV3ISS-LACKp24, pCMV3ISS-TSA et pCMV3ISS-LmSTI1), Cocktail 4 (pCMV3ISS-LACKp24, pCMV3ISS-TSA, pCMV3ISS-CPa et pCMV3ISS-LmSTI1), à raison de 50µg de chaque plasmide sauf pour le dernier groupe qui a reçu le Cocktail 5 (pCMV3ISS-LACKp24, pCMV3ISS-TSA, pCMV3ISS-CPa, pCMV3ISS-LmSTI1, pCMV3ISS-Ribosomale S4, pCMV3ISS-LeIF, pCMV3ISS-PSA2 et pCMV3ISS-Gp63) à raison de 10µg par plasmide. Les souris des groupes contrôles non vaccinés ont reçu soit le plasmide vide (pCMV3ISS) soit du PBS. Deux semaines plus tard, les souris sont challengées avec 5×10^5 promastigotes de *L. major* au niveau du coussinet plantaire de la patte droite. Les tailles des lésions sont mesurées chaque semaine pour la détermination des moyennes représentatives des souris de chaque groupe.

Par conséquent l'effet immuno-modulateur des plasmides qui codent pour les cytokines IL-12 et GM-CSF, semble être marginal quand il est combiné avec ceux qui codent pour LACKp24 et TSA.

Nous avons suivi les effets immuno-modulateurs des plasmides qui codent pour l'IL-12 et le GM-CSF suite à leurs associations avec le Cocktail 4, qui code pour LACKp24, TSA, LmSTI1 et CPa, ou au Cocktail 5, ou au cocktail 2, ou bien au cocktail 3. Après le challenge parasitaire et conformément à la figure 3, aussi bien les souris vaccinées avec le Cocktail 4, seul ou associés avec les plasmides qui codent pour l'IL-12 et le GM-CSF, que celles des autres cocktails en association avec les deux cytokines, ont présenté des lésions qui apparaissent tardivement à la quatrième semaine après le challenge parasitaire, pour n'atteindre que 2mm de diamètre à la fin de la période de suivi (12 semaines). Comparativement, les lésions des groupes contrôles non vaccinés (PBS et pCMV3ISS) ont atteint des pics de lésions supérieurs à 4,98 mm de diamètre dès la huitième semaine après le challenge avec de la nécrose et l'amputation des pattes infectées ($p=0,00000$). Nous pouvons donc conclure que la co-administration des deux cytokines (IL-12 et GM-CSF) aux différentes associations de vaccins ADN n'a pu engendrer aucun effet protecteur supplémentaire consécutivement à des challenges avec des fortes charges parasitaires.

Effet de l'association des cytokines à la vaccination à base d'ADN suite à des challenges avec des faibles charges parasitaires

Dans les conditions naturelles les psychodidés, vecteurs des leishmanioses, injectent au cours de leurs repas sanguins dans le derme de l'hôte vertébré entre 10 et 100 promastigotes métacycliques, mais le nombre de piqûres peut être élevé. Dans nos précédents protocoles d'évaluation de l'efficacité de la vaccination à base d'ADN contre la leishmaniose cutanée expérimentale dans le modèle murin BALB/c, le challenge parasitaire est effectué par des charges très élevées (5×10^5 promastigotes métacycliques). Pour que les challenges se rapprochent des infections dans les conditions naturelles, nous avons essayé d'adopter un modèle d'infection expérimentale avec des faibles charges parasitaires. Ainsi, nous avons vacciné plusieurs groupes de souris avec le Cocktail 1 tout seul, ou en association avec le plasmide qui code pour l'IL-12 ou pour le GM-CSF ou les deux plasmides à la fois, comparativement aux

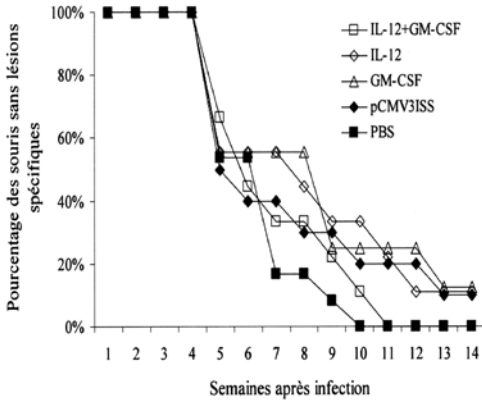


Figure 4. Effets des vecteurs d'expression eucaryotes de l'IL-12 et du GM-CSF lors du challenge avec des faibles charges parasitaires. Dix souris par groupe (pUMVC1-mGM-CSF, pUMVC1-mIL12, association pUMVC1-mGM-CSF et pUMVC1-mIL12, pCMV3ISS et PBS) sont immunisées avec 50 µg de chaque plasmide. Deux semaines plus tard, les souris sont challengées avec 500 promastigotes de *L. (L.) major* au niveau du derme de l'oreille droite. Les résultats représentent les cinétiques des pourcentages de souris qui ne développent pas des lésions spécifiques.

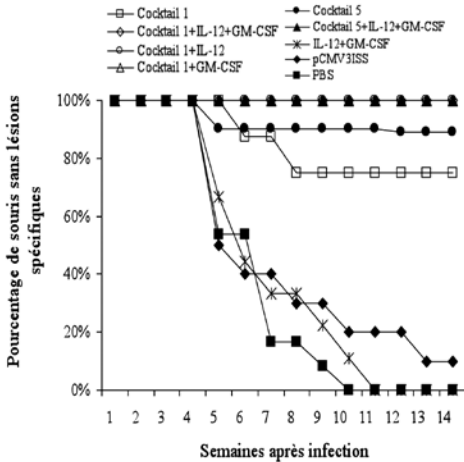


Figure 5. Effets protecteurs de l'association des vecteurs d'expression eucaryotes de l'IL-12 et du GM-CSF à la vaccination à base d'ADN après challenges avec des faibles charges parasitaires. Dix souris par groupe (Cocktail 1, Cocktail 5) avec ou sans pUMVC1-mGM-CSF ou pUMVC1-mIL12 ou les deux à la fois, sont administrées 50 µg de chaque plasmide pour le Cocktail 1 et 10 µg de chaque plasmide pour le Cocktail 5. Deux semaines plus tard, les souris sont challengées avec 500 promastigotes de *L. (L.) major* au niveau du derme de l'oreille droite. Les résultats représentent les cinétiques des pourcentages de souris qui ne développent pas des lésions spécifiques.

différents groupes témoins (PBS, pCMV3ISS, pUMVC1-mGM-CSF, pUMVC1-mIL12 et l'association pUMVC1-mGM-CSF avec pUMVC1-mIL12). Le challenge parasitaire est effectué deux semaines plus tard avec 500 promastigotes métacycliques au niveau du derme de l'oreille droite. Conformément à la figure 4, les souris qui ont reçu un plasmide qui code pour l'IL-12 ou pour le GM-CSF, suite à une ou deux injections, dont la deuxième est réalisée juste avant le challenge parasitaire, finissent par développer au niveau de leurs oreilles des lésions semblables à celles des groupes contrôles non vaccinés (PBS et pCMV3ISS, p -value 0,437181). Les lésions au niveau des oreilles apparaissent vers la cinquième semaine après le challenge parasitaire. A la quinzième semaine après le challenge, 90% des souris des différents groupes présentent des lésions spécifiques bien évidentes. De ce fait, l'effet immunomodulateur des cytokines, en absence des antigènes spécifiques, est insignifiant en terme de protection à des challenges parasitaires. Quand les souris sont vaccinées avec différents types d'associations de plasmides adjuvés à l'IL-12 ou au GM-CSF, elles contournent complètement l'infection leishmanienne (Figure 5). L'adjonction d'un plasmide qui code pour l'IL-12 ou le GM-CSF ou les deux à la fois, à l'association LACKp24 et TSA ou bien au Cocktail 5, permettent d'induire des protections totales (p -value 0,001041).

DISCUSSION

La lutte contre les leishmanioses est basée soit sur des interventions thérapeutiques, soit sur le contrôle des vecteurs et des gîtes du parasite. La mise au point d'un vaccin efficace semble être une mesure très avantageuse pour lutter contre cette maladie à travers le monde. Plusieurs approches pour la vaccination contre les leishmanioses sont encore au stade expérimental, avec des promesses controversées. Nos différents travaux sur la vaccination à base d'ADN contre la leishmaniose cutanée expérimentale reflètent d'une manière très claire la complexité de la réponse immunitaire antiparasitaire. En effet, la nature de l'antigène candidat; la souche parasitaire; la concentration de la dose de challenge; l'effet adjuvant; le nombre d'injections; et le modèle murin adopté sont des facteurs très importants qu'il faut prendre en considération pour induire des effets protecteurs. Dans le cadre de ce travail nous avons exploré les effets immuno-modulateurs de différen-

tes cytokines associées à la vaccination à base d'ADN codant pour différents antigènes leishmaniens.

La co-administration de l'IL-12 avec du SLA ("Soluble Leishmania Antigen") ou divers autres antigènes sous formes de vaccins à base d'ADN ou de protéines recombinantes, permet le développement de réponses immunitaires de type Th1 et confèrent des protections contre les infections leishmaniennes ^{16, 35, 37}. Dans un autre travail, l'adjonction de l'IL-12 au plasmide qui code pour la PSA2 a abrogé tout effet bénéfique apporté par la PSA2 ou l'IL-12 seuls ³⁴.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons essayé d'améliorer les réponses immunitaires engendrées avec les cocktails de vaccins à base d'ADN, par l'adjonction de plasmides qui codent pour les cytokines IL-12 et GM-CSF. Il s'est avéré que cette association n'a pas pu engendrer un effet protecteur supplémentaire quand le challenge est effectué avec des fortes charges parasitaires au niveau du coussinet plantaire. Cependant, avec des faibles charges parasitaires, nous sommes parvenus à induire des niveaux de protections totales. Néanmoins, il faut prendre en considération les recommandations de la FDA (« Food and Drug Administration ») et de l'OMS pour l'utilisation de la vaccination à base d'ADN chez l'homme qui exigent que les plasmides ne doivent pas avoir de fortes homologies de séquences avec le génome humain. Par conséquent, si des plasmides qui codent pour des cytokines spécifiques sont utilisés en tant qu'immuno-modulateurs, cette règle d'homologies de séquences ne serait pas respectée et cette alternative ne peut pas être exploitée en pratique. Cependant, le but d'utiliser des immuno-modulateurs chez la souris est d'évaluer leur apport dans la protection conférée et s'ils s'avèrent indispensables, différentes alternatives sont possibles pour profiter de leurs effets bénéfiques. Il est possible de recourir à des cytokines recombinantes en association avec les différents candidats vaccinaux, mais cette approche reste difficile à utiliser en raison du coût et de la grande fragilité des cytokines. Il est aussi possible d'utiliser des inducteurs de ces cytokines, tels que les CpG qui sont capables d'induire la production d'IL-12 et d' IFN- γ aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Nous avons déjà démontré que des challenges parasitaires avec uniquement 50 amastigotes au niveau des coussinets plantaires de la souris BALB/c étaient capables d'engendrer des lésions leishmaniennes spécifiques ⁴⁵. Malheureusement, nous n'avons pas

pu exploiter cette voie de challenge pour l'évaluation des effets protecteurs de la vaccination à base d'ADN en raison d'une grande variabilité individuelle dans l'installation des lésions. D'où l'intérêt du challenge au niveau du derme de l'oreille qui nous a permis d'induire des lésions spécifiques chez 100% des souris BALB/c challengées. En plus, dans le contexte d'une vaccination à base d'ADN, le contrôle des effets protecteurs après des challenges avec des faibles charges parasitaires au niveau des oreilles s'est avéré fort concluant. Cela est d'autant plus important que dans les conditions d'infections naturelles, les phlébotomes n'injectent qu'un petit nombre de leishmanies. Dans la littérature, des infections expérimentales avec des faibles charges parasitaires au niveau du derme des oreilles ont été rapportées à maintes reprises avec des succès indéniables. En association avec des extraits de glandes salivaires de phlébotomes, des faibles charges parasitaires provoquent des lésions conséquentes aussi bien chez la souris susceptible BALB/c que résistante C57Black/6⁴⁹. Dans un autre travail, des charges parasitaires de l'ordre de 1000 promastigotes métacycliques, en absence d'extraits de glandes salivaires de phlébotomes, étaient capables d'induire des lésions spécifiques chez la souris C57/Black6⁵⁰. Malheureusement, nous n'étions pas capables d'induire dans les mêmes conditions une infection expérimentale chez la souris C57/Black6 contrairement à la souris BALB/c qui nous a permis de mettre en évidence les effets protecteurs de nos différents candidats vaccins à base d'ADN et de leurs associations.

Parmi les autres facteurs qui peuvent influencer l'effet adjuvant des cytokines et par conséquent la polarisation de la réponse immune vers l'isotype Th1 ou Th2, nous pouvons citer le choix du moment de leurs administrations. Il a été rapporté que l'injection du GM-CSF ou de l'IL-12, trois jours avant l'administration du vaccin à base d'ADN contre le VIH permet le développement d'une réponse de type Th1. S'ils sont administrés trois jours après la vaccination, la réponse immune est orientée vers l'isotype Th2 ⁴¹. Dans nos travaux l'administration répétée d'un mélange de plasmides qui codent pour les cytokines IL-12 et GM-CSF en absence d'antigènes leishmaniens n'a engendré un effet protecteur qu'après challenge avec des fortes charges parasitaires. Nous pensons que pendant les challenges avec de fortes charges parasitaires et l'administration simultanée des plasmides qui codent pour des cyto-

kines, il peut y avoir une forte induction de réponses immunitaires non spécifiques qui peuvent donner un effet protecteur. Par contre, suite à un challenge avec des faibles charges parasitaires, l'infection est très silencieuse et ne suscite pas immédiatement la mise en place de réponses immunitaires. Ainsi l'apport des cytokines en réponses immunitaires non spécifiques ne va pas jouer un rôle dans la lutte contre l'infection. Par la suite, l'infection va s'installer progressivement en absence de toute interférence de l'effet immuno-modulateur. Dans un autre travail, il a été démontré que l'association de deux plasmides qui codent pour l'IL-12 et le GM-CSF à la vaccination à base d'ADN contre le VIH, est capable de conférer les niveaux de protections les plus élevés comparativement à l'association qui n'utilise qu'un seul plasmide qui code pour l'une ou l'autre des cytokines⁵¹.

En conclusion, la vaccination à base d'ADN contre la leishmaniose murine expérimentale n'est qu'une étape préliminaire qui pourrait nous apporter un éclairage concernant la possibilité d'établir un jour une formulation vaccinale efficace pour une utilisation clinique chez les gros mammifères voire chez l'homme. L'association aux candidats vaccins à base d'ADN de plasmides qui codent pour différentes cytokines peut être efficace mais indique aussi la complexité de la réponse immunitaire contre les leishmanioses.

REFERENCES

- 1- **R.D. Pearson and D.Q. Sousa** (1996). A Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.*, **22**(1), 1-13.
- 2- **P. Desjeux and J. Alvar** (2003). Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **97**, Suppl 1: 3-15.
- 3- **R. Molina, L. Gradoni and J. Alvar** (2003). HIV and the transmission of Leishmania. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **97**, Suppl 1: 29-45.
- 4- **E. Handman** (2001). Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.*, **14**(2), 229-243.
- 5- **S. Gurunathan, D.M. Klinman and R.A. Seder** (2000). DNA vaccine: Immunology, application, and optimization. *Annu. Rev. Immunol.*, **18**, 927-974.
- 6- **W. Kofta and H. Weerychowicz** (2001). c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. *Veter. parasitol.*, **100**, 3-12.
- 7- **A.J. Ramsay, S.J. Kent, R.A. Strugnell, A. Suhrbier, S.A. Thomson and I.A. Ramshaw** (1999). Genetic vaccination strategies for enhanced cellular, humoral and mucosal immunity. *Immunol. rev.*, **171**, 27-44.
- 8- **S. Gurunathan, L. Stobie, C. Prussin, D.L. Sacks, N. Glaichenhaus, A. Iwasaki, D.J. Fowell, R.M. Locksley, J.T. Chang, C.Y. Wu and R.A. Seder** (2000). Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. *J. Immunol.*, **165**(2), 915-924.
- 9- **D. Xu and F. Liew** (1994). Genetic vaccination against leishmaniasis. *Vaccine*, **12**(16), 1534-1536.
- 10- **D. Xu and F.Y. Liew** (1995). Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology*, **84**(2), 173-176.
- 11- **P. Walker, T. Scharton-Kersten, E.D. Rowton, U. Hengge, A. Boulloc, M.C. Udey and J.C. Vogel** (1998). Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T cell type 1 immune response and protection in a murine model of Leishmaniasis. *Human. Gene. Therapy*, **9**(13), 1849-50.
- 12- **R.M. Gonzalo, G. del Real, J.R. Rodriguez, D. Rodriguez, R. Heljasvaara, P. Lucas, V. Larraga and M. Esteban** (2002). A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, **20**(7-8), 1226-1231.
- 13- **S. Gurunathan, C. Prussin, D.L. Sacks and R.A. Seder** (1998). Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. *Nature. Med.*, **4**(12), 1409-1415.
- 14- **S. Gurunathan, D.L. Sacks, D.R. Brown, S.L. Reiner, H. Charest, N. Glaichenhaus and R.A. Seder** (1997). Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.*, **186**(7), 1137-1147.
- 15- **S. Gurunathan, L. Stobie, C. Prussin, D.L. Sacks, N. Glaichenhaus, A. Iwasaki, D.J. Fowell, R.M. Locksley, J.T. Chang, C.Y. Wu and R.A. Seder**

- (2000). Requirements for the maintenance of Th1 immunity *in vivo* following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. *J. Immunol.*, **165**(2), 915-924.
- 16- **L. Sobie, S. Gurunathan, C. Prussin, D.L. Sacks, N. Glaichenhaus, C.Y. Wu and R.A. Seder** (2000). The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**(15), 8427-8432.
- 17- **E. Handman, A.H. Noormohammadi, J.M. Curtis, T. Baldwin and A. Sjolander** (2000). Therapy of murine cutaneous leishmaniasis by DNA vaccination. *Vaccine*, **18**(26), 3011-3017.
- 18- **A. Campos-Neto, J.R. Webb, K. Greeson, R.N. Coler, Y.A. Skeiky and S.G. Reed** (2002). Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTII leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Infect. Immun.*, **70**(6), 2828-2836.
- 19- **S. Rafati, A.H. Salmanian, T. Taheri, M. Vafa and N. Fasel** (2001). A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cysteine proteinases of *Leishmania major*. *Vaccine*, **19**(25-26), 3369-3375.
- 20- **S. Iborra, M. Soto, J. Carrion, A. Nieto, E. Fernandez, C. Alonso and J.M. Requena** (2003). The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infect. Immun.*, **71**(11), 6562-6572.
- 21- **K. Campbell, H. Diao, J. Ji and L. Soong** (2003). DNA immunization with the gene encoding P4 nuclease of *Leishmania amazonensis* protects mice against cutaneous Leishmaniasis. *Infect. Immun.*, **71**(11), 6270-6278.
- 22- **C.H.C. Serezani, A.R. Franco, M. Wajc, J.K.U. Yokoyama-Yasunaka, G. Wunderlich, MM. Borges and SRB. Uliana** (2002). Evaluation of the murine immune response to *Leishmania* meta 1 antigen delivered as recombinant protein or DNA vaccine. *Vaccine*, **20**(31-32), 3755-3763.
- 23- **B. Sukumaran, P. Tewary, S. Saxena and R. Madhubala** (2003). Vaccination with DNA encoding with ORFF antigen confers protective immunity in mice infected with *Leishmania donovani*. *Vaccine*, **21**(11-12), 1292-1299.
- 24- **E. Dumonteil, F. Andrade-Narvarez, J. Escobedo-Ortegon, M.J. Ramirez-Sierra, G. Valencia-Pacheco, A. Flores-Serrano, S. Canto-Lara and A. Arjona-Torres** (2000). Comparative study of DNA vaccines encoding various antigens against *Leishmania mexicana*. *Dev. Biol. (Basel)*, **104**, 135-141.
- 25- **S. Rafati, F. Ghaemimanesh and F. Zahedifard** (2006). Comparison of potential protection induced by three vaccination strategies (DNA/DNA, Protein/Protein and DNA/Protein) against *Leishmania major* infection using Signal Peptidase type I in BALB/c mice. *Vaccine*, **24**(16), 3290-3297.
- 26- **A. Khamesipour, S. Rafati, N. Davoudi, F. Maboudiand and F. Modabber** (2006). Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian. J. Med. Res.*, **123**(3), 423-438.
- 27- **E. Dumonteil** (2007). DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. *J. Biomed. Biotechnol.*, (6), 90520.
- 28- **S. Mendez, Y. Belkaid, RA. Seder and Sacks D.** (2002). Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, **20** (31-32), 3702-3708.
- 29- **A. Campos-Neto, R. Porrozzi, K. Greeson, R.N. Coler, J.R. Webb, Y.A. Seiky, S.G. Reed and G. Grimaldi** (2001). Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and non human primate models of the human disease. *Infect. Immun.*, **69**(6), 4103-4108.
- 30- **S. Iborra, M. Soto, J. Carrion, C. Alonso and J.M. Requena** (2004). Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, **22**(29-30), 3865-3876.
- 31- **A.Y. Park, B. Hondowicz, M. Kopf and P. Scott** (2002). The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*. *J. Immunol.*, **168**(11), 5771-5777.
- 32- **P. Launois, I. Maillard, S. Pingel, K.G. Swlhart, I. Xénarios, H. Acha-Orbea, H. Diggelmann, R.M. Locksley, R. McDonald and J.A. Louis** (1997). IL-4 rapidly produced by V 4 V 8 CD4+ T cells Instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c Mice. *Immunity*, **6**, 541-549.

- 33- M.J. Ramiro, J.J. Zarate, T. Hanke, D. Rodriguez, J.R. Rodriguez, M. Esteban, J. Lucientes, J.A. Castillo and V. Larraga (2003). Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine*, **21**(19-20), 2474-2484.
- 34- A.H. Noormohammadi, H. Hochrein, J.M. Curtis, T.M. Baldwin and E. Handman (2001). Paradoxical effects of IL-12 in leishmaniasis in the presence and absence of vaccinating antigen. *Vaccine*, **19**(28-29), 4043-4052.
- 35- K. Yamakami, S. Akao, M. Sato, Y. Nitta, J.I. Miyazaki and T. Tadakuma (2001). A single intradermal administration of soluble leishmanial antigen and plasmid expressing Interleukin-12 protects BALB/c mice from *Leishmania major* infection. *Parasitol. Inter.*, **50**, 81-91.
- 36- R.M. Gonzalo, J.R. Rodriguez, D. Rodriguez, G. Gonzalez-Aseguinolaza, V. Larraga and M. Esteban (2001). Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36LACK and IL-12 in combination with purified p36. *Microbes And infection*, **3**(9), 701-711.
- 37- A. Campos-Neto, R. Porrozz, K. Greeson, R.N. Coler, J.R. Webb, Y.A. Seiky, S.G. Reed and G. Grimaldi (2001). Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. *Infect. Immun.*, **69**(6), 4103-4108.
- 38- E. Tapia, E. Pérez-Jiménez, L. Lopez-Fuertes, R. Gonzalo, M.M. Gheradi and M. Esteban (2003). The combination of DNA vectors expressing IL-12+IL-18 elicits high protective immune response against cutaneous leishmaniasis after priming with DNA-p36/LACK and the cytokines, followed by a booster with a vaccinia virus recombinant expressing p37/LACK. *Microbes and infection*, **5**, 73-84.
- 39- A.H. Noormohammadi, H. Hochrein, J.M. Curtis, T.M. Baldwin and E. Handman (2001). Paradoxical effects of IL-12 in leishmaniasis in the presence and absence of vaccinating antigen. *Vaccine*, **19**(28-29), 4043-4052.
- 40- J. Poot, K. Spreeuwenberg, S.J. Sandeson, V.E.C.J. Schijns, J.C. Mottram, G.H. Coombs and A.N. Vermeulen (2006). Vaccination with a preparation base don recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with *Leishmania Infantum*. *Vaccine*, **24**, 2460-2468.
- 41- PY. Scheerlinck (2001). Genetic adjuvants for DNA vaccines. *Vaccine*, **19**, 2647-2656.
- 42- FN. Toka and CD. Pack (2004). Molecular adjuvants for mucosal immunity. *Immunol. rev.*, **199**, 100-112.
- 43- I. Follador, C. Araujo, G. Orge, L.H. Cheng, L.P. De Carvalho, O. Bacellar, R.P. Almeida and EM. Carvalho (2002). Immune responses to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Vaccine*, **20**, 1365-1368.
- 44- C. Kebaier, H. Louzir, M. Chenik, A. Ben Salah and K. Dellagi (2001). Heterogeneity of wild *Leishmania major* isolates in experimental murine pathogenicity and specific immune response. *Infect. Immun.*, **69**(8), 4906-4915.
- 45- S. Ben Hadj Ahmed, C. Bahloul, C. Robbana, S. Askri and K. Dellagi (2004). A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*. *Vaccine*, **22**(13-14), 1631-1639.
- 46- S. Ben Hadj Ahmed, L. Toihri, Y. Chtourou, K. Dellagi and C. Bahloul (2009). DNA based vaccination with a cocktail of plasmids encoding *Leishmania (Leishmania) major* antigens confers full protection in BALB/c mice. *Vaccine*, **27**(1), 99-106.
- 47- M. Xue, S. He, J. Zhang, Y. Cui, Y. Yao and H. Wang (2008). Comparison of cholera toxin A2/B and murine interleukin-12 as adjuvants of *Toxoplasma multi-antigenic* SAG1-ROP2 DNA vaccine. *Exp. Parasitol. Jul.*, **119** (3), 352-357.
- 48- L. Zhang, Y. Yang, X. Yang, J. Zhao, J. Yang, F. Liu, Z. Zhang, G. Wu and C. Su (2008). T cell epitope-based peptide-DNA dual vaccine induces protective immunity against *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6J mice. *Microbes. Infect. Mar.*, **10**(3), 251-259.
- 49- Y. Belkaid, S. Kamhawi, G. Modi, J. Valenzuela, N. Noben-Trauth, E. Rowton, J. Ribeiro and D.L. Sacks (1998). Developpement of a natural model of a cutaneous leishmaniasis : Powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major*

- infection in the mouse ear dermis. *J. Exp. Med.*, **188**(10),1941-1953.
- 50- **Y. Belkaied, S. Mendez, R. Lira, N. Kadambi, G. Milon and D. Sacks** (2000). A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prologed silent phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J. Immunol.*, **165**, 969-977.
- 51- **R. Xu, S. Megati, V. Roopchand, A. Luckay, A. Masood, D. Garcia-Hand, M. Rosati, D.B. Weiner, B.K. Felber, G.N. Pavlakis, M.K. Sidhu, J.H. Eldridge and M.A. Egan** (2008). Comparative ability of various plasmid-based cytokines and chemokines to adjuvant the activity of HIV plasmid DNA vaccines. *Vaccine*, **26**, 4819-4829.