

**ÉTUDE DES MÉCANISMES DE RÉGULATION DE
LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE CHEZ LE
MACROPHAGE MURIN DANS UN CONTEXTE
D'INTERACTIONS HÔTE-PATHOGÈNE**

Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de Docteur en immunologie-virologie
INRS-Institut Armand-Frappier

Par

Frédéric Chano

Sous la direction de

Dr. Albert Descoteaux, PhD

Membres du jury

Président du jury et examinateur interne	Mathieu Cellier, PhD, INRS-IAF
Examineur externe	Gaetan Faubert, PhD, U. McGill
Examineur externe	Patrick McDonald, PhD, U. Sherbrooke
Directeur de recherche	Albert Descoteaux, PhD, INRS-IAF

Seuls ceux qui prennent le risque d'échouer spectaculairement réussiront brillamment.

Robert Kennedy.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures	iii
Liste des tableaux	v
Liste des abréviations	vi
Sommaire	ix
Introduction	1
Revue bibliographique	4
1.0. Le macrophage.....	5
1.1. La phagocytose	5
1.1.1. Les récepteurs IgG Fc	5
1.1.2. Les récepteurs « scavenger »	6
1.1.3. Les récepteurs du complément.....	7
1.1.4. Récepteur du mannose	8
1.2. Les TLR	9
1.3. Rôles des macrophages dans l'immunité acquise.....	11
1.3.1. Effet de l'IFN- γ sur le macrophage.....	11
1.4. Rôles des PKC chez le macrophage.....	12
2. Le LPS	16
2.1 Les récepteurs pour le LPS	17
2.1.1. LBP	17
2.1.2. Le CD14.....	17
2.1.3 TLR4	19
2.1.3.1 Signalisation via le complexe CD14/TLR4/MD-2	21
2.2. Le syndrome du choc endotoxique	23

2.3. Les facteurs de transcription	25
2.3.1 NF- κ B	25
2.3.2. AP-1	27
2.3.3. NF-IL6	28
3. <i>Leishmania</i>	30
3.1. Leishmaniose	30
3.2. Cycle de vie.....	31
3.3. Les glycoconjugués de <i>Leishmania</i>	32
3.3.1. GP63	32
3.3.2. LPG	32
3.3.2.1 Biosynthèse du LPG	32
3.3.2.2 Rôle du LPG chez l'insecte.....	35
3.4. Entrée du parasite dans les macrophages.....	35
3.4.1. Effet sur les voies de signalisation.....	36
3.4.2. Effet sur la réponse inflammatoire.....	37
3.4.3. Effet sur la phagocytose.....	38
Premier chapitre	
Résumé de la première publication.....	42
Première publication	43
Résumé de la seconde publication	76
Seconde publication	77
Deuxième chapitre	
Résumé de la troisième publication	109
Troisième publication	110
Discussion.....	141
4.0 Rôle des macrophages dans l'immunité.....	142
5.0 Rôle de la PKC- α dans l'activation des facteurs de transcription AP-1, NF- κ B et NF-IL6 en réponse au LPS.....	144

6.0 Évasion de l'activation du macrophage par le parasite intracellulaire <i>Leishmania donovani</i>	149
Conclusion générale	154
Annexe I	156
Remerciements	159
Références	161
Annexe II	181

LISTE DES FIGURES

Figure A:	Structure des différentes sous-familles des PKC	14
Figure B:	Schéma de la structure générale du LPS	20
Figure C:	Voies de signalisation induites par le LPS	24
Figure D:	Schéma de la structure générale du LPG de <i>L. donovani</i>	34
Figure E:	Effet de la surexpression d'un DN PKC- α sur l'activité transcriptionnelle du NF- κ B	157
Figure F:	Effet de la surexpression d'un DN PKC- α sur l'activation de la p90RSK	158

Première publication :

Figure 1:	Overexpression of DN PKC- α in the RAW 264.7 macrophage line	69
Figure 2:	Effect of DN PKC- α overexpression on LPS induced TNF- α , IL- α and iNOS mRNA accumulation	70
Figure 3:	Effect of DN PKC- α overexpression on LPS induced secretion of TNF α , IL1 α , and nitrite	71
Figure 4:	DN PKC α overexpression upregulates LPS induced MMP9 secretion	72
Figure 5:	Effect of DN PKC α overexpression on LPS induced I κ B α phosphorylation and degradation	73
Figure 6:	Effect of DN PKC α induced NF- κ B activation overexpression on LPS	74
Figure 7:	Effect of PKC- α overexpression on LPS induced JNK and p38 phosphorylation	75

Seconde publication:

Figure 1A:	Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced AP-1 DNA binding activity	104
Figure 1B :	Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced AP-1 transcriptional activation	104
Figure 2A :	Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced NF-IL6 DNA binding activity	105
Figure 2B:	Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced NF-IL6 transcriptional activation	105
Figure 3:	NF-IL6 and C/EBP δ expression in DN PKC- α -overexpressing macrophages	106
Figure 4:	Overexpression of both WT PKC- α and CA PKC- α (A25E) increase LPS-induced NF-IL6 transcriptional activity	106
Figure 5 :	Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced IL-1 β and G-CSF expression	107

Troisième publication

Figure 1A-B:	Effect of <i>Leishmania</i> infection on AP-1 DNA binding activity	136
Figure 1C-D:	Effect of <i>Leishmania</i> infection on NF-IL6 DNA binding activity	136
Figure 1E-F:	Effect of <i>Leishmania</i> infection on NF- κ B DNA binding activity	136
Figure 2:	Effect of IFN- γ priming on NF- κ B (A) or AP-1 (B) DNA binding activity during <i>Leishmania</i> infection	137
Figure 3:	Effect of <i>Leishmania</i> infection on mRNA production in RAW 264.7 cells and BMM	138
Figure 4:	Effect of <i>Leishmania</i> infection on NO ₂ ⁻ and TNF- α release in RAW 264.7 cells and BMM	139
Figure 5:	Effect of <i>Leishmania</i> infection on IRAK activation in (A) RAW 264.7 cells and (B) BMM	140
Figure 6:	Effect of IFN- γ priming on IRAK activation in (A) RAW 264.7 cells and BMM (B) during <i>Leishmania</i> infection	140

LISTE DES TABLEAUX

Tableau A	Distribution cellulaire des TLR	10
Tableau I	DN PKC- α inhibits LPS-induced nitrite secretion	68

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AP-1	«Activator protein-1»
ARN	Acide ribonucléique
BCR	«B cell receptor»
C/EBP	«CCAAT/enhancer Binding Protein»
CD	«Cluster of designation»
CIITA	«Class II transcription activator»
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX-2	Cyclooxygénase 2
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CR	Récepteur du complément
CRD	«Carbohydrate recognition domain »
DAG	Diacylglycérol
DN	Dominant negative
ERK1/2	«Extracellular regulated kinase»
F-actine	Actine fibreuse
Fc	Fragment cristallisable
FcγR	Récepteur de la partie Fc des IgG
GAS	«Gamma activated sequence»
G-CSF	«Granulocyte colony stimulating factor»
GDP	Guanosine diphosphate
GP	Glycoprotéine
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTPase	Guanosine tri-phosphatase
ICSBP	«Interferon consensus sequence binding protein »
IFN-	Interféron
IL-	Intereukine-
iNOS	«inducible Nitric oxide synthase»
IRAK	«Interleukin-1 receptor associated kinase»
IRF-	«Interferon response factor»
ITAM	«Immuno-tyrosine based activator motif»
JAK	Janus kinase
JNK	«c-Jun N terminal kinase»
LBP	«LPS-binding protein»
LDL	«Low density lipoprotein»
LPG	Lipophosphoglycan
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Acide lipotechoïque
MAPk	«Mitogen Activated Protein kinase»
MARCKS	«Myristoylated, alanine-rich C-kinase substrate»
MyD88	«Myloid differentiation protein»
NF-	«Nuclear factor»
NK	«Natural killer cell»
NO	Oxide nitrique

PAMP	«Pathogen associated molecular pattern»
PG	Phosphoglycan
PIP ₃	Phosphatidyl inositol tri-phosphate
PKC	Protéine kinase C
PMA	Phorbol myristoyl acétate
PPG	Protéophospho glycan
PRR	«Pathogen recognition receptor»
ROI	«Reactive oxygen intermediates »
SAPk/ JNK	«Stress activated protein kinase/c-jun N terminal kinase»
SR-	«Scavenger receptor»
STAT	«Signal transducers and activators of transcription»
TCR	«T cell receptor»
TGF-	«Transforming growth factor»
Th	«T helper»
TIR	«Toll/interleukin-1 receptor»
TLR	«Toll-like receptor»
TRAF	«Tumor necrosis factor receptor-associated factor»

SOMMAIRE

Le macrophage joue un rôle prépondérant tant au niveau de la réponse immunitaire que dans le maintien de l'homéostasie. Les mammifères qui sont dépourvus de macrophages, tels les souris déficientes pour le facteur de transcription PU.1, ne peuvent survivre. Alors que leurs rôles sont bien connus, beaucoup reste encore à découvrir au sujet de la régulation des fonctions du macrophage.

Prévenir l'infection par des microorganismes est un rôle essentiel du macrophage. Deux types de microorganismes pathogènes ont fait l'objet de mes travaux de doctorat, soit les bactéries à Gram négatif et le parasite *Leishmania donovani*.

Considérant les résultats obtenus à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, il est bien évident que plusieurs membres de la famille des PKC sont impliqués dans la régulation des fonctions des macrophages. Par contre, les rôles précis que jouent les différents isoenzymes le sont moins. À cet effet, nous avons étudié le rôle de la PKC- α dans l'activation des facteurs de transcription AP-1, NF-IL6 et NF- κ B en réponse au LPS. Notre choix de facteurs de transcription est basé sur le fait que la majorité des gènes de la réponse inflammatoire ont dans leur région promotrice des séquences de liaisons pour ces facteurs. De plus, nous avons analysé le rôle des PKC dans la production de diverses cytokines. Nos résultats démontrent que la PKC- α régule l'activation du facteur de transcription NF-IL6 ainsi que l'expression des gènes IL-1 β et G-CSF en réponse au LPS.

Par ailleurs, nous avons étudié le rôle du LPG de *L. donovani* dans l'évasion de l'activation du macrophage. Nos résultats suggèrent que le LPG du parasite *Leishmania donovani* mène à une baisse de translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B et diminue l'activité de la kinase IRAK.

INTRODUCTION

Le macrophage occupe une place centrale au niveau de la réponse immunitaire. Même si seules les cellules dendritiques ont la capacité de stimuler les lymphocytes T naïfs [1], le macrophage n'en demeure pas moins une excellente CPA ainsi qu'un phagocyte professionnel lui permettant de faire le lien entre la réponse innée et acquise.

Le lipopolysaccharide (LPS) est un puissant activateur de la réponse inflammatoire. La liaison du LPS aux récepteurs CD14/TLR4/MD2 exprimés à la surface du macrophage et au TLR4/MD2 exprimés à la surface des lymphocytes B déclenche une cascade d'évènements intracellulaires qui mèneront à la production de cytokines proinflammatoires et ultimement à l'activation des lymphocytes T, B et cellules NK. Dans les cas sévères, le patient souffre d'une coagulation intravasculaire disséminée, d'une chute importante de pression artérielle ainsi que d'une défaillance systémique générale, pouvant entraîner la mort [2]. Alors que les effets de cette toxine bactérienne sur l'animal infecté et sur le macrophage sont bien connus, le rôle des différentes voies de signalisation que cette toxine induit l'est moins. Il est clair que les tyrosines kinases et sérines/thréonines kinases, telles les PKC, sont activées en réponse au LPS [3]. Mais puisqu'il y a six isoenzymes de la famille des PKC exprimés chez le macrophage, leur rôle respectif dans la réponse au LPS est peu connu. Nous avons, dans des études précédentes, entrepris d'étudier le rôle de la PKC- α dans les fonctions induites par le LPS. Pour arriver à cette fin, nous avons surexprimé un mutant de l'isoforme α qui agit comme dominant-négatif. La mutation est située dans le site catalytique (K368D) et donc l'enzyme surexprimé domine sur la forme endogène pour l'activation des substrats. Nos travaux ont démontré que la sérine/thréonine protéine kinase PKC- α est impliquée dans l'expression des gènes iNOS, IL-1 α et de COX-2, ainsi que dans la sécrétion de NO, IL-1 α et la production de COX-2 en réponse au LPS [4, 5]. Curieusement, les trois voies des MAPk et l'activation du NF- κ B en réponse au LPS étaient intactes dans les lignées surexprimant un DN PKC- α [4]. Les objectifs de cette partie de projet étaient donc de 1) déterminer le rôle de la PKC- α dans l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF-IL6 et 2) analyser le rôle de la PKC- α dans la production de G-CSF et IL-1 β en réponse au LPS. Nos résultats démontrent que la PKC- α régule la translocation nucléaire du NF-

IL6. Comme conséquence de cette translocation défectueuse, la synthèse d'ARNm d'IL-1 β et de G-CSF en réponse au LPS est abolie dans les clones DN PKC- α [6].

Les parasites du genre *Leishmania* sont responsables d'une famille de maladies communément appelée leishmaniose. La forme la plus sévère, la leishmaniose viscérale ou Kala-azar, est causée par *Leishmania donovani*. Si elle est non traitée et que la personne atteinte a un système immunitaire affaibli, cette infection peut être mortelle. Le lipophosphoglycan (LPG), une molécule exprimée à la surface de la forme promastigote de ce parasite, joue un rôle important lors de l'établissement de l'infection. En effet, le LPG de *L. donovani* inhibe l'activation de la PKC [7-9]. Nous avons démontré précédemment que l'infection de macrophages naïfs avec des promastigotes de *L. donovani* ne conduit pas à l'activation de ERK1/2. Inversement, l'infection avec des mutants de *L. donovani* déficients dans la biosynthèse du LPG (LPG^{-/-}) mène à l'activation de cette voie de signalisation [10]. Afin d'approfondir nos connaissances sur le rôle du LPG dans l'évasion de l'activation des macrophages, nous avons entrepris d'étudier le rôle de cette molécule dans l'activation des facteurs de transcription AP-1, NF- κ B et NF-IL6 chez des macrophages naïfs et activés à l'IFN- γ . Nos résultats démontrent que la présence de LPG permet aux promastigotes d'éviter l'activation du facteur de transcription AP-1 et module négativement le niveau basal du facteur NF- κ B lors d'infections de macrophages naïfs. De plus, nous avons observé que l'infection de cellules pré-stimulées à l'IFN- γ avec des promastigotes de type sauvage entraîne une activation d'IRAK plus forte que lors d'infection par des promastigotes LPG^{-/-}. Ceci suggère qu'un récepteur TLR, dont l'expression est induite par l'IFN- γ , reconnaît des molécules exprimées sur le parasite, notamment le LPG.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.0. Le macrophage

Le macrophage est une cellule hématopoïétique qui provient de la moelle osseuse. Le progéniteur de la lignée myélo-monocytaire donne aussi naissance à la lignée granulocytaire. Dès que les précurseurs se sont différenciés en monocytes, ces derniers vont dans la circulation sanguine et en réponse à divers stimuli, migrent vers les différents tissus où ils mûrissent en macrophages tissulaires, distribués de façon ubiquitaire. Le macrophage a des fonctions précises à l'intérieur d'un tissu ou organe particulier, mais de façon générale, le macrophage joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie corporelle en sécrétant une importante variété de médiateurs solubles, en éliminant les débris cellulaires et les cellules apoptotiques. Il est aussi impliqué dans la réparation des tissus et dans l'hématopoïèse. Enfin, il est un phagocyte professionnel et permet de faire le lien entre l'immunité innée et l'immunité acquise suite à la phagocytose de microorganismes pathogènes.

1.1. La phagocytose

La phagocytose est un des rôles principaux du macrophage. Exprimés à sa surface, le macrophage possède différents récepteurs lui permettant d'ingérer des cellules du soi et des cellules du non-soi. N'étant pas aussi spécifiques que le TCR ou le BCR des lymphocytes T et B, ces différents récepteurs ont néanmoins une certaine spécificité de reconnaissance. Parmi ces récepteurs sont les récepteurs Fc, récepteurs «scavengers», récepteurs du complément et le récepteur du mannose.

1.1.1. Les récepteurs IgG Fc

Ces récepteurs reconnaissent la partie Fc des immunoglobulines [11]. Les macrophages expriment à leur surface trois types de récepteurs Fc: CD16 (FcγRIII), CD32 (FcγRII) et CD64 (FcγRI). Les FcγRI reconnaissent les monomères d'IgG et sont dits de haute affinité. L'expression des récepteurs FcγRI est restreinte aux phagocytes professionnels et leur activation mène à la fièvre respiratoire. Les FcγRII et RIII ne reconnaissent que les

multimères et sont donc de faible affinité pour les IgG. La liaison entre une particule et les immunoglobulines fixées aux récepteurs Fc présents à la surface du macrophage permettra le pontage des récepteurs et enclenchera l'internalisation de la particule par un mécanisme dépendant de la phosphorylation des tyrosines de l'ITAM et de la polymérisation de l'actine. Ceci mène à une cascade de signalisation dont l'issue dépendra du type de récepteur activé. La cascade peut donc mener à une activation cellulaire ou à la répression de l'activation cellulaire. Certains récepteurs Fc dits "activateurs" n'ont pas de domaine intra-cytoplasmique et doivent donc s'associer avec une sous-unité qui permettra la signalisation intracellulaire. La sous-unité responsable de la transmission des signaux est la chaîne γ . Grâce à son ITAM, cette chaîne recrute plusieurs molécules adaptatrices telles que Cbl ou Grb2, ainsi que des protéines tyrosines kinases [11]. Parmi les protéines tyrosines kinases recrutées on retrouve Fgr, Hck et Lyn, trois membres de la famille de Src, ainsi que Syk, qui joue un rôle essentiel dans la phagocytose via les récepteurs Fc. Les macrophages des souris déficientes en Syk peuvent initier la phagocytose mais sont incapables d'internaliser les particules [12]. Ceci pourrait être dû au fait que Syk active les PI3 kinases qui, à leur tour, activent les GTPases Rac et Cdc42 [13], molécules essentielles pour l'accumulation de F-actine périphagosomale [14].

1.1.2. Les récepteurs «scavengers»

Les récepteurs scavengers de classe A sont une famille de glycoprotéines exprimées en tant qu'homotrimères et possédant une courte partie intra-cytoplasmique [15]. Les voies de signalisation intracellulaires engendrées par la liaison de ligands aux récepteurs scavengers sont très peu connues, ainsi que sur les rôles de cette famille de récepteurs [16]. Ces récepteurs auraient le plus large éventail de ligands potentiels [17]. Leur premier rôle attribué était en tant que récepteurs de LDL [18, 19], les impliquant donc dans la formation des plaques athéromateuses [20]. Ces récepteurs reconnaissent les lipoprotéines que l'origine soit microbienne ou non. Ils reconnaissent aussi le LTA présent à la surface des bactéries Gram positif. Ces récepteurs, tout comme les récepteurs mannose (section 1.1.4) et TLR (section 1.2.), sont des PRR : ils reconnaissent des

structures moléculaires distinctes du non-soi nommées PAMP, tels que le LPS, le LTA [21], l'ADN CpG d'origine bactérienne [22], la flagelline [23] ou l'ARN double brin [24]. Les PRR ont évolué de manière à reconnaître des structures invariables présentes dans une même classe de microorganismes et dont l'absence serait létale pour cette classe de microorganismes. On pense par exemple au LPS ou au LTA des bactéries à Gram négatif ou positif, respectivement. De plus, contrairement aux récepteurs des lymphocytes B et T, il n'y a pas de réarrangements géniques ou de mutations somatiques afin d'augmenter l'affinité du récepteur pour son (ses) ligand(s). Il est aussi important de noter que les PAMP ne sont pas nécessairement des facteurs de virulence, ce qui signifie que les PRR sont incapables de distinguer entre les microorganismes pathogènes et non pathogènes. Il y a par contre plusieurs mécanismes en place pour limiter les réponses immunes contre les microorganismes commensaux, comme par exemple la production des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- β dans l'intestin [21].

Un des membres de la famille des récepteurs scavenger, le récepteur de type A (SR-A), joue un rôle important au niveau de la réponse au LPS. Fidèle à son rôle d'éboueur, le SR-A permet l'endocytose et la destruction du LPS afin d'empêcher l'activation exagérée du macrophage. À des doses égales de LPS, des souris déficientes en SR-A sont plus susceptibles au choc endotoxique que les souris de type sauvage. Cette susceptibilité serait liée au fait que les souris déficientes en SR-A ont des taux de TNF- α et d'IL-6 beaucoup plus élevés, exacerbant la réaction inflammatoire [25]. Donc, le SR-A jouerait un rôle protecteur lors du choc endotoxique. De plus, ces souris déficientes en SR-A sont plus susceptibles à divers pathogènes, notamment *L. monocytogenes* et HSV [26].

1.1.3. Les récepteurs du complément

Le système du complément fait partie du système immunitaire inné. Les oursins de mer seraient les premiers organismes à exprimer ces récepteurs [27]. Ces récepteurs se trouvent donc exprimés par des organismes très primitifs [28]. Il existe 4 récepteurs du complément dont trois sont exprimés par le macrophage, soient CR1, CR3 et CR4. Tous ces récepteurs ont des structures très variées leur conférant ainsi une spécificité pour les

composantes du système du complément [29]. Trois différentes voies d'activation de la cascade du complément existent, soient les voies classique, alternative et la voie des lectines, menant toutes à la lyse de la cellule cible grâce à la formation du complexe d'attaque de la membrane [28]. Plusieurs intermédiaires intracellulaires sont impliqués lors de la phagocytose via le CR3, notamment la formation d'inositols phosphates et DAG, ainsi que dans la mobilisation de Ca^{++} . Ces médiateurs mènent à l'activation des PKC [30], de la GTPase Rho [31] ainsi qu'à la voie de ERK [32, 33]. Tout ceci culmine par la dégranulation des phagocytes et la destruction du microorganisme [34].

Un dilemme important existe en ce qui concerne le CR3. Ce récepteur, en plus d'être le récepteur du C3bi, est aussi une molécule d'adhésion. Évidemment, lorsque le CR3 exerce ses fonctions de molécule d'adhésion, il n'y a pas de dégranulation, ce qui causerait une destruction tissulaire importante. Il semblerait que différentes parties du récepteur soient impliquées dans chacun de ces processus. Plus précisément, des sites de liaisons distincts pour le C3bi et les molécules d'adhésion existent sur ce récepteur, menant à des réponses différentes. Certains pathogènes, comme *Leishmania donovani*, tirent avantage du double rôle du CR3. Le LPG de *L. donovani* peut à la fois lier le C3bi et le domaine lectine du CR3, empêchant la flambée respiratoire, tout en permettant son entrée dans la cellule [35]. De plus, certaines études démontrent que la liaison du C3bi induit une libération d'IL-10, inhibant ainsi la production d'IL-12 [36-38], une cytokine essentielle à l'activation des lymphocytes T et des cellules NK.

1.1.4. Récepteur du mannose

Le récepteur du mannose est une molécule transmembranaire de 175 kDa [39]. La portion extracellulaire est constituée de régions riches en cystéines, d'un domaine fibronectine de type II et de huit CRD impliqués dans la reconnaissance des ligands. Ce récepteur est aussi exprimé à la surface de certaines sous-populations de cellules dendritiques [40]. Le spectre de reconnaissance est large et inclut des bactéries, des levures, des virus, des parasites, dont des promastigotes métacycliques de *L. donovani* [41]. Ce récepteur reconnaît les résidus glucidiques mannose et fucose exprimés à la

surface de plusieurs pathogènes. Puisque l'expression de ces résidus est restreinte aux microorganismes unicellulaires, le récepteur du mannose peut faire la distinction entre les pathogènes et les cellules du soi. La phagocytose via ce récepteur implique le recrutement de la F-actine, PKC- α et MARCKS et peut mener à la production de ROI et d'acide arachidonique, TNF- α , IL-1 et IL-12 [42]. Par contre, les voies de signalisation intracellulaires enclenchées lors de l'activation de ce récepteur sont peu connues.

1.2. Les TLR

Les TLR sont des homologues des récepteurs « Toll » de la drosophile, d'où l'acronyme « Toll Like Receptor ». Le premier rôle attribué au Toll chez la drosophile était dans la polarité dorso-ventrale de l'embryon [43]. Plus tard, il a été révélé que ce récepteur avait d'autres fonctions, notamment dans la production du peptide antifongique drosomycine chez la drosophile adulte [44]. Les TLR des mammifères et les Toll de la drosophile ont donc des fonctions communes. Les Toll font donc partie d'un système immunitaire ancestral, que l'on trouve tant chez la drosophile que chez l'homme [45]. Il y a à peine quelques années, les ligands et les fonctions des TLR étaient très peu connus.

Au contraire des récepteurs mentionnés précédemment, les TLR font l'objet de plusieurs études qui ont permis de révéler plusieurs intermédiaires impliqués dans les cascades enclenchées lors de l'activation de ces récepteurs. Les TLR font partie de la famille des Toll, qui compte maintenant 10 membres chez l'humain et 9 chez la souris [45]. Une caractéristique commune à chacun des membres de cette famille est qu'ils ont deux domaines importants. Le domaine extracellulaire est caractérisé par plusieurs régions riches en leucine et est impliqué dans la reconnaissance des ligands. Quant à la partie intra-cytoplasmique, elle possède un domaine TIR (Toll/Interleukin Receptor) qui lui permet d'interagir avec la protéine adaptatrice MyD88.

Récemment, plusieurs études ont permis de comprendre le rôle de ces récepteurs et identifier certains de leurs ligands (Tableau A). Décrire tous les récepteurs et leurs

ligands dépasserait le cadre de ce texte, mais certains faits restent notoires, particulièrement le rôle potentiel des TLR dans l'orientation de la réponse immunitaire. En considérant que les médiateurs sécrétés par les macrophages sont responsables, du moins en partie, de la différenciation des lymphocytes Th0 en Th1 ou Th2, les TLR constituent un lien important entre l'immunité innée et l'immunité adaptative [46]. Plusieurs études récentes suggèrent que les pathogènes reconnus par les TLR induisent une réponse Th1 et non Th2. Ces résultats ont été obtenus à l'aide de souris déficientes pour MyD88 et IRAK, deux composantes communes à toutes les voies des différents TLR. Brièvement, les réponses aux bactéries intracellulaires ou à l'ARN d'origine virale, qui sont normalement de type Th1, étaient inhibées, mais les réponses aux organismes multicellulaires, tels que les helminthes, qui sont de type Th2, étaient normales. Ceci suggère donc que les TLR ont évolué pour induire une réponse à médiation cellulaire et ne seraient pas essentiels pour la réponse Th2 [21 , 47].

TLR	Distribution cellulaire	Fonctions	Références
TLR1	DC, M ϕ , MC, GC	Se dimérise avec TLR2	[48]
TLR2	DC, M ϕ , MC, GC	PGN, lipoproteins, LPS atypiques, GPI, zymosan	[21, 49, 50]
TLR3	DC, M ϕ , GC	ARN double brin	[24]
TLR4	DC, M ϕ , MC, GC	LPS, LTA, HSP60*, RSV	[50-53]
TLR5	DC, M ϕ	Flagelline**	[23]
TLR6	DC, M ϕ , MC, GC	Se dimérise avec TLR2	[54]
TLR7	DC, M ϕ , GC	Imidazoquinolines	[55]
TLR9	DC, M ϕ , GC	ADN CpG	[22]

Tableau A : DC : cellule dendritique; GC : granulocyte; LTA: acide lipoteichoïque MC : mastocyte; M ϕ : macrophage; PGN : peptidoglycan

* Seul ligand physiologique connu à ce jour.

** Provenant des bactéries à Gram négatif et positif.

1.3. Rôles des macrophages dans l'immunité acquise

En plus d'être des phagocytes professionnels, les macrophages sont aussi des cellules présentatrices d'antigènes. Les macrophages sécrètent une variété de cytokines et de médiateurs ayant la propriété de moduler l'activité des cellules environnantes, comme par exemple les cellules vasculaires endothéliales, ainsi que des cellules du système immunitaire, particulièrement les cellules T, B et NK. En plus du recrutement des cellules immunitaires, le macrophage peut s'autoactiver directement en sécrétant entre autre du TNF- α ou de l'IL-1. Le macrophage peut aussi s'autoactiver indirectement en sécrétant de l'IL-12. Cette cytokine entraînera les cellules T et NK à produire de l'IFN- γ , un puissant activateur des monocytes/macrophages. Un autre mécanisme d'autoactivation indirecte a récemment été élucidé en utilisant des souris NOS2^{-/-} et IFN- α/β ^{-/-}. Comme la plupart des cellules, les macrophages produisent de l'IFN- α/β en réponse à certains pathogènes. Mais en combinaison avec le NO, qui est produit par les macrophages en réponse à une infection, ces médiateurs provoquent les cellules NK à sécréter de l'IFN- γ . Donc, en réponse à certains pathogènes tel *Leishmania major*, la réponse sera orientée vers une immunité à médiation cellulaire grâce à la production d'IFN- γ [56].

1.3.1. Effet de l'IFN- γ sur le macrophage

L'IFN- γ , tel que mentionné précédemment, est un puissant activateur du macrophage, particulièrement en combinaison avec d'autres cytokines, comme le TNF- α ou encore avec des composantes bactériennes, comme le LPS ou l'ADN CpG ou tout simplement avec des bactéries entières [57]. Le récepteur de l'IFN- γ est exprimé de façon constitutive et est formé de deux chaînes α et deux chaînes β [58]. Associée de manière constitutive aux parties cytoplasmique des chaînes α et β sont les protéines tyrosines kinases JAK1 et JAK2. Lorsque l'IFN- γ se lie à son récepteur, l'homodimère des chaînes α recrute les chaînes β , permettant ainsi l'hétérotétramérisation et l'autophosphorylation des protéines tyrosines kinases JAK1/JAK2. Une fois que les sous-unités se sont liées et

que JAK1/JAK2 sont activées, le facteur de transcription STAT-1 est recruté et phosphorylé sur des résidus tyrosine, lui permettant de s'homodimériser et de transloquer au noyau, où il se liera aux séquences GAS [59]. Les effets de l'IFN- γ sur le macrophage sont pléiotropiques et dépassent le cadre de cette revue. Il faut tout de même mentionner l'induction de la synthèse d'ARNm de CMHII, grâce au facteur CIITA dont l'expression et l'activation sont eux-mêmes induites par l'IFN- γ [60]. L'expression de plusieurs autres facteurs de transcription sera aussi augmentée, tel que IRF-1 et ICSPB qui permettront, entre autres, la transcription des gènes iNOS et COX-2 [61].

1.4. Rôles des PKC chez le macrophage

Un des premiers articles à rapporter la structure de la PKC décrivait cet enzyme comme étant une sérine/thréonine protéine kinase activée par le DAG et le Ca⁺⁺ [62, 63]. Par la suite, il fut démontré qu'il s'agissait en fait non pas d'une seule protéine, mais d'une famille de kinases ayant en commun certaines caractéristiques structurales et qui compte au moins 12 membres. Six membres de cette famille sont exprimés chez le macrophage (fig A). Cette famille se subdivise en trois sous-familles selon les besoins en activateurs. Le premier groupe comprend les PKC classiques qui dépendent du DAG et du Ca⁺⁺ pour être activées. Les PKC nouvelles constituent le second groupe et dépendent du DAG mais ne requièrent pas de Ca⁺⁺ pour leur activité. Les membres du troisième groupe, les PKC atypiques, ne nécessitent aucun de ces deux activateurs, requérant plutôt d'autres médiateurs lipidiques tels la céramide et le PIP₃ afin d'être activés (fig A) [64, 65].

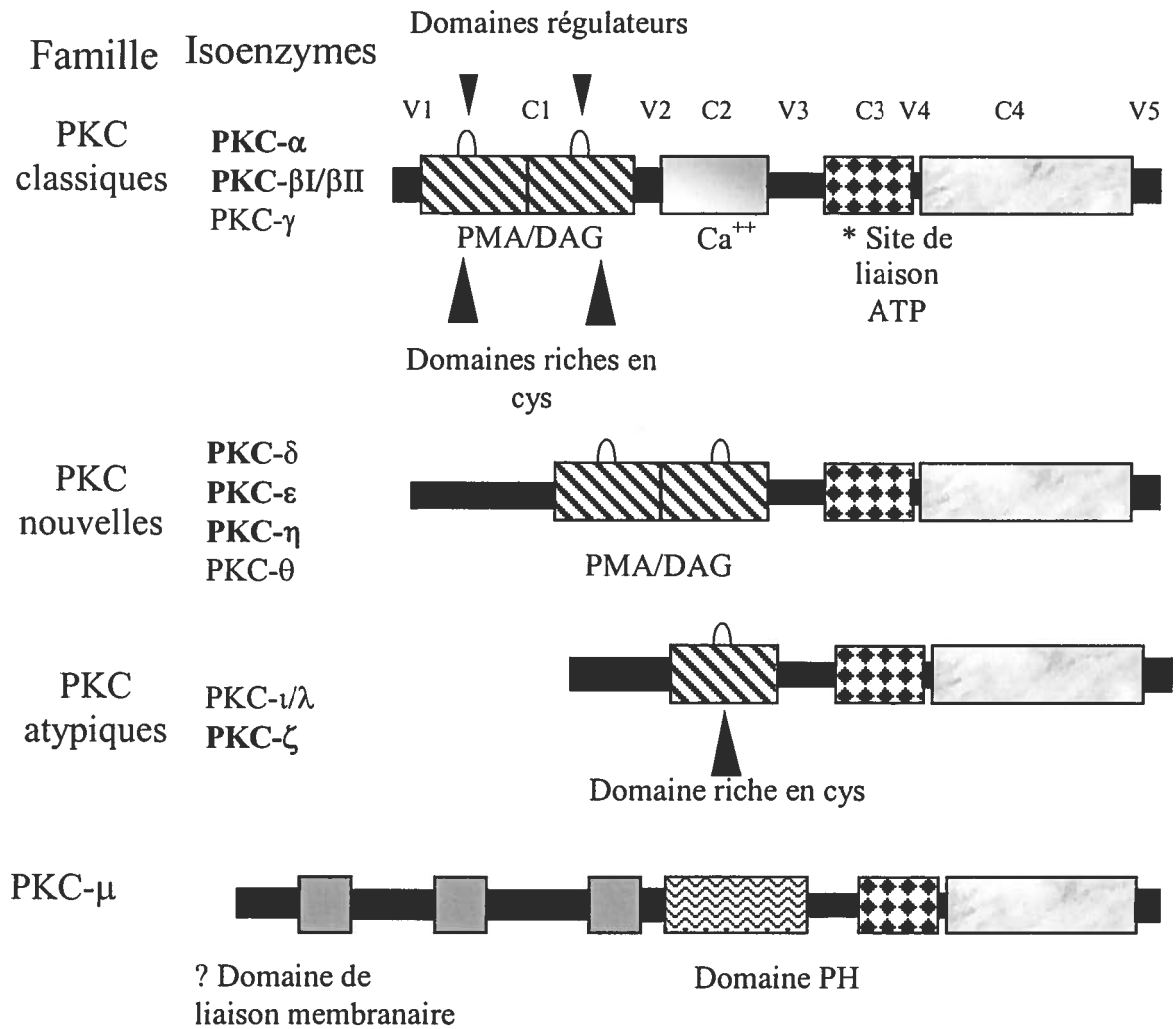
Les six isoenzymes exprimés par le macrophage sont PKC- α , β I, β II, δ , ϵ et ζ . Des différences au niveau de leurs structures, besoins en activateurs et localisation intracellulaire suggèrent que chacun des isoenzymes joue un rôle distinct dans la régulation des fonctions du macrophage. Les premières données sur le rôle des PKC dans la réponse au LPS ont été obtenues à l'aide d'inhibiteurs des PKC.

De tels inhibiteurs pharmacologiques ont permis de démontrer que ces enzymes sont impliqués dans l'expression des gènes d'IL-1 α , IL-1 β et de TNF- α en réponse au LPS

[66]. Plus tard, un rôle pour les PKC dans l'activité anti-tumorale des macrophages a été démontré [67]. Par contre, puisque ces inhibiteurs n'ont pas de spécificité d'isoenzymes, il fut impossible de déterminer le rôle d'un isoenzyme particulier dans les fonctions du macrophage.

Conséquemment, d'autres approches ont été développées. En épuisant certaines PKC par exposition prolongée au PMA, il a été possible de relier PKC- β II à l'expression du gène iNOS et à la production de NO en réponse au LPS [68]. En transfectant de façon transitoire PKC- ϵ , Diaz-Guerra et ses collaborateurs ont déterminé que l'expression d'iNOS en réponse au PMA est régulée par cet isoenzyme [69]. L'utilisation d'un dominant-négatif de la PKC- ζ a permis d'établir un rôle pour cet isoenzyme dans la réponse au TNF- α dans une lignée fibroblastique [70]. En utilisant des ARN anti-sens, Chen et collaborateurs ont suggéré un rôle pour PKC- α , β I et δ pour la production de NO et l'activation du NF- κ B en réponse au LPS [71].

En surexprimant un mutant dominant-négatif de l'isoenzyme α dans la lignée de macrophages murins RAW 264.7, notre laboratoire a démontré que la PKC- α régule l'expression d'IL-1 α , iNOS, MMP-9 et de COX-2 en réponse au LPS et à l'IFN- γ [4, 5]. De plus, cet isoenzyme est impliqué dans l'activation de ERK1/2 lors de phagocytose via les récepteurs Fc γ [72]. Notre approche consiste en la surexpression d'un mutant catalytiquement inactif de l'isoforme alpha. La mutation se situe dans le site de liaison à l'ATP, soit à l'acide aminé 368, où la lysine a été remplacée par un acide aspartique, (K368D), rendant impossible la phosphorylation des substrats de la PKC- α .



Nishizuka, 1992

Figure A : Structure des différentes sous-familles des PKC. V1-5 : Régions variables. C1-4 : Régions constantes. En hachuré, domaine de liaison au DAG et PMA. En ombragé, domaine de liaison au Ca⁺⁺. En quadrillé : domaine de liaison à l'ATP; * site de la mutation K368D. En gras, isoenzymes présentes chez les macrophages.

Depuis près de 10 ans, plusieurs souris déficientes en PKC ont été générées. En 1993, le groupe de Tonegawa publiait ses travaux sur les souris PKC- $\gamma^{-/-}$. Ces souris ne semblaient souffrir d'aucune anomalie au niveau du système immunitaire, mais avaient plutôt des déficiences neurologiques [73, 74]. Plus tard, des souris déficientes pour la PKC- β ont été conçues. Ces souris avaient un phénotype qui ressemblait à l'agammaglobulinémie liée au chromosome X (X-linked immunodeficiency) c'est à dire une diminution d'activation des lymphocytes B et une baisse de production d'anticorps. Fait intéressant à souligner, ces souris ne semblent pas souffrir de défauts autres que ceux-ci, ce qui suggère que la PKC- β régule des fonctions spécifiques dans les lymphocytes B induites lors du pontage du BCR [75].

Récemment, des souris déficientes en PKC- α , δ , ϵ , ζ et θ ont été générées. Les souris déficientes pour la PKC- α ne présentent aucune anomalie physiologique pré ou post-natale. Le groupe a étudié l'effet sur la signalisation induite par l'insuline et a constaté que cet isoenzyme régulait négativement l'activation du récepteur à l'insuline [76]. Le mécanisme exact reste encore à déterminer. Par contre, les résultats de ce groupe suggèrent que la PKC- α régule négativement l'activation de PKCs atypiques PIP₃-dépendantes. Ces PKCs sont normalement activées par l'insuline chez les adipocytes et chez certains types de cellules musculaires. Donc la PKC- α permettrait à la cellule activée par l'insuline de retourner à un niveau basal. Un rôle similaire pour la PKC- β avait été suggéré par le même groupe [77].

La déficience en la PKC- δ mène à une augmentation du nombre de lymphocytes B circulants, ainsi qu'un nombre accru des centres germinatifs. Lors de stimulation par des mitogènes tels que le LPS ou par le pontage du BCR avec des anticorps anti-IgM/CD40, une sécrétion accrue en IL-6 a été remarquée. Cette sécrétion est due à une augmentation de l'activité transcriptionnelle du NF-IL6 qui est essentiel pour la transcription et production d'ARNm d'IL-6. Donc, la PKC- δ joue un rôle de régulateur négatif sur l'activation du NF-IL6. De plus, ces souris avaient une augmentation d'anticorps, menant à une glomérulonéphrite, ainsi qu'une infiltration lymphocytaire dans plusieurs organes [78].

Les souris déficientes pour la PKC- ϵ ont permis de démontrer que cet isoenzyme est essentiel pour la destruction de bactéries. En effet, les souris PKC- $\epsilon^{-/-}$ succombent beaucoup plus rapidement aux infections bactériennes (Gram négatif ou positif) que les souris de type sauvage. Cette incapacité à éliminer les pathogènes est reliée au fait que ces souris produisent de très faibles quantités de TNF- α , IL-1 β et NO en réponse à différents stimuli incluant des bactéries à Gram négatif et positif. Selon les auteurs, la PKC- ϵ régule l'activation de p38, ERK 1/2 et du NF- κ B, qui sont impliqués dans la production d'ARNm d'IL-1 β , iNOS et de TNF- α [79]. Les souris déficientes pour la PKC- ζ sont essentiellement normales. Par contre, leurs organes lymphoïdes secondaires sont peu développés, ressemblant aux souris TNF- α R $^{-/-}$ et lymphotoxine β R $^{-/-}$. De plus, l'activité transcriptionnelle du NF- κ B est très faible chez ces souris, démontrant ainsi le rôle essentiel que joue la PKC- ζ dans l'activation du NF- κ B chez les cellules fibroblastiques embryonnaires [80].

Finalement, il a récemment été démontré que l'isoenzyme θ , exprimé exclusivement chez les cellules T, joue un rôle essentiel lors de l'activation du TCR chez les lymphocytes T matures. Par contre, cet isoenzyme n'est pas impliqué dans la sélection clonale thymique. Les souris déficientes en cet isoenzyme possèdent donc un répertoire T normal. Par contre, lors de l'activation du complexe TCR/CD28, il n'y a pas d'expansion clonale puisque PKC- θ contrôle l'activation du NF- κ B induite par le complexe TCR/CD28 [81]. Cet isoenzyme est donc essentiel à la réponse des lymphocytes T et représente donc une cible possible lors de thérapies pour certaines maladies auto-immunes à médiation cellulaire [82].

2.0. Le LPS

Le lipopolysaccharide (LPS) est la composante majeure de la paroi des bactéries à Gram négatif. Cette molécule comporte trois domaines: une chaîne oligosaccharidique (*O*-antigène), une charpente saccharidique et le lipide A [83] (fig. B). Chaque souche bactérienne exprime un *O*-antigène différent permettant son identification. La délétion de l'un ou des gènes codant pour la biosynthèse du *O*-antigène n'est pas létale pour la

bactérie *in vitro*. Par contre, sans O-antigène, la bactérie ne peut survivre à la phagocytose ni à la lyse médiée par le complément [83]. La charpente est plus ou moins variable d'une espèce à l'autre. Le dernier domaine, soit le lipide A, est celui possédant l'activité biologique du LPS proprement dite. L'activité biologique est déterminée selon la conformation spatiale du lipide A, i.e. le lipide A sera actif que s'il possède une structure non lamellaire [83]. Lors d'une infection par des bactéries à Gram négatif, le LPS libéré par ces bactéries (vivantes et mortes) est reconnu par les récepteurs du macrophage, des lymphocytes B et des cellules endothéliales, provoquant le choc endotoxique. Aux Etats-Unis seulement, le choc endotoxique affecte de 300000 à 500000 personnes par année, avec un taux de mortalité de 20-40% [2, 84].

2.1. Les récepteurs pour le LPS

2.1.1. LBP

Lorsqu'un mammifère entre en contact avec le LPS, une cascade d'événements s'enclenche pouvant mener au choc endotoxique. Mais le LPS ne peut agir seul sur cet animal. Une protéine sérique de 60 kDa permet de catalyser le transfert du LPS aux cellules, soit le « LPS binding protein » ou LBP. Cette protéine permet de dissocier les agrégats de LPS et de transférer des monomères de LPS aux cellules [85, 86]. Bien que les souris déficientes pour le gène *Lbp* répondent au LPS [87], elles sont par contre bien plus susceptibles aux infections par des bactéries à Gram négatif et succombent à l'infection, contrairement aux souris de la lignée parentale qui généralement survivent [88]. Un autre rôle pour LBP a aussi été suggéré. Cette protéine peut s'associer avec les lipoprotéines de haute densité qui peut neutraliser le LPS. Donc, le LBP pourrait aussi jouer un rôle dans la détoxification du LPS en plus de catalyser son transfert au CD14 [88].

2.1.2. Le CD14

Le récepteur CD14 est une glycoprotéine de 55 kDa qui est ancrée dans la membrane plasmique via un lien GPI [89]. Deux formes de CD14 existent : une forme membranaire présente chez les macrophages et d'autres cellules de la lignée myélomonocytaire et une forme sécrétée, conférant à certaines cellules la capacité de répondre au LPS, comme les cellules endothéliales [85]. Comme on pouvait s'y attendre, les souris déficientes en CD14 sont résistantes au LPS. À des doses de LPS plus élevées, certains médiateurs inflammatoires peuvent être détectés dans le sérum, démontrant l'existence de récepteurs autres que le CD14, tel le récepteur Mac-1 (CD11b-CD18).

Contrairement à ce qui pourrait être attendu, les souris CD14^{-/-} infectées avec *E. coli* ont un dénombrement bactérien sanguin et pulmonaire inférieur à celui des souris de type sauvage [90]. Ceci suggère que ce récepteur a un rôle à jouer dans la dissémination bactérienne [85, 90].

Le CD14 joue plusieurs rôles chez le macrophage. En plus d'être le co-récepteur du LPS, il est requis pour la phagocytose des cellules apoptotiques [91]. Le CD14 reconnaît la phosphatidylsérine présente à la surface des cellules en apoptose [91]. Ce phospholipide, uniquement présent dans la partie intra-cytoplasmique des cellules normales, se retrouve exposé en surface chez les cellules apoptotiques. Par contre, les réponses engendrées lors de la destruction des cellules apoptotiques sont bien différentes des réponses observées lors de la liaison du LPS à ce récepteur. En effet, la phagocytose des cellules apoptotiques ne mène pas à une réponse pro-inflammatoire. Certains suggèrent même que la phagocytose de cellules apoptotiques mène à une réponse anti-inflammatoire [92].

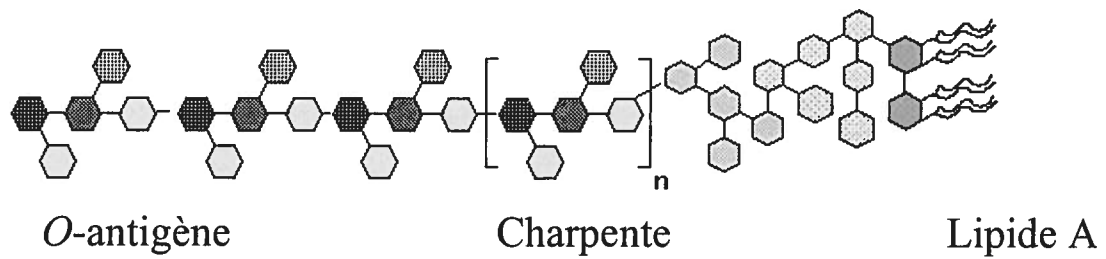


Figure B : Schéma de la structure générale du LPS. Cette structure peut changer selon les différents sérotypes due aux variations du *O*-antigène. À noter que la toxicité même est conférée par le Lipide A et cette partie doit être accessible au CD14 afin d'être active.

Depuis l'identification du CD14 comme étant le récepteur du LPS [93], quelques indices indiquaient que ce récepteur n'était pas le seul impliqué dans la réponse au LPS. Premièrement, puisque cette molécule est ancrée dans la membrane via un GPI, elle ne possède pas de queue cytoplasmique et ne peut donc pas transmettre de signaux à l'intérieur de la cellule. Deuxièmement, les souris résistantes à l'effet du LPS, soient les C3H/HeJ et les C57BL/10ScCr, expriment des niveaux normaux du CD14. Et finalement, les lymphocytes B, qui répondent au LPS, n'expriment pas du CD14 à leur surface [94, 95]. Ce co-récepteur a été récemment identifié comme étant le TLR4 [51, 52] (Section 2.1.3.).

2.1.3. TLR4

Il y a quelques années, deux groupes ont identifié le TLR4 comme étant le co-récepteur du LPS [51, 52]. Le groupe de Malo a démontré que le gène *Tlr4* est délété chez les souris C57BL/10ScCr [52]. Ils ont aussi démontré que chez les C3H/HeJ, le gène *Tlr4* contient une mutation ponctuelle, résultant en la substitution du résidu proline 712 pour un résidu histidine. Cet acide aminé est situé dans la portion cytoplasmique du TLR4, plus précisément dans le domaine TIR, empêchant toute interaction avec la molécule adaptatrice MyD88. Cette dernière est responsable en grande partie de la transmission de la signalisation intracellulaire. Finalement, des souris déficientes en TLR4 ont été générées [96]. Ces souris avaient le même phénotype que les souris C57BL/10ScCr et C3H/HeJ : les macrophages et les cellules B ne répondaient pas au LPS. Ces travaux ont permis de démontrer le rôle essentiel du TLR4 dans la réponse au LPS.

Une autre molécule associée physiquement au TLR4, MD-2, a récemment été identifiée comme étant impliquée dans la cascade de signalisation engendrée par le LPS. Contrairement au CD14 ou au TLR4, cette molécule n'est pas essentielle à la signalisation mais augmenterait l'affinité du TLR4 pour le LPS. De plus, MD-2 semblerait amplifier l'expression membranaire du TLR4 [97]. Les mécanismes exacts de reconnaissance du LPS par les macrophages restent encore à déterminer, mais le consensus actuel est que le LBP transfère au CD14 des monomères de LPS, recrute le

complexe TLR4/MD2 et mène à la formation du complexe LPS/CD14/TLR4/MD2-TLR4/MD2.

2.1.3.1. Signalisation via le complexe CD14/TLR4/MD-2

Une fois que le complexe CD14/TLR4/MD-2 est formé, une cascade d'événements de signalisation est enclenchée. Depuis quelques années, plusieurs groupes ont identifié des nouveaux intermédiaires dans la cascade induite par le LPS (fig. C).

La première molécule recrutée par le TLR4 est MyD88. Cette molécule adaptatrice a d'abord été identifiée comme étant une molécule de différenciation myéloïde d'un poids de 33 kDa [98]. Plus tard, il a été déterminé que cette protéine, ainsi que toutes les membres de la famille des TLR, appartenaient à la superfamille des Toll/récepteur IL-1 (TIR) [99]. L'appartenance à cette famille est basée sur la présence d'un domaine d'homologie au domaine TIR présent dans la partie cytoplasmique des récepteurs Toll de la drosophile, TLR, IL-1 et IL-18. MyD88 possède aussi un domaine de mort (Death Domain) qui lui permet d'interagir avec d'autres molécules de signalisation en aval, telle IRAK. Les macrophages provenant de souris déficientes en MyD88 ne répondent pas à l'IL-1 ni à l'IL-18 [100]. De plus, ces souris résistent aux effets du LPS et ne produisent pas de médiateurs inflammatoires en réponse au LPS [101]. Par contre, l'absence de production de cytokines en réponse au LPS n'est pas reliée au facteur de transcription NF- κ B ni aux MAPk JNK-1, p38 et ERK 1/2 puisque ces intermédiaires sont activés en réponse au LPS chez les macrophages dérivés de souris MyD88^{-/-} [101]. Il est à noter que l'activation des MAPk et du NF- κ B est retardée en comparaison aux macrophages provenant de souris sauvages. De plus, les réponses cellulaires dépendantes des autres TLR étaient abolies.

Ces résultats laissent présager que d'autres molécules adaptatrices, absentes sur les récepteurs d'IL-1, IL-18 et les autres TLR, sont responsables des réponses observées via le récepteur TLR4. Cette molécule fut identifiée et nommée TIRAP [102] ou MAL [103]. Cette molécule possède aussi un domaine TIR, lui permettant de s'associer avec TLR4

mais ne possède pas de domaine de mort. Le recrutement à TLR4 mène aussi à l'activation du NF- κ B via PKR et IRAK-2 [102]. Récemment, il a été révélé que TIRAP serait aussi impliqué dans la signalisation via TLR2. Tout comme les souris MyD88^{-/-}, l'activation du NF- κ B et des MAPk chez les macrophages dérivés des souris TIRAP^{-/-} est retardée [104, 105]. Une particularité de cette protéine est qu'elle semble être spécifiquement associée à TLR2 et TLR4.

Récemment, une autre molécule adaptatrice nommée Tollip a été identifiée, et est associée à TLR2 et TLR4 [106]. Cette molécule avait d'abord été identifiée comme étant liée au récepteur IL-1 et permettait de faire le lien entre IRAK et ce récepteur. Par contre, ses fonctions diffèrent largement des fonctions de TIRAP. Contrairement à TIRAP, Tollip serait un régulateur négatif des signaux engendrés via TLR2 et TLR4 en empêchant l'autophosphorylation d'IRAK [107]. Cette molécule servirait donc à retourner la cellule à un niveau basal de manière à limiter la réponse inflammatoire, potentiellement dangereuse pour l'individu si laissée hors de contrôle.

Une des premières kinases à être recrutée et activée par le complexe TLR4/MyD88 est la protéine kinase IRAK-1. Cette kinase fait partie d'une famille qui compte 4 membres, soient IRAK-1, IRAK-2, IRAK-4 et IRAK-M [108]. Ces kinases sont exprimées de façon ubiquitaire sauf pour IRAK-M dont l'expression semble restreinte aux monocytes/macrophages [108]. IRAK-1 a d'abord été identifiée comme étant une protéine kinase associée au récepteur IL-1 [109]. Il a été par la suite démontré que cette kinase est impliquée dans la signalisation induite par les récepteurs TLR et IL-18 [89, 110]. Une fois activée par MyD88, IRAK-1 se dissocie du complexe, se lie et active la protéine kinase TRAF-6, menant, entre autres, à l'activation du NF- κ B, JNK et AP-1 [111]. Curieusement, les réponses à l'IL-1, IL-18 et au LPS des souris déficientes en IRAK-1 ne sont pas abolies [110, 112], laissant présager que d'autres membres de cette famille pourraient compenser pour l'absence d'IRAK-1. Des résultats récents démontrent qu'IRAK-4 agit en amont d'IRAK-1 et mène à son activation [113]. À l'inverse, IRAK-M régulerait négativement les voies de signalisation des TLR en empêchant la dissociation d'IRAK-4 et IRAK-1 de MyD88 [108]. De plus, des souris IRAK-M^{-/-}

démontrent une tolérance diminuée au choc endotoxique, confirmant que cette molécule régule négativement les réponses induites par le LPS.

2.2. Le syndrome du choc endotoxique

Tel que mentionné précédemment, le choc endotoxique est la cause d'environ 55000-150000 morts par année en Amérique du Nord. Dans la plupart des cas, les infections sont dues à des complications suite à une chirurgie. Même si l'agent causal est une bactérie à Gram négatif, les effets dévastateurs sont causés par l'hyperstimulation du système immunitaire, le tout étant centré sur les macrophages. Ces derniers, en réponse au LPS, vont sécréter une quantité importante de cytokines et de médiateurs inflammatoires tels le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12, les prostaglandines, le NO et le H₂O₂, ainsi que des chemokines [3]. La sécrétion de ces médiateurs aura pour effet d'attirer et activer d'autres cellules du système immunitaire, telles les lymphocytes T, B et les cellules NK. Le rôle essentiel que joue les macrophages dans cette cascade est évident [3], mais le rôle des autres cellules, particulièrement les cellules productrices d'IFN- γ , est tout aussi important dans cette pathologie. En effet, des souris déficientes en ICAM-1 [114] ou en IFN- γ [115] sont résistantes au choc endotoxique, ce qui démontre clairement que plusieurs cellules « accessoires » jouent un rôle crucial dans le choc endotoxique. Cette production aberrante de cytokines culmine en une baisse de pression artérielle due à une trop importante production de NO, à une coagulation intravasculaire disséminée causée par le Ca⁺⁺ relâché par les cellules lysées et finalement à l'arrêt du fonctionnement du foie, des reins et des poumons, entre autres, entraînant la mort dans les cas les plus sévères [2].

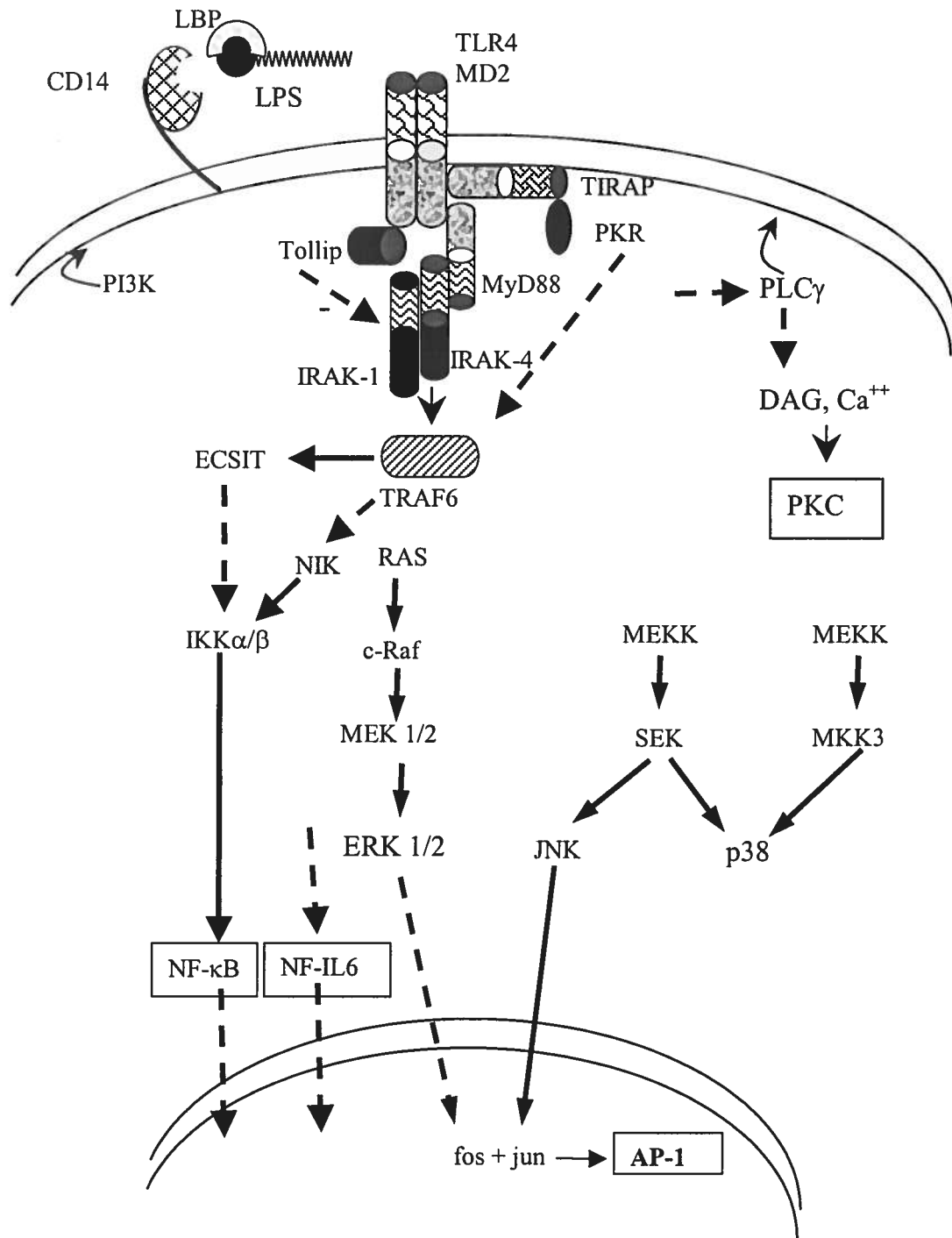


Figure C : Voies de signalisation induites par le LPS. Quelques voies activées lors de la liaison du LPS au complexe CD14/TLR4/MD2.

2.3. Les facteurs de transcription

La régulation des gènes induits en réponse au LPS est sous le contrôle de plusieurs facteurs de transcription. Nous avons entrepris d'étudier le rôle de la PKC- α dans l'activation du NF- κ B, NF-IL6 (C/EBP β) et AP-1 en raison de leur importance dans la réponse au LPS. En effet, la majorité des gènes de la réponse inflammatoire possèdent dans leur région promotrice des séquences de liaisons pour un ou plusieurs de ces facteurs de transcription [3].

2.3.1 NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B fait partie de la famille des protéines Rel, exprimées de façon constitutive chez tous les types cellulaires [116]. Ce facteur a été identifié pour la première fois en 1986 par le groupe de Baltimore, l'impliquant dans la production des chaînes kappa des immunoglobulines, d'où son nom «nuclear factor kappa B» [117]. C'est en fait le complexe p50/p65 qui avait été identifié, soit le dimère le plus exprimé dans tous les types cellulaires [118]. Les membres qui constituent cette famille chez les mammifères sont RELA (p65), c-REL, RELB, p105/p50 et p100/p52 [119]. Puisque chaque dimère joue un rôle particulier à l'intérieur d'une lignée cellulaire, il est important de spécifier la composition du dimère en question. Par exemple, le dimère p50/p65 [118] active la transcription tandis que certains rapportent que les homodimères p50/p50 et p52/p52 inhibent la transcription [120, 121]. Depuis la découverte par le groupe de Baltimore, cette famille de facteurs de transcription s'est révélée être impliquée dans la régulation de l'expression d'une quantité impressionnante de gènes tels que CMH-I, CMH-II, NK- κ B, I κ B, IL-1, IL-6, IL-12, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, iNOS, etc [122].

Peu après, le même groupe a identifié une protéine, I κ B, qui prévient la translocation nucléaire du NF- κ B en masquant sa séquence de localisation nucléaire [123]. Ces travaux ont démontré que la protéine inhibitrice était phosphorylée sur les résidus serine 32 et 36, ubiquitinée et dégradée via la voie des protéasomes [124] mais les mécanismes gouvernant son activation n'ont été élucidés que récemment [125, 126]. Une fois libérée

de son inhibiteur, la séquence de localisation nucléaire du NF- κ B est exposée, ce qui permet sa phosphorylation suivie par sa translocation nucléaire [119]. Les deux enzymes responsables de la phosphorylation d'I κ B, IKK α et IKK β , sont liées ensemble par la protéine structurale NEMO (ou IKK γ) [127]. Récemment, deux autres IKK ont été identifiées. Ces kinases, IKK ϵ et TBK (ou NAK), font partie d'un complexe distinct de celui formé par NEMO/IKK α /IKK β [128]. Leur rôle dans la signalisation induite par le LPS n'a pas encore été élucidé. Par contre, le rôle de IKK α et IKK β dans la signalisation induite par le LPS est bien connu. Alors que l'utilisation d'un dominant-négatif de IKK α n'avait aucun effet sur l'activité transcriptionnelle du NF- κ B, un dominant-négatif de IKK β diminuait de façon significative son activité transcriptionnelle en réponse au LPS [129].

Le rôle des PKC dans l'activation du NF- κ B a été démontré à plusieurs reprises à l'aide de différentes méthodes. En utilisant soit des inhibiteurs de la PKC, [130], des oligonucleotides anti-sens pour la PKC- ζ [131] ou PKC- α , β et δ [71] ou un dominant-négatif des PKC- $\lambda/1$ [132] et PKC- ζ [70], ces isoenzymes ont été impliqués dans la voie de signalisation menant à l'activation du NF- κ B, probablement en activant la IKK β [133]. Évidemment, la preuve formelle du rôle de la PKC- ζ dans l'activation du NF- κ B fut obtenue à l'aide des souris déficientes pour la PKC- ζ , tel que mentionné plus haut [80]. Par contre, lors de ses travaux avec le LPS, le groupe de Moscat a utilisé des fibroblastes embryonnaires. Donc le rôle exact de la PKC- ζ dans l'activation du NF- κ B en réponse au LPS chez les macrophages est à déterminer.

Chez la souris, plusieurs intermédiaires impliqués dans l'activation du NF- κ B ont été éliminés par recombinaison homologue. La première souris de ce genre fût générée par le groupe de Baltimore. Son équipe a pu démontrer que la sous-unité p65 est indispensable puisque les embryons mouraient au 16^e jour de gestation en raison de l'apoptose des cellules hépatiques [134]. Par opposition, les souris déficientes en la p50 semblaient en bonne santé et n'avaient que quelques problèmes immunitaires [135]. Ce groupe a noté une susceptibilité accrue aux infections bactériennes due à une faible production

d'anticorps mais une résistance accrue aux infections virales. Une production anormalement élevée d'IFN- β par les fibroblastes en réponse au virus était responsable de la résistance augmentée [135]. Ces résultats suggèrent donc que certains membres de la famille NF- κ B ont des fonctions redondantes tandis que d'autres ont des rôles distincts et uniques.

2.3.2. AP-1

Le facteur de transcription AP-1 est constitué d'homodimères de la famille *jun* ou d'hétérodimères de membres de la famille *jun* et *fos*. Il est à noter que les hétérodimères forment des complexes plus stables [136]. On compte trois membres connus dans la famille *jun*, soit *c-jun*, *jun-b* et *jun-d* et cinq membres dans la famille de *fos*, soit *c-fos*, *FRA-1*, *FRA-2*, *fosB* et *fosB2*, donnant 21 dimères possibles [136]. Contrairement au facteur NF- κ B, les protéines qui constituent AP-1 sont phosphorylées au noyau [137]. Divers stimuli tels le LPS ou des cytokines induisent l'activation des MAPk SAPK/JNK et ERK 1/2. SAPK/JNK phosphoryle *c-jun* sur les résidus sérine 73 et 63, permettant la dimérisation de cette sous-unité. Parallèlement à cette voie, ERK 1/2 est aussi activée et mène à l'activation de ELK-1 qui est responsable de la phosphorylation de *c-fos*. Lorsque les deux sous-unités sont phosphorylées, elles se dimérisent. Le facteur nouvellement formé peut induire la transcription de plusieurs gènes tels que TNF- α , IL-1 α et IL-6 [3, 138, 139].

Tout comme pour la famille du NF- κ B, plusieurs souris déficientes pour des membres des familles *fos* et *jun* ont été générées. Des souris déficientes pour *c-fos* ont permis de déterminer que cette sous-unité n'est pas essentielle à la survie ni à la prolifération cellulaire *in utero*. Les souris ont un poids normal à la naissance, mais présentent un retard dans leur développement et souffrent d'ostéoporose sévère [140]. Les souris déficientes en *fos-B* sont généralement normales, mais démontrent des déficiences au niveau de l'hypothalamus et sont incapables d'élever et de s'occuper de leur portée [141]. Ces résultats suggèrent que les autres membres de la famille Fos puissent compenser pour l'absence de l'un des membres. Contrairement aux membres de la famille de *fos*, la

déficiences en *c-jun* est létale au 12-14^e jour de gestation [142, 143]. Ceci démontre que *c-jun* joue un rôle essentiel dans l'embryogenèse et qu'aucun autre membre de cette famille ne peut compenser pour son absence.

2.3.3. NF-IL6

NF-IL-6, ou C/EBP β , fut identifié pour la première fois comme étant un facteur se liant à la séquence de réponse à l'IL-1 dans le promoteur du gène *IL-6* [144]. Plus tard, il a été révélé que le C/EBP β fait partie de la famille des CCAAT/enhancer Binding Protein (C/EBP), qui est comprise dans la super famille des « Leucine Zipper » [145, 146]. La famille du C/EBP compte 6 membres, soit C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ , C/EBP ϵ et C/EBP ζ . Leur expression et distribution tissulaire varient énormément. Par exemple, les C/EBP γ et C/EBP ζ sont distribuées de façon ubiquitaire, tandis que l'expression du C/EBP ϵ est restreinte aux cellules hématopoïétiques [147].

Plusieurs études ont permis de démontrer que l'expression d'un nombre important de gènes de la réponse inflammatoire est régulée par le C/EBP β [3]. Par contre, malgré ce nombre important de gènes, les souris déficientes en C/EBP β présentent peu de défauts immunitaires outre le fait que les macrophages issus de ces souris sont incapables d'éliminer certains pathogènes et des cellules tumorales [148, 149]. Les souris C/EBP $\beta^{-/-}$ générées par le groupe de Poli [148] ont un syndrome similaire à la maladie de Castleman, soit une surexpression d'IL-6, une splénomégalie, une lymphoadénopathie et une hématopoïèse accrue. L'expression de C/EBP α , un autre membre de la même famille, est élevée et constitutive chez les embryons. L'expression de ce facteur diminue normalement après la naissance. Mais, chez les souris déficientes en C/EBP β , l'expression de C/EBP α ne diminue pas. L'expression anormalement élevée de C/EBP α des souris C/EBP $\beta^{-/-}$ pourrait expliquer les symptômes observés chez ces animaux.

La raison pour laquelle les macrophages provenant de souris C/EBP $\beta^{-/-}$ sont incapables d'éliminer certains pathogènes intracellulaires a récemment été élucidée. En réponse à

certain pathogènes ou au LPS, les macrophages péritonéaux provenant de ces souris expriment peu ou pas de G-CSF [150]. L'ajout de G-CSF exogène permet de rétablir le pouvoir microbicide de ces macrophages. Depuis cette publication, de nombreux groupes ont entrepris d'expliquer la régulation de transcription d'une variété de gènes et ont pu constater qu'en fait plusieurs gènes requièrent le C/EBP β pour leur expression. Notamment, un rôle essentiel pour ce facteur a été démontré au niveau de la régulation de l'expression de COX-2 [151], de l'IL-12p35 [152], d'iNOS [153] et de l'IL-1 β [154] en réponse au LPS.

3.0 Leishmania

3.1. Leishmaniose

Le parasite protozoaire *Leishmania* fait partie de la famille des Trypanosomatidae [155]. Chez l'humain, ce parasite est l'agent causal de la leishmaniose, une maladie touchant entre 1,5 et 2 millions de personnes annuellement à travers le monde, plus particulièrement en Amérique du Sud, au sud de l'Europe, en Inde, au Moyen-Orient et en Afrique [156]. On peut distinguer 3 types de leishmaniose, soient la forme cutanée, muco-cutanée et viscérale. La forme cutanée, causée par *L. major*, *L. tropicana* et *L. mexicana*, est caractérisée par des ulcères cutanés apparaissant sur le corps et sont habituellement sans conséquence grave chez l'hôte dont le système immunitaire est normal. Une forme apparentée est la leishmaniose muco-cutanée, causée par *L. braziliensis braziliensis*. Ce parasite a une affinité particulière pour les macrophages résidents des muqueuses oro-nasales et y cause des ulcères qui, non traités, peuvent mener à des lésions plus graves. Et finalement, la forme la plus sévère est la leishmaniose viscérale causée par *L. donovani* et *L. chagasi*. Les organes cibles sont le foie, la rate et les monocytes/macrophages de la moelle osseuse. Si non traitée, cette infection peut être fatale [157, 158].

L'épidémie de VIH en Afrique rend la population encore plus à risque et les co-infections VIH/*Leishmania* augmentent sans cesse [159]. Les difficultés reliées à l'élimination de cette maladie sont multiples. Premièrement, parmi les 88 pays où la leishmaniose est endémique, 72 sont en voie de développement et n'ont pas de programme de dépistage ou de traitement. Deuxièmement, de plus en plus de parasites sont résistants aux traitements, qui consistent essentiellement de métaux lourds comme l'antimoine. De plus, plusieurs mammifères autres que l'homme sont aussi infectés par ce parasite, créant un important réservoir animal et compliquant l'éradication des parasites et des maladies qu'ils causent. Finalement, aucun vaccin efficace contre l'infection n'est encore disponible [160].

3.2. Cycle de vie

Le parasite *Leishmania* a un cycle de vie biphasique. En plus d'un hôte mammifère, une partie de son cycle de vie se déroule dans les mouches de sable du genre *Phlebotomus*, dans l'Ancien monde, ou du genre *Lutzomia* en Amérique [161]. Chez l'insecte, qui vit à une température ambiante d'environ 26°C, le parasite existe sous sa forme promastigote. Sous cette forme, il est flagellé et motile et a une morphologie allongée. Il réside dans la partie médiane de l'estomac de la mouche, qui est normalement d'un pH neutre ou basique. C'est à cet endroit que la métacyclogénèse se produit. Essentiellement, cette étape permet au parasite d'augmenter le nombre de copies ainsi que le nombre d'unités répétitives du LPG, le glycoconjugué de surface le plus abondant chez la forme promastigote (section 3.3.2.) [162, 163]. Les promastigotes métacycliques migrent vers les glandes salivaires de l'insecte femelle, et lors d'un repas sanguin seront inoculés dans l'hôte mammifère.

Certaines composantes de la salive de la mouche de sable ont des effets immunomodulateurs et favorisent l'établissement de l'infection chez l'hôte mammifère (section 3.4) [164]. Dès son entrée, le parasite sera ingéré par des macrophages et se multipliera dorénavant à l'intérieur d'un phagolysosome. Les changements de température et de pH constituent les principaux signaux de différenciation de la forme promastigote en forme amastigote. Ainsi, chez l'hôte mammifère, le parasite se multiplie sous la forme amastigote, qui est caractérisée par une morphologie arrondie et un flagelle atrophié, et exprime très peu ou pas de LPG [155, 165]. La forme amastigote est parfaitement adaptée à l'environnement hostile du phagosome. Des cellules infectées ou des amastigotes libérés des macrophages infectés seront ingérés lors d'un repas sanguin d'une mouche non infectée. Cette fois-ci, le processus est inversé. L'amastigote se différenciera en promastigote grâce encore une fois aux changements de température et pH et le cycle recommencera à nouveau.

3.3. Les glycoconjugués de Leishmania

3.3.1. GP63

GP63, ou leishmaniolysine, est une métalloprotéase Zn-dépendante de 63 kDa exprimée à la surface du parasite. C'est la protéine de surface la plus abondante (500000 copies) et elle est ancrée dans la membrane plasmique via un GPI [166]. Gp63 est codée par une famille de plusieurs gènes organisés en tandem dont l'expression varie avec le stade de différenciation du parasite. Le nombre de gènes varie selon l'espèce, allant de 7 chez *L. major* à 15 chez *L. mexicana* [167]. Plusieurs groupes ont postulé que cette molécule pourrait interagir avec des récepteurs comme par exemple Mac-1 (CD11b-CD18, CR3) ou le récepteur de la fibronectine. Jusqu'à présent, aucune preuve formelle à cet effet n'a pu être établie. Il a par contre été clairement démontré que cette molécule interagit avec le complément, particulièrement dans la conversion de C3b en C3bi, favorisant donc l'entrée du parasite via CR3 [168]. Récemment, une souche de *L. major* déficiente pour les 7 gènes de GP63 a été générée [167]. Les parasites se développent normalement à l'intérieur de l'insecte. Par contre, chez la souris, les parasites déficients en GP63 démontrent une susceptibilité accrue à la lyse médiée par le complément. De plus, chez la souris génétiquement susceptible, le temps d'apparition des lésions est retardé. Cette molécule jouerait donc un rôle dans la survie du parasite lors de l'infection en permettant d'éviter la lyse médiée par le complément mais ne semble pas affecter sa survie chez l'insecte.

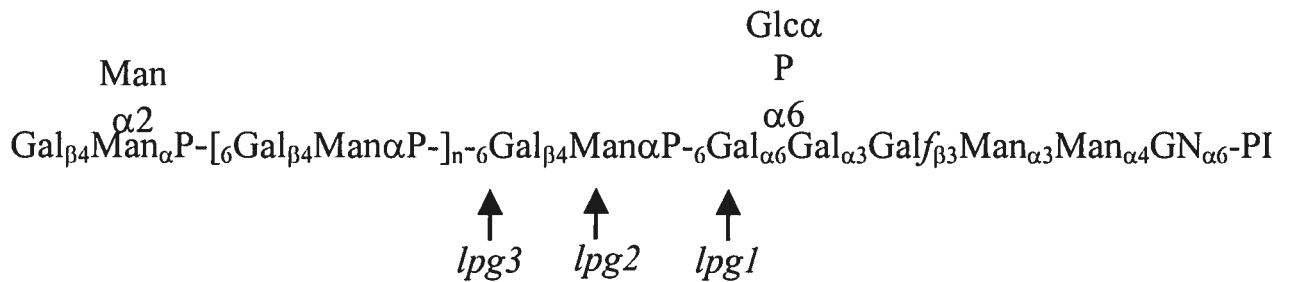
3.3.2. LPG

3.3.2.1 Biosynthèse du LPG

Le LPG est la molécule de surface la plus abondante chez la forme promastigote de *Leishmania*. Il est estimé qu'il y a environ $1 \text{ à } 5 \times 10^6$ copies exprimées à la surface du parasite [169]. Cette molécule est constituée de quatre domaines : 1) une ancre lipidique phosphatidylinositol (1-*O*-alkyl-2-lyso-phosphatidylinositol), 2) une charpente de

polysaccharides, 3) un squelette constitué de 15 à 30 unités répétées de phosphodisaccharides (6Gal(β 1-4)Man α 1)-PO₄ et 4) une coiffe d'oligosaccharides [157, 162] (figure D). Cette structure de base est retrouvée chez toutes les espèces de *Leishmania*. Par contre, certaines espèces de *Leishmania*, tels que *L. mexicana* et *L. major*, ont des chaînes latérales glucidiques sur leur squelette phosphodisaccharidiques. Ces résidus glucidiques peuvent être simples ou très complexes [162]. Le rôle exact des chaînes latérales n'est pas encore déterminé, mais il est possible qu'elles jouent un rôle dans l'ancrage à l'épithélium gastrique de la mouche [156]. Il est à noter que *L. donovani* ne possède pas de chaînes latérales glucidiques.

La biosynthèse de cette molécule impliquerait au moins 25 gènes [170]. Jusqu'à présent, seulement 4 gènes ont été identifiés et 3 d'entre eux ont été caractérisés. Ces gènes sont *LPG1*, *LPG2*, *LPG3* et *LPG4a*. Le gène *LPG1* code pour une glycosyltransférase qui est responsable de l'addition de résidus galactosylfuranose présents dans la charpente hexasaccharidique du LPG. Les promastigotes dont le gène *LPG1* a été éliminé n'expriment pas de LPG à leur surface, ont une charpente tronquée, mais les molécules sécrétées contenant des PG, telles que les acides phosphatases ou les PPG, sont intactes [171]. Le gène *LPG2* code pour une protéine membranaire qui participe au transport de GDP-mannose du cytosol à l'appareil de Golgi, permettant ainsi l'addition d'unités répétitives de mannose-PO₄ (6Gal (β 1-4) Man α 1) et donc l'élongation du LPG. Les promastigotes déficients en *LPG2* ont donc une charpente d'hexasaccharides complète, mais n'expriment pas de LPG à leur surface. De plus, ces mutants sécrètent des glycoconjugués qui ne possèdent pas d'unités répétitives [172]. Le gène *LPG3* code pour une protéine homologue à GRP94, une chaperone localisée dans le reticulum endoplasmique des cellules de mammifères. La fonction exacte reste encore à déterminer mais il est probable que la protéine encodée par le gène *LPG3* a pour fonction de contribuer au repliement d'une glycosyltransférase. Les promastigotes *LPG3*^{-/-} synthétisent un LPG tronqué qui ne contient que le résidu Man α 1-PO₄ de la première unité répétitive et n'expriment pas de PPG [173]. Finalement, le gène *LPG4a* permet l'addition de la seconde unité répétitive sur le LPG [174].



Tirée de Prive and Descoteaux, 2000

Figure D : Schéma de la structure générale du LPG de *L. donovani*. D'une espèce de *Leishmania* à l'autre, ce sont surtout les résidus des chaînes latérales qui varient. La délétion des gènes *LPG1*, *LPG2* et *LPG3* mène à l'expression d'un LPG tronqué à l'endroit indiqué par les flèches.

3.3.2.2 Rôle du LPG chez l'insecte

Une des étapes du cycle de vie de *Leishmania* se passe chez la mouche de sable. Evidemment, le parasite doit survivre à la digestion du repas sanguin et donc aux enzymes hydrolytiques produits par la mouche. De plus, le parasite doit éviter d'être excrété avec les déchets du repas sanguin. Le LPG et le flagelle sont essentiels pour cette étape du cycle de vie du parasite. Les polymorphismes structuraux du LPG des différentes espèces expliquent en partie leur tropisme pour des espèces de mouches de sables particulières [175]. De 18 à 32 heures après l'ingestion d'un repas sanguin, des protéases sont libérées dans l'intestin de la mouche [161]. Certains glycoconjugués, notamment le LPG, les phosphatases acides et des PPG sécrétés, peuvent inhiber ces enzymes potentiellement néfastes pour le parasite. Afin d'éviter d'être excrété en même temps que le reste du repas sanguin digéré, le parasite s'attache entre les microvillosités de l'épithélium gastrique de la mouche grâce à son flagelle qui est, comme le reste du parasite, recouvert de LPG [161]. Les promastigotes qui sont déficients en LPG ne peuvent pas s'attacher et ne survivent pas plus de 5 jours dans la mouche, démontrant donc le rôle essentiel que joue le LPG dans la survie du parasite dans la mouche. Lorsque le parasite a atteint le stade métacyclique, la composition et la structure du LPG changent et ne permettent plus au parasite de se fixer aux microvillosités [176]. Ceci amène le promastigote à migrer vers les glandes salivaires de la mouche, où il sera excrété en même temps que la salive de la mouche, juste avant le repas sanguin [164].

3.4. Entrée du parasite dans les macrophages

L'infection par *Leishmania* implique tous les joueurs i.e. la mouche, le parasite et le mammifère. Tout d'abord, comme tous les insectes piqueurs qui se nourrissent de sang, la mouche de sable produit des substances anti-inflammatoires, tels que des inhibiteurs d'iNOS [177] et anti-coagulantes [178]. En plus de faciliter le repas sanguin de la mouche, ces substances favorisent l'entrée du parasite chez le mammifère. En effet, la co-injection de salive de la mouche de sable et des parasites va mener à une augmentation de taille de la lésion ou à un nombre plus élevé de parasites chez l'hôte [161]. De plus, la

co-injection de salive et de promastigotes de *L. major* entraîne la formation de lésions chez des souris génétiquement résistantes à l'infection et à une augmentation des cytokines Th2 [179]. À l'inverse, l'immunisation de souris naïves avec la salive de mouche confère une résistance à l'infection contre *Leishmania*. La salive de la mouche de sable joue donc un rôle essentiel dans la transmission de *Leishmania*. Certaines études suggèrent que le vaccin 'idéal' serait fait d'une combinaison d'antigènes du parasite et du vecteur [180].

Plusieurs récepteurs du macrophage ont le potentiel de contribuer à l'entrée du promastigote de *Leishmania* dans le macrophage. Parmi ceux-ci sont, le CR1 (CD35), le CR3 (CD11b-CD18), le CR4 (CD11c-CD18, GP150/95) ainsi que le récepteur du mannose. Par contre, les récepteurs les plus susceptibles de permettre l'entrée du promastigote de *L. donovani* sont le CR3 et CR1. Grâce au LPG et GP63, les promastigotes du genre *Leishmania* peuvent résister à la lyse médiée par le complément en bloquant l'activation de la cascade du complément. De plus, la GP63 participe à la conversion du C3b en C3bi, permettant ainsi aux promastigotes opsonisés d'être phagocytés via le CR3 [168]. Il est clair qu'il est avantageux pour un microorganisme d'être phagocyté via un récepteur du complément puisque la phagocytose via le CR3 ne mènera pas à la flambée respiratoire ni à la production de NO (section 1.1.3), un médiateur indispensable à l'élimination des parasites [181, 182]. En fait, l'IL-10, produite en réponse à la phagocytose via le CR3 mènera plutôt à l'inhibition de la réponse inflammatoire.

3.4.1. Effet sur les voies de signalisation

Une fois le parasite internalisé, plusieurs mécanismes sont mis en branle afin d'assurer sa survie et, parmi ceux-ci, le LPG joue un rôle important. Il a déjà été démontré que l'infection avec *L. donovani* inhibe l'activation des PKC [9, 183] et que le LPG est probablement responsable de cette inhibition [165]. L'expression de *c-fos*, composante du facteur de transcription AP-1 (section 2.3.2), est aussi inhibée en réponse au LPS et au DAG chez des macrophages infectés avec *L. donovani* [165, 183, 184]. Récemment, une

étude menée par le groupe de Matlashewski [185] a démontré que l'expression de plusieurs dizaines de gènes est modulée en réponse à l'infection par les amastigotes de *L. donovani*. Parmi ceux-ci sont certains membres de la famille Rel, composantes du facteur de transcription NF- κ B qui régule, entre autres, l'expression de TNF- α , CMH I, CMH II, I κ B ainsi que l'expression des protéines Rel. Ces travaux démontrent que *Leishmania* interfère avec l'expression d'au moins deux facteurs de transcription essentiels à la réponse immunitaire, soit AP-1 et NF- κ B.

Au laboratoire, nous avons récemment établi que l'entrée de promastigotes de *L. donovani* de type sauvage n'entraîne l'activation d'aucune des 3 voies des MAPk, mais que l'infection avec des promastigotes LPG2^{-/-} est accompagnée d'une activation de la voie de ERK1/2 [10]. Ces résultats démontrent un nouveau rôle pour le LPG, soit l'évasion de l'activation de la MAPk ERK1/2, intermédiaire essentiel dans la réponse immunitaire et inflammatoire. L'infection par *Leishmania* affecte aussi la cascade de signalisation induite par l'IFN- γ . Les molécules de signalisation JAK1, JAK2 et STAT1, qui sont normalement activées en réponse à l'IFN- γ , sont hypophosphorylées bloquant l'effet activateur de l'IFN- γ sur le macrophage [186]. De plus, certaines études suggèrent qu'une phosphatase de l'hôte, la SHP-1, est activée en réponse à l'infection par *L. donovani* [187, 188]. Donc, en plus de bloquer l'action de cytokines qui ont comme effet d'activer le macrophage, *Leishmania* active une phosphatase dont le rôle consiste à désactiver le macrophage. Le parasite *Leishmania* affecte donc plusieurs voies de signalisation, contribuant ainsi à sa survie chez l'hôte mammifère.

3.4.2. Effet sur la réponse inflammatoire

Une fois infectés par *L. donovani*, la physiologie des macrophages change considérablement. Qu'il n'y ait pas de production d'IL-12 en réponse à l'infection est conséquent si l'on considère l'entrée silencieuse de ce parasite. En effet, lors d'infections de souris génétiquement susceptibles ou résistantes avec des promastigotes de *L. major*, les lymphocytes T CD4⁺ produisent de l'IL-4, IL-10 et IL-13, cytokines représentatives d'une réponse Th2, soit une réponse qui ne permettra pas d'éliminer le parasite [189].

Par contre, à 14 jours post-infection, les niveaux d'IL-4 étaient presque indétectables chez les souris génétiquement résistantes tandis que les niveaux restaient élevés chez les souris génétiquement susceptibles. De plus, des macrophages de moelle osseuse provenant de souris génétiquement résistantes ou susceptibles infectées avec *L. donovani* ou *L. major* ne produisent pas d'IL-12 en réponse au LPS ou à l'IFN- γ [190].

Les macrophages infectés produisent des quantités importantes de TGF- β . Cette cytokine est un puissant immunosuppresseur. Un des nombreux effets de cette cytokine sur les lymphocytes T est l'inhibition de l'expression de la chaîne β du récepteur de l'IL-12 [164]. Donc, les lymphocytes T recrutés au site d'infection ne pourront pas répondre à l'IL-12 et conséquemment ne produiront pas d'IFN- γ en réponse à l'infection par *Leishmania* [191].

Il est connu depuis longtemps qu'iNOS est l'effecteur principal dans l'élimination de *Leishmania* [182, 192]. Proudfoot et collaborateurs ont démontré qu'une pré-exposition des macrophages au LPG de *L. major* inhibe l'expression d'iNOS et la sécrétion de NO en réponse à l'IFN- γ . Par contre, si les cellules étaient pré-stimulées à l'IFN- γ avant d'être infectées ou exposées au LPG, il y avait un effet synergique sur la production de NO [193]. Ceci suggère donc que la présence d'IFN- γ au moment de l'infection de l'hôte puisse permettre à l'hôte de produire des quantités importantes de NO et de détruire le parasite. En accord avec ces résultats, nous avons démontré au laboratoire que l'infection de cellules préstimulées à l'IFN- γ avec des promastigotes de *L. donovani* qui n'expriment pas de LPG (LPG2^{-/-}) mène à une production de NO inférieure que celle observée lors d'infections avec des *L. donovani* de type sauvage [10].

3.4.3. Effet sur la phagocytose

Afin de pouvoir atteindre leur stade de maturation final, les phagosomes procèdent par trois phases, soient le phagosome précoce, tardif et le phagolysosome. Le dernier stade résulte de l'interaction entre les phagosomes et les endosomes lysosomaux. Il est possible d'identifier le stade de maturation en analysant les différents marqueurs associés aux phagosomes [194]. Il a été démontré que le LPG de *L. donovani* bloque la maturation du

phagosome en s'intercalant dans sa membrane, empêchant donc la fusion avec les organelles endocytaires [195]. En effet, lorsque des macrophages sont infectés avec des promastigotes de *L. donovani* de type sauvage, la fusion entre les phagosomes et les endosomes est bloquée [196]. Ce phénomène n'est pas observé lors de l'infection avec des promastigotes LPG^{-/-}. De plus, il a été observé que la présence du LPG de *L. donovani* à la surface des phagosomes du macrophage cause une accumulation périphagosomale de F-actine, créant ainsi une barrière physique protectrice autour du phagosome [197]. Donc, le LPG pourrait bloquer de manière transitoire le processus de maturation du phagosome, permettant ainsi au promastigote de se différencier en amastigote.

Un point intéressant de noter: alors que les promastigotes LPG^{-/-} sont rapidement éliminés, il n'en est pas de même pour les amastigotes LPG^{-/-} différenciés *in vitro*. En effet, l'infection avec ces amastigotes a des conséquences identiques qu'avec des amastigotes de type sauvage [198]. Ceci démontre donc que le LPG est essentiel pour la survie du promastigote chez le mammifère, mais pas pour l'amastigote.

Comme vous l'avez constaté avec la section précédente, nous avons considérablement d'informations sur la régulation des fonctions du macrophage. Par contre, il reste encore beaucoup à découvrir en ce qui a trait à la régulation des fonctions du macrophage dans un contexte hôte-pathogène. Nous nous sommes concentrés sur deux types de pathogènes qui ont des effets divergents sur le macrophage: les bactéries à Gram négatif, qui stimulent le macrophage à outrance et le parasite *L. donovani*, qui infecte le macrophage sans l'activer.

Des résultats précédents obtenus dans notre laboratoire ont permis de montrer que la PKC- α régule l'expression de divers gènes en réponse au LPS, notamment IL-1 α , iNOS et COX-2 mais que cet isoenzyme n'est pas impliqué dans l'activité des MAPk ni dans l'activation du facteur de transcription NF- κ B [4, 5, 72]. L'objectif principal de cette partie de mes travaux de doctorat était de déterminer si l'activation d'un (ou des) facteur(s) de transcription, régulant l'expression de l'IL-1 α et de iNOS, est (sont) sous le contrôle de la PKC- α .

Dans le deuxième volet de mon doctorat, nous voulions approfondir nos connaissances quant au rôle du LPG du parasite *L. donovani* sur la régulation de l'activité du macrophage. Nous avons précédemment démontré que la présence du LPG à la surface de *L. donovani* est essentielle à l'évasion de l'activité de ERK1/2 chez le macrophage murin [10, 197]. L'objectif de cette partie était d'identifier quelle(s) autre(s) voie(s) est (sont) affectée(s) par la présence du LPG lors d'infection de macrophages naïfs et pré-stimulés à l'IFN- γ .

Les résultats obtenus lors de mes travaux de doctorat sont présentés sous forme d'articles. La section qui suit est divisée en deux chapitres. Le premier comprend deux articles publiés traitant du rôle de la PKC- α dans les réponses induites par le LPS. Le deuxième chapitre est constitué des travaux sur le parasite *Leishmania donovani*. Le manuscrit n'a pas encore été soumis pour publication.

PREMIER CHAPITRE

RÉSUMÉ DE LA PREMIÈRE PUBLICATION

Le lipopolysaccharide, qui est un puissant activateur des macrophages, se lie au CD14 et enclenche une cascade d'événements, incluant l'activation de plusieurs protéines kinases, culminant par la production d'une variété de molécules immunomodulatrices, tel que le NO, ainsi qu'à la production de cytokines proinflammatoires. Dans cette étude, nous avons examiné le rôle de l'isoenzyme α de la famille des protéines kinases C (PKC) dans la réponse au LPS chez le macrophage. À cette fin, nous avons surexprimé de façon stable une forme dominante-négative de la PKC- α (DN PKC- α) dans la lignée de macrophages murins RAW 264.7. Les clones surexprimant la forme DN PKC- α ne démontraient aucune différence au niveau morphologique ni dans la croissance cellulaire. Par contre, la surexpression du DN PKC- α a causé une forte diminution de production d'ARNm d'IL-1 α en réponse au LPS et, à un degré moindre, des diminutions dans la production d'ARNm d'iNOS et de TNF- α . La surexpression DN PKC- α ne rendait pas le macrophage insensible au LPS puisque la production de MMP-9, en réponse au LPS, était augmentée. De plus, la phosphorylation induite par le LPS d'I κ B, ainsi que la translocation nucléaire du NF- κ B, la phosphorylation de p38 et JNK était normale dans les clones DN PKC- α . Pris dans leur ensemble, ces résultats démontrent que la PKC- α régule certaines fonctions induites par le LPS chez le macrophage.

Contribution des Auteurs :

Anik St-Denis : La majorité du travail effectué et aide à la rédaction ;

Frédéric Chano : Résultats relatifs aux EMSA ;

Pierre Tremblay : Résultats relatifs à MMP-9 ;

Yves St-Pierre : Directeur de P. Tremblay, ;

Albert Descoteaux : Directeur de A. St-Denis et F. Chano, majorité de la rédaction

PREMIÈRE PUBLICATION

M8-0540R
September 17, 1998

**Protein kinase C- α modulates lipopolysaccharide-induced functions in a
murine macrophage cell line***

**Anik St-Denis, Frédéric Chano, Pierre Tremblay, Yves St-Pierre,
and Albert Descoteaux[¶]**

From the Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada,
H7V 1B7

[¶]To whom correspondence should be addressed: Institut Armand-Frappier, Université du
Québec, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7.

Tel.: 514-687-5010 ext. 4465; Fax: 514-686-5501;

E-mail: albert_descoteaux@iaf.quebec.ca

Running title Protein kinase C- α and LPS-induced macrophage functions

SUMMARY

Lipopolysaccharide (LPS), a potent modulator of macrophage functional activity, binds to CD14 and triggers the activation of several protein kinases, leading to the secretion of variety of immunomodulatory molecules such as nitric oxide and proinflammatory cytokines. In this study, we have examined the role of the α isoenzyme of protein kinase C (PKC) in the regulation of LPS-initiated signal transduction in macrophages. To this end, we have stably overexpressed a dominant-negative (DN) version of PKC- α (DN PKC- α) in the murine macrophage cell line RAW 264.7. Clones overexpressing DN PKC- α were indistinguishable from the parental line with respect to morphology and growth characteristics. At the functional level, DN PKC- α overexpression strongly inhibited LPS-induced IL-1 α mRNA accumulation, and to a lesser extent iNOS and TNF- α expression. DN PKC- α overexpression did not cause a general unresponsiveness to LPS, as secretion of the matrix metalloproteinase MMP-9 was up-regulated in our DN PKC- α -overexpressing clones. Moreover, LPS-induced phosphorylation and degradation of I κ B α , NF- κ B activation, as well as p38 MAP kinase and Jun N-terminal kinase phosphorylation were not affected by DN PKC- α overexpression. Collectively, these data provide evidence that PKC- α regulates selective LPS-induced macrophage functions involved in host defence and in inflammation.

INTRODUCTION

Mononuclear phagocytes are multipotential cells that can be modulated to perform a variety of functions including secretion of nitric oxide (NO)¹ and proinflammatory cytokines, which are important mediators in host defence and in inflammation. In this regards, LPS, a major component of the cell wall of Gram-negative bacteria, is one of the most potent and best characterized modulator of macrophage function. Binding of LPS to the cell surface CD14 molecule triggers multiple intracellular biochemical cascades, including the phosphorylation of several proteins by either tyrosine or serine/threonine kinases (1-3). Although the identity of the protein tyrosine kinases (PTK) that mediate LPS-initiated signal transduction remains to be determined with certainty (4, 5), studies with pharmacological inhibitors revealed that their activity is essential for the expression of LPS-induced macrophage functions (3, 6-9). In addition to PTK, exposure of macrophages to LPS activates protein kinase C (PKC) (9-16), and experiments using various PKC inhibitors indicated that PKC activity is required for the expression of several macrophage functions, including TNF- α and IL-1 secretion, NO production, and tumoricidal activity (9, 13, 17, 18).

PKC was first characterized as a Ca²⁺-dependent and phospholipid-dependent serine/threonine kinase that requires diacylglycerol for activity (19). Subsequently, it has been established that PKC is not a single entity, but rather a family of closely related isoenzymes comprising at least 12 different members (20). Differences in their structure, requirement for activity, subcellular localization, and substrate specificity suggest that in a given cell, the various PKC isoenzymes may exert specific functions (20, 21). Macrophages and monocytic cells express the Ca²⁺-dependent isoenzymes α , β I, and β II, the Ca²⁺-independent isoenzymes δ and ϵ , and the atypical isoenzyme ζ (10, 16, 22, 23). However, our current knowledge on their respective contribution to the

regulation of macrophage function is limited and mainly concerns the regulation of nitric oxide production. In one study, differential down-regulation of PKC isoenzymes induced by phorbol ester treatment revealed that PKC- β II participates in LPS-induced iNOS gene expression and nitrite production in the J774 macrophage cell line (10). More recently, transient PKC isoenzymes transfection studies in the RAW 264.7 macrophage cell line showed that iNOS gene expression is also regulated by PKC- ϵ , but in contrast to the pathway regulated by PKC- β II, the PKC- ϵ -dependent pathway is apparently not involved in the LPS response (24).

Elucidation of the role of a particular PKC isoenzyme in cellular regulation is complicated by the concomitant expression of several isoenzymes and by the lack of isoenzyme-specific activators or inhibitors. In the present study, we have investigated the role of PKC- α in the regulation of LPS-induced functions by overexpressing a kinase-deficient mutant of this isoenzyme in the murine macrophage line RAW 264.7. Such catalytically inactive mutant, which behaves as a dominant-negative molecule, acts by competing with the corresponding endogenous isoenzyme (21, 25). Using this approach, we obtained evidence that PKC- α activity regulates selective LPS-induced macrophage functions involved in host defence and in inflammation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

cDNAs and Expression vectors. The wild type human PKC- α cDNA (26) was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). A dominant-negative version of the gene, DN PKC- α (K368D), was created by site-directed mutagenesis using the Transformer System with the mutagenic primer AD-5 (5'-GTATGCAATCGATATCCTGAAGAAGG-3'), as described by the manufacturer (Clontech, Palo Alto, CA). The sequence of this mutant was confirmed by sequence analysis. Replacement of the conserved lysine residue in the ATP-binding domain yields an enzymatically inactive trans-dominant mutant (27-29). DN PKC- α cDNA was cloned into the EcoRI site of the expression vector pCIN-4 (30) and the resulting construct was designated pCIN-DN PKC- α .

Cell Culture and Stable Transfections. The murine macrophage cell line RAW 264.7 (American Type Culture Collection, kindly provided by D. Oth) was cultured in a 37°C incubator with 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with glutamine (Life Technologies Inc., ON, Canada), supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Hyclone, Logan, UT), 10 mM HEPES pH 7.3, and antibiotics (complete medium). Stable transfections were performed as described (31). Transfectants were selected in complete medium containing 500 μ g/ml G418 (Life Technologies Inc.) and individual clones were harvested, expanded, and examined for PKC- α levels by Western blot analysis.

Western Blot Analyses. Adherent cells were washed once with phosphate-buffered saline (PBS), homogenized in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100) containing protease and phosphatase inhibitors, and protein concentrations were determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL). Total proteins (15 μ g)

were fractionated in 10% SDS-polyacrylamide gels, electroblotted onto Hybond-ECL membranes (Amersham Life Science Inc., ON, Canada) and immunodetection was achieved by chemiluminescence (ECL, Amersham Life Science). Anti-PKC isoenzyme monoclonal antibodies were from Transduction Laboratories (Lexington, KY). Phosphorylation and degradation of I κ B α was analyzed with the PhosphoPlus I κ B α (Ser32) Antibody kit from New England BioLabs (Beverly, MA), phosphorylation of the p38 MAP kinase was determined with the PhosphoPlus p38 MAPK (Tyr182 Antibody kit, New England Biolabs), and phosphorylation of the Jun N-terminal kinase was analyzed with the Anti-Active JNK pAb from Promega (Madison, WI).

[³H]PDBu Binding Assay. [³H]Phorbol dibutyrate (PDBu) binding was determined as described (32). Cells plated in 24-well plates were washed twice with binding buffer (Dulbecco's modified Eagle's medium, 1 mg/ml bovine serum albumin, 10 mM Hepes, pH 7.0) and incubated in the presence of 10 nM [³H]PDBu (DuPont NEN, ON, Canada) at 37°C for 30 min. Cells were then washed thrice with ice-cold phosphate-buffered saline, lysed with 0.1 N NaOH, and bound [³H]PDBu was measured by liquid scintillation counting. All experiments were done in triplicate determinations, in the presence (non-specific binding) or the absence (total binding) of 10 μ M unlabeled PDBu (Sigma, St. Louis, MO). Specific binding was the difference between total binding and non-specific binding.

Northern Blot Analyses. RNA preparation and Northern blot analysis were performed as previously described (33), with the exception that probes were radiolabeled by random priming (34). The TNF- α probe was the 1.5 kb PstI fragment from pmTNF-1 (35), provided by W. Fiers), the IL-1 α probe was the 2.0 kb BamHI-HindIII fragment from pmIL1A (36), obtained from the American Type Culture Collection), the inducible nitric

oxide synthase (iNOS) probe was the 817bp HincII-EcoRI fragment from piNOSL3 ((37), provided by D. Radzioch).

Determination of Nitrite. Cells were incubated in the absence or presence of LPS (*Escherichia coli*, strain 0127:B8, Sigma) for 18 h and the amount of nitrite released into supernatants was determined with the Griess reagent as described (38).

Quantitation of Cytokines. Adherent cells were incubated in the absence or presence of LPS for 18 h and the amounts of TNF- α and IL-1 α in cell supernatants were determined by ELISA. For TNF- α levels, a rat anti-mouse TNF- α monoclonal antibody and a biotin-labeled rat anti-mouse TNF- α monoclonal antibody (both from Cedarlane Laboratories, ON, Canada) were used. For IL-1 α , a hamster anti-mouse IL-1 α monoclonal antibody (Genzyme, Cambridge, MA), a rabbit anti-mouse IL-1 α polyclonal serum (Cedarlane, ON, Canada), and an alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG antibodies (Calbiochem, San Diego, CA) were used.

Detection of MMP-9. Secretion of MMP-9 in cell supernatants was determined by gelatin-zymography, as previously described (39). Briefly, aliquots from cell supernatants were fractionated by electrophoresis in a 8% SDS-polyacrylamide gel containing 1% gelatin (Sigma). Gels were washed to remove SDS and incubated for 18 h at 37°C in renaturing buffer (50 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃, 1% Triton-X-100). MMP-9 activity was visualized following staining/destaining of the gel with Coomassie brilliant blue G-250 and was quantitated by computerized image analysis (BioRad, model GS-670 Densitometer). Results were expressed as arbitrary scanning units.

Nuclear protein extracts and electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Adherent cells (10⁷ per 100 mm tissue culture dishes) were stimulated with LPS for various time points,

washed, and scraped into 1.5 ml cold PBS. The cell suspensions were transferred to microfuge tubes, pelleted, and the nuclear protein extracts were prepared essentially as described (40). Protein contents were determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockfort, IL) and the extracts were stored at -70°C. EMSA were performed by incubating ³²P-labeled NF-κB consensus oligonucleotide (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGG-3', obtained from Promega) with 10 μg of nuclear extracts for 20 min at room temperature. The incubation mixture contained 3 μg poly(dI-dC) in a binding buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 20 mM NaCl, 4% glycerol). The DNA-protein complexes were separated from free oligonucleotide by electrophoresis under non-denaturing conditions in 4% native polyacrylamide gels in a buffer containing 44.5 mM Tris, 44.5 mM borate, pH 8.0 and 1 mM EDTA. The specificity of binding was determined by competition with excess unlabeled oligonucleotide. After electrophoresis, gels were exposed to films at -70°C.

RESULTS

Generation of DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 macrophages. Stable transfectants from two independent populations of RAW 264.7 macrophages electroporated with pCIN-DN PKC- α were selected in the presence of 500 μ g/ml G418. Western blot analyses were performed on three clones selected from each independent population of transfectants to determine their PKC- α expression levels. The three clones from the first population (clones DN PKC- α B1, C2, and D1), and one clone from the second population (clone DN PKC- α A2) expressed immunoreactive PKC- α above endogenous levels (not shown). To determine whether DN PKC- α overexpression had any effect on LPS-induced responses, we measured the ability of these four DN PKC- α -overexpressing clones to secrete nitrite in response to LPS. As shown in Table 1, LPS-induced nitrite secretion was inhibited in the four DN PKC- α -overexpressing clones (clones DN PKC- α B1, D1, A2, C2) with respect to the RAW 264.7 cells transfected with the empty vector. Inhibition of LPS-induced nitrite production was likely a consequence of DN PKC- α overexpression, as LPS-induced nitrite secretion in three clones of RAW 264.7 cells transfected with a construct containing the wild-type murine PKC- ζ cDNA (41) was similar to that of RAW 264.7 cells transfected with the empty vector (clones PKC- ζ A1, A2, B1) (Table 1).

Clone DN PKC- α A2, with a 2-fold increase in immunoreactive PKC- α levels, and clone DN PKC- α C2, with a 10-fold increase in immunoreactive PKC- α levels (Figure 1A), were selected for further analyses. Increased DN PKC- α levels in these clones was also demonstrated by measuring [3 H]PDBu binding levels (42), which were higher (1.3-fold for clone A2 and 2-fold for clone C2) than in the parental line (RAW 264.7 transfected with pCIN-4) (Figure 1B). Finally, clones A2 and C2 were similar to the parental cells with respect to their growth characteristics and morphology (not

shown). Of note, we were unsuccessful, despite several attempts, in generating stable G418-resistant clones overexpressing a wild type PKC- α construct, suggesting that elevated levels of wild type PKC- α is toxic for the RAW 264.7 cells.

Effect of PKC- α overexpression on LPS-induced TNF- α , IL-1 α , and iNOS gene expression. Exposure of macrophages to LPS induces TNF- α , IL-1 α , and iNOS mRNA accumulation. To assess the contribution of PKC- α in this process, we determined the levels of TNF- α , IL-1 α , and iNOS mRNA in RAW 264.7 control cells (transfected with the empty vector) and in the DN PKC- α -overexpressing clones A2 and C2 after LPS stimulation (10 ng/ml and 100 ng/ml) for 6 h. In control RAW 264.7 cells, LPS induced the expression of these three genes in a dose-dependent manner (Figure 2, lanes 1-3). DN PKC- α overexpression had a minor inhibitory effect on the induction of TNF- α mRNA accumulation (20 to 25% reduction in clone A2 and 45% to 55% in clone C2 with respect to control cells) (Figure 2, top panel). In contrast, LPS-induced IL-1 α mRNA accumulation was reduced by 50 to 70% in clone A2 (Figure 2, second panel, lanes 5 and 6) with respect to control cells (lanes 2 and 3), and abolished in clone C2 (lanes 8 and 9). Finally, iNOS mRNA accumulation was reduced by 50% to 60% in clones A2 (Figure 2, third panel, lanes 5 and 6) and by 65% to 75% in clone C2 (lanes 8 and 9) with respect to iNOS mRNA levels present in control cells (lanes 2 and 3). This inhibition can be correlated with DN PKC- α expression levels.

Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-stimulated cytokine and nitrite production.

We next compared the ability of control RAW 264.7 cells and clones A2 and C2, to produce TNF- α , IL-1 α , and nitrite. In the presence of 10 ng/ml and 100 ng/ml LPS, RAW 264.7 cells secreted high levels of TNF- α , IL-1 α , and nitrite in a dose-dependent manner (Figure 3A, B, C). Secretion of immunoreactive TNF- α (Figure 3A) by clone A2 was similar to that of RAW 264.7 cells and was reduced by 40% to 50% in clone C2.

Similarly, secretion of TNF- α was reduced by 55% in clone B1 and by 40% in clone D1 in response to 100 ng/ml LPS (data not shown). Consistent with the inhibition of IL-1 α mRNA accumulation, clones A2 and C2 failed to produce significant IL-1 α levels in response to 10 ng/ml LPS (Figure 3B). At 100 ng/ml LPS, IL-1 α secretion was slightly increased for clone A2 and was barely above basal levels for clone C2. Similar results were obtained with clones B1 and D1, both of which failed to secrete IL-1 α in response to 100 ng/ml LPS (data not shown). Nitrite secretion (Figure 3C) was reduced by approximately 60% to 70% for clone A2, and by 80% to 90% for clone C2 with respect to RAW 264.7 cells. Thus, DN PKC- α overexpression had a major inhibitory effect on LPS-induced IL-1 α and NO production.

Overexpression of DN PKC- α enhances LPS-stimulated MMP-9 secretion. In addition to inflammatory cytokines and nitrite, LPS stimulates macrophages to secrete various hydrolases, including the matrix metalloproteinase MMP-9 (43). Based on data obtained with PKC inhibitors, it has been proposed that PKC exerts both positive and negative regulation on LPS-induced MMP-9 secretion in macrophages (39). To determine the role of PKC- α in this process, we measured the secretion of MMP-9 in the supernatants of control cells and of clones A2 and C2 after stimulation with either 10 ng/ml or 100 ng/ml LPS for 24 h. As shown in Figure 4, MMP-9 levels were significantly higher in the supernatants of clones A2 (2-fold, lanes 7-10) and C2 (4-fold, lanes 12-15) than in the supernatants of normal cells (lanes 2-5). Of note, the reduced MMP-9 secretion by normal cells stimulated with 100 ng/ml LPS (lanes 4 and 5) was not observed with clones A2 (lanes 9 and 10) and C2 (lanes 14 and 15). Thus, increased LPS-stimulated MMP-9 secretion in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells suggests that PKC- α negatively regulates MMP-9 secretion.

Phosphorylation and degradation of I κ B α and nuclear translocation of NF κ B are normal in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells. Treatment of macrophages with LPS rapidly induces the dissociation of NF- κ B from I κ B and its translocation to the nucleus where it binds to specific DNA sequences (14, 44). This process is initiated with I κ B phosphorylation by the I κ B kinase, IKK- α , on specific serine residues (45, 46), followed by its ubiquitination and degradation. To investigate whether DN PKC- α overexpression affected this pathway, we measured the kinetics of LPS-induced I κ B α phosphorylation and degradation by immunoblotting analysis. In both control cells (Figure 5A, lanes 1 to 5) and clone C2 (lanes 6 to 10), I κ B α phosphorylation was maximal within 10 to 20 min following the addition of LPS. Decline in phosphorylated I κ B α levels was observed between 20 to 30 min post-stimulation. Kinetics of I κ B α degradation were also similar in control cells (Figure 5B, lanes 1 to 5) and in clone C2 (lanes 6 to 10), with a sharp decline occurring between 10 to 20 min after LPS stimulation. Consistently, the kinetics of NF- κ B nuclear translocation were similar in LPS-stimulated control cells and in clone C2 as determined by electrophoretic mobility shift assay (Figure 6). Similar to clone C2, both clones B1 and D1 showed normal kinetics of LPS-induced NF- κ B nuclear translocation (data not shown). Thus, DN PKC- α overexpression did not interfere with LPS-induced I κ B α phosphorylation and degradation and with NF κ B nuclear translocation in RAW 264.7 cells.

LPS-stimulated phosphorylation of p38 MAP kinase and JNK is normal in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells. LPS induces the signaling pathways leading to the activation of the mitogen-activated protein kinases (MAPK) ERK1/2, p38, and JNK (47-51). Since LPS-induced p38 and JNK activation is required for the expression of IL-1 and TNF- α (48, 52), we have determined whether these pathways were affected by DN PKC- α overexpression. To this end, we have measured the kinetics of LPS-induced phosphorylation of JNK and p38 by immunoblot analyses. In both control cells and

clone C2, JNK phosphorylation (Figure 7A) was detectable at 10 min post-stimulation and reached a maximum at 30 min. Similarly, p38, phosphorylation was detectable in both control cells and clone C2 at 15 minutes post-stimulation, reached a peak at 30 min, and was still detectable at 60 min (Figure 7B). Thus, LPS-induced phosphorylation of p38 and JNK was not inhibited by DN PKC- α overexpression.

DISCUSSION

A role for PKC in the regulation of LPS-inducible events in macrophages has been suggested from the observations that exposure of macrophages to LPS activates PKC (9-16) and that pre-treatment of macrophages with either PKC inhibitors or phorbol esters inhibits LPS-induced TNF- α , IL-1, and MMP-9 secretion, NO production, and tumoricidal activity (9, 13, 17, 18, 39). However, our knowledge on the contribution of particular isoenzymes in the regulation of specific macrophage functions is limited and relies mainly on indirect evidence. The present study was aimed at investigating the role of PKC- α in the regulation of LPS-induced macrophage functions. To this end, we have stably overexpressed a dominant-negative mutant of this isoenzyme in the murine macrophage line RAW 264.7. Our main finding is that overexpression of DN PKC- α had selective effects on LPS-initiated signal transduction, suggesting that PKC- α activity is required for the modulation of specific macrophage function by LPS. In particular, IL-1 α and NO production were significantly inhibited in DN PKC- α -overexpressing cells.

Previous studies on the iNOS gene revealed that at least two PKC isoenzymes regulate its expression. Based on the differential down-regulation of PKC isoenzymes by phorbol esters, it has been suggested that PKC- β II may participate in LPS-induced iNOS gene expression and nitrite production (10). More recently, transient transfection studies in RAW 264.7 cells provided evidence that PKC- ϵ regulates a pathway that promotes iNOS gene expression in response to phorbol esters (24). Interestingly, this PKC- ϵ -dependent pathway is apparently not involved in the LPS response. Our finding that DN PKC- α overexpression inhibited LPS-induced nitrite secretion and reduced iNOS mRNA accumulation indicated that PKC- α also regulates NO production. Collectively, these observations raise the possibility that iNOS expression is regulated by multiple PKC-dependent pathways, which may be activated by distinct stimuli. Considering the

multiple levels of regulation for iNOS expression (53, 54), it is conceivable that particular PKC isoenzymes act at distinct steps along the intracellular cascades leading to NO production.

The regulation of IL-1 α and TNF- α production in macrophages by particular PKC isoenzymes is not well known. Kovacs et al (17) previously reported that preincubation of murine peritoneal macrophages with the PKC inhibitor H7 reduced in a dose-dependent manner the expression of IL-1 α mRNA after stimulation with LPS. The potent inhibition of LPS-induced IL-1 α mRNA accumulation in cells overexpressing DN PKC- α suggests that PKC- α is one of the PKC isoenzymes that regulate IL-1 α gene expression. The effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced TNF- α production was less important as TNF- α protein secretion and TNF- α mRNA accumulation were reduced by approximately 50% in clone C2, which expresses the highest levels of DN PKC- α . Thus, based on the previous demonstration that H7 potently inhibited LPS-induced TNF- α gene expression in murine macrophages (17), our data suggest that PKC isoenzyme(s) other than PKC- α regulate LPS-induced TNF- α expression.

Macrophages secrete various matrix metalloproteinases whose function is the remodelling of extracellular matrices (55). Expression of MMP-9 (43) in RAW 264.7 cells is inducible by LPS and is subjected to both positive and negative regulation by PKC (39). It was thus of interest to determine whether overexpression of DN PKC- α would affect MMP-9 production. In contrast to IL-1 α , TNF- α , and nitrite secretion, we found that LPS-induced MMP-9 secretion was significantly enhanced in DN PKC- α -overexpressing cells. This observation suggests that PKC- α is one of the isoenzyme that negatively regulates LPS-stimulated MMP-9 expression. Negative regulation of gene expression by particular PKC isoenzymes has been recently described in the mast cell line RBL-2H3, where overexpression of either PKC- α or PKC- ϵ specifically and

effectively inhibited receptor-dependent cytosolic phospholipase A₂ activity and arachidonic acid metabolite release (56). Importantly, up-regulation of MMP-9 production demonstrates that DN PKC- α overexpression did not inhibit all LPS responses in RAW 264.7 cells.

NF- κ B, an ubiquitous transcription factor, is one of the major intracellular mediators of LPS-induced responses (14, 44). In resting cells, dimeric NF- κ B are complexed to a member of the I κ B family of inhibitory proteins which masks the NF- κ B nuclear localization signal. Upon cell stimulation, I κ B is phosphorylated on specific serine residues by IKK- α (45, 46), ubiquitinated, and proteolytically degraded, allowing NF- κ B dimers to translocate to the nucleus and bind to consensus DNA sequences (44). A role for PKC in the regulation of NF- κ B activation pathway has been evidenced by the demonstration that PKC- ζ associates with an I κ B α kinase activity and that overexpression of a dominant-negative mutant of PKC- ζ blocked NF- κ B activation (57-59). Since LPS-induced I κ B α phosphorylation and degradation and NF- κ B activation take place normally in DN PKC- α -overexpressing clones, it is likely that PKC- α is not involved in the activation of this pathway. Considering that NF- κ B plays an important role in the transcriptional activation of TNF- α gene expression (14), this suggestion would be consistent with the minor effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced TNF- α expression. Regarding the regulation of iNOS expression, there is evidence that activation of NF- κ B alone is not sufficient for its induction. Indeed, while LPS can activate NF- κ B in macrophages derived from either LPS-responsive or LPS-hyporesponsive mice, induction of iNOS or TNF- α takes place only in macrophages from LPS-responsive mice (60). Recently, Xie (61) identified a novel LPS-response element (LRE_{AA}) within the iNOS promoter which may work in concert with NF- κ B in regulating transcriptional activation. It will thus be of interest to determine whether a LRE_{AA}-binding activity is induced in our DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells. In

contrast to the IL-1 β promoter region, very little is known on the regulatory elements present upstream the IL-1 α gene. A recent analysis of the human IL-1 α promoter region failed to demonstrate the presence of an NF- κ B binding site but revealed the presence of a LPS-inducible AP-1 binding site (62), indicating that NF- κ B does not participate in the transcriptional activation of IL-1 α . This finding is consistent with the previous report that macrophages from mice lacking the p50 subunit of NF- κ B were normal with respect to their ability to produce IL-1 α in response to LPS (63). Therefore, identification of the defective LPS-inducible transcriptional activator(s) in our DN PKC- α overexpressing RAW 264.7 clones will undoubtedly contribute to our knowledge on the regulation of IL-1 α expression.

The observation that LPS-induced p38 and JNK phosphorylation takes place normally in our DN PKC- α -overexpressing clones suggests that activation of these MAP kinase pathways do not require PKC- α activity. Moreover, this data provides additional evidence that DN PKC- α overexpression did not cause a generalized impairment of LPS-induced responses in RAW 264.7 cells. Further studies are thus required to elucidate the identity of the LPS-induced pathway(s) and transcription factors regulated by PKC- α . In this regards, LPS activates the Raf-1/MAP kinase pathway in macrophages and evidence was provided that Raf-1 may participate in the induction of IL-1 β and TNF- α gene expression (50, 51, 64). Studies on the mechanisms of Raf-1 activation in both COS and NIH 3T3 cells revealed that diacylglycerol-regulated PKC isoenzymes, including PKC- α , are activators of Raf-1 in vivo (65, 66). It will be of interest to verify whether PKC- α is required for Raf-1 activation in LPS-stimulated macrophages.

REFERENCES

1. Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., and Mathison, J. C. (1990) *Science* **249**, 1431-3
2. Ulevitch, R. J., and Tobias, P. S. (1995) *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 437-57
3. Weinstein, S. L., Gold, M. R., and DeFranco, A. L. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 4148-52
4. English, B. K., Ihle, J. N., Myracle, A., and Yi, T. (1993) *J. Exp. Med.* **178**, 1017-22
5. Meng, F., and Lowell, C. A. (1997) *J. Exp. Med.* **185**, 1661-70
6. Dong, Z., O'Brian, C. A., and Fidler, I. J. (1993) *J. Leukoc. Biol.* **53**, 53-60
7. Weinstein, S. L., June, C. H., and DeFranco, A. L. (1993) *J. Immunol.* **151**, 3829-38
8. Novogrodsky, A., Vanichkin, A., Patya, M., Gazit, A., Osherov, N., and Levitzki, A. (1994) *Science* **264**, 1319-22
9. Shapira, L., Takashiba, S., Champagne, C., Amar, S., and Van, D. T. (1994) *J. Immunol.* **153**, 1818-24
10. Fujihara, M., Connolly, N., Ito, N., and Suzuki, T. (1994) *J. Immunol.* **152**, 1898-1906
11. Shinji, H., Akagawa, K. S., and Yoshida, T. (1994) *J. Immunol.* **153**, 5760-71
12. Aderem, A. A., Albert, K. A., Keum, M. M., Wang, J. K., Greengard, P., and Cohn, Z. A. (1988) *Nature* **332**, 362-364
13. Novotney, M., Chang, Z. L., Uchiyama, H., and Suzuki, T. (1991) *Biochemistry* **30**, 5597-5604
14. Sweet, M. J., and Hume, D. A. (1996) *J. Leukoc. Biol.* **60**, 8-26
15. Herrera-Velit, P., Knutson, K. L., and Reiner, N. E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 16445-52
16. Liu, M. K., Herrera, V. P., Brownsey, R. W., and Reiner, N. E. (1994) *J. Immunol.* **153**, 2642-52
17. Kovacs, E. J., Radzioch, D., Young, H. A., and Varesio, L. (1988) *J. Immunol.* **141**, 3101-5
18. Taniguchi, H., Sakano, T., Hamasaki, T., Kashiwa, H., and Ueda, K. (1989) *Immunology* **67**, 210-5
19. Parker, P. J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M. D., and Ullrich, A. (1986) *Science* **233**, 853-9

20. Nishizuka, Y. (1988) *Nature* **334**, 661-5
21. Dekker, L. V., and Parker, P. J. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 73-7
22. Zheng, L., Zomerdijk, T. P., Aarnoudse, C., van Furth, R., and Nibbering, P. H. (1995) *J. Immunol.* **155**, 776-84
23. Mischak, H., Kolch, W., Goodnight, J., Davidson, W. F., Rapp, U., Rose, J. S., and Mushinski, J. F. (1991) *J. Immunol.* **147**, 3981-7
24. Diaz-Guerra, M. J. M., Bodelon, O. G., Velasco, M., Whelan, R., Parker, P. J., and Bosca, L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32028-32033
25. Jaken, S. (1996) *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**, 168-73
26. Finkenzeller, G., Marme, D., and Hug, H. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 2183
27. Rosson, D., O'Brien, T. G., Kampherstein, J. A., Szallasi, Z., Bogi, K., Blumberg, P. M., and Mullin, J. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 14950-3
28. Uberall, F., Giselbrecht, S., Hellbert, K., Fresser, F., Bauer, B., Gschwendt, M., Grunicke, H. H., and Baier, G. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 4072-8
29. Baier, B. G., Uberall, F., Bauer, B., Fresser, F., Wachter, H., Grunicke, H., Utermann, G., Altman, A., and Baier, G. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1842-50
30. Rees, S., Coote, J., Stables, J., Goodson, S., Harris, S., and Lee, M. G. (1996) *Biotechniques* **20**, 102-4, 106, 108-10
31. Stacey, K. J., Ross, I. L., and Hume, D. A. (1993) *Immunol. Cell. Biol.* **71**, 75-85
32. Jaken, S. (1987) *Methods Enzymol.* **141**, 275-87
33. Descoteaux, A., and Matlashewski, G. (1990) *J. Immunol.* **145**, 846-53
34. Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983) *Anal Biochem* **132**, 6-13
35. Fransen, L., Muller, R., Marmenout, A., Tavernier, J., Van der Heyden, J., Kawashima, E., Chollet, A., Tizard, R., Van Heuverswyn, H., Van Vliet, A., Ruyschaert, M. R., and W., F. (1985) *Nucleic Acids Res* **13**, 4417-29
36. Lomedico, P. T., Gubler, U., Hellmann, C. P., Dukovich, M., Giri, J. G., Pan, Y. C., Collier, K., Semionow, R., Chua, A. O., and Mizel, S. B. (1984) *Nature* **312**, 458-62

37. Xie, Q. W., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Ding, A., Troso, T., and Nathan, C. (1992) *Science* **256**, 225-8
38. Green, S. J., Meltzer, M. S., Hibbs, J. J., and Nacy, C. A. (1990) *J. Immunol.* **144**, 278-83
39. Tremblay, P., Houde, M., Arbour, N., Rochefort, D., Masure, S., Mandeville, R., Opdenakker, G., and Oth, D. (1995) *Cytokine* **7**, 130-6
40. Andrews, N. C., and Faller, D. V. (1991) *Nucleic Acids Res* **19**, 2499
41. Goodnight, J., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., Mushinski, J. F., and Mischak, H. (1992) *Gene* **122**, 305-11
42. Knopf, J. L., Lee, M. H., Sultzman, L. A., Kriz, R. W., Loomis, C. R., Hewick, R. M., and Bell, R. M. (1986) *Cell* **46**, 491-502
43. Van Ranst, M., Norga, K., Masure, S., Proost, P., Vandekerckhove, F., Auwerx, J., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (1991) *Cytokine* **3**, 231-9
44. Baeuerle, P. A., and Henkel, T. (1994) *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 141-79
45. Régnier, C. H., Song, H. Y., Gao, X., Goeddel, D. V., Cao, Z., and Rothe, M. (1997) *Cell* **90**, 373-83
46. DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., and Karin, M. (1997) *Nature* **388**, 548-54
47. Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., and Ulevitch, R. J. (1994) *Science* **265**, 808-11
48. Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., Strickler, J. E., McLaughlin, M. M., Siemens, I. R., Fisher, S. M., Livi, G. P., White, J. R., Adams, J. L., and Young, P. R. (1994) *Nature* **372**, 739-46
49. Hambleton, J., Weinstein, S. L., Lem, L., and DeFranco, A. L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 2774-8
50. Hambleton, J., McMahon, M., and DeFranco, A. L. (1995) *J. Exp. Med.* **182**, 147-54
51. Geppert, T. D., Whitehurst, C. E., Thompson, P., and Beutler, B. (1994) *Mol Med* **1**, 93-103
52. Swantek, J. L., Cobb, M. H., and Geppert, T. D. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6274-82

53. Xie, Q., and Nathan, C. (1994) *J. Leukoc. Biol.* **56**, 576-82
54. MacMicking, J., Xie, Q. W., and Nathan, C. (1997) *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 323-50
55. Nagase, H., and Fields, G. B. (1996) *Biopolymers* **40**, 399-416
56. Chang, E. Y., Szallasi, Z., Acs, P., Raizada, V., Wolfe, P. C., Fewtrell, C., Blumberg, P. M., and Rivera, J. (1997) *J. Immunol.* **159**, 2624-32
57. Diaz-Meco, M. T., Berra, E., Municio, M. M., Sanz, L., Lozano, J., Dominguez, I., V., D.-G., Lain de Lera, M. T., Alcami, J., Paya, C. V., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.-L., and Moscat, J. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4770-5
58. Diaz-Meco, M. T., Dominguez, I., Sanz, L., Dent, P., Lozano, J., Municio, M. M., Berra, E., Hay, R. T., Sturgill, T. W., and Moscat, J. (1994) *EMBO J.* **13**, 2842-8
59. Folgueira, L., McElhinny, J. A., Bren, G. D., MacMorran, W. S., Diaz, M. M., Moscat, J., and Paya, C. V. (1996) *J. Virol.* **70**, 223-231
60. Ding, A., Hwang, S., Lander, H. M., and Xie, Q. W. (1995) *J. Leukoc. Biol.* **57**, 174-9
61. Xie, Q. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 14867-72
62. Bailly, S., Fay, M., Israel, N., and Gougerot Pocidalo, M. (1996) *Eur. Cytokine Netw.* **7**, 125-8
63. Sha, W. C., Liou, H. C., Tuomanen, E. I., and Baltimore, D. (1995) *Cell* **80**, 321-30
64. Reimann, T., Buscher, D., Hipskind, R. A., Krautwald, S., Lohmann-Matthes, M.-L., and Baccarini, M. (1994) *J. Immunol.* **153**, 5740-9
65. Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D., and Rapp, U. R. (1993) *Nature* **364**, 249-52
66. Cai, H., Smola, U., Wixler, V., Eisenmann-Tappe, I., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J., Rapp, U., and Cooper, G. M. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 732-41

FOOTNOTES

*This work was supported by grants to A. D. from the Medical Research Council of Canada (MRC) (MT-12933) and from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. A. D. is a MRC Scholar.

¹The abbreviations used are: TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide; PKC, protein kinase C; DN, dominant-negative; NO, nitric oxide; iNOS, inducible nitric oxide synthase; PBDu, phorbol dibutyrate; PTK, protein tyrosine kinase; MMP, matrix metalloproteinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mireille Varin for her expert technical assistance. We are grateful to S. Rees for the kind permission to use the pCIN-4 expression vector, and P. Duplay, D. Malo, and H. Charest for helpful comments and discussions.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Overexpression of DN PKC- α in the RAW 264.7 macrophage line. (A) The levels of immunoreactive PKC- α protein in RAW 264.7 cells transfected with the empty vector (control cells, lane 1), or with the pCIN-DN PKC- α (clone A2, lane 2; clone C2, lane 3) were determined by Western blot analysis on total cell extracts, as described under *Experimental Procedures*. (B) [3 H]PDBu binding levels were determined in intact adherent cells as described under *Experimental Procedures* and normalized for protein levels. Control cells (lane 1), clone A2 (lane 2), and clone C2 (lane 3). This experiment was performed in triplicates and was repeated twice with similar results.

Figure 2. Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced TNF- α , IL- α and iNOS mRNA accumulation. Adherent cells (vector alone, clone A2, and clone C2) were incubated in the absence (lanes 1, 4, 7) or in the presence of either 10 ng/ml (lanes 2, 5, 8) or 100 ng/ml (lanes 3, 6, 9) LPS for 6 h. Total RNA was extracted and Northern blot analysis was performed as described under *Experimental Procedures*. Top panel, TNF- α mRNA; second panel, IL-1 α mRNA; third panel, iNOS mRNA. RNA integrity and loading was assessed by ethidium bromide staining (bottom panel). Similar results were obtained in a separate experiment.

Figure 3. Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced secretion of TNF- α , IL-1 α , and nitrite. Adherent cells (vector alone, open bars; clone A2, hatched bars; and clone C2, closed bars) were incubated in the absence or in the presence of either 10 ng/ml or 100 ng/ml LPS for 18 h. Levels of TNF- α (A), IL-1 α (B), and nitrite (C) in cell supernatants were determined as described under *Experimental Procedures*. Each determination were in triplicate and are representative of results obtained in four experiments.

Figure 4. DN PKC- α overexpression up-regulates LPS-induced MMP-9 secretion.

Adherent cells (vector alone, lanes 1-5; clone A2, lanes 6-10; and clone C2, lanes 11-15) were incubated in the absence (lanes 1, 6, 11) or in the presence of either 10 ng/ml (lanes 2, 3, 7, 8, 12, 13) or 100 ng/ml LPS (lanes 4, 5, 9, 10, 14, 15) for 18 h. MMP-9 activity was assessed by zymography as described under *Experimental Procedures*. The data shown in this Figure are representative of two separate experiments.

Figure 5. Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced I κ B α phosphorylation and degradation. Adherent cells (vector alone, lanes 1-5; and clone C2, lanes 6-10) were incubated in the presence of 100 ng/ml LPS for 5, 10, 20, and 30 min. Cells extracts were prepared and the levels of phosphorylated I κ B α (top panel) and I κ B α (lower panel) were determined by Western blot analysis as described under *Experimental Procedures*. Similar results were obtained in a separate experiment.

Figure 6. Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced NF- κ B activation. Adherent cells (vector alone, lanes 1-3; and clone C2, lanes 4-6) were incubated in the presence of 100 ng/ml LPS for 15 and 30 min. Cell extracts were prepared and EMSA for NF- κ B were performed as described under *Experimental Procedures*. In lane 7, 50-fold excess cold probe was coincubated with the reaction mixture containing nuclear extracts from control cells incubated with LPS for 30 min prior to EMSA. Similar results were obtained in four different experiments.

Figure 7. Effect of PKC- α overexpression on LPS-induced JNK and p38 phosphorylation. Adherent cells (vector alone and clone C2) were incubated with 100 ng/ml LPS for the indicated time points. Cell extracts were prepared and Western blot analyses were performed as described under *Experimental Procedures*. (A) Levels of phosphorylated (top panel) and total (bottom panel) JNK. (B) Levels of phosphorylated (top panel) and total (bottom panel) p38.

Table 1*DN PKC- α inhibits LPS-induced nitrite secretion*

Adherent cells (2.5×10^5 per well) were incubated in the absence or the presence of either 10 ng/ml or 100 ng/ml LPS for 18 h. Nitrite levels were measured as described under *Experimental Procedures*. In Experiment 1, clones of RAW 264.7 cells overexpressing DN PKC- α were compared to RAW 264.7 cells transfected with the empty vector (pCIN-4) for nitrite production. In Experiment 2, clones of RAW 264.7 cells transfected with a PKC- ζ construct were compared to RAW 264.7 cells transfected with the empty vector.

Cells	Treatment (ng/ml LPS)		
	0	10	100
	Nitrite (uM) ^a		
Expt. 1			
pCIN-4	2.1 \pm 0.5	44.5 \pm 2.8	48.0 \pm 2.4
DN PKC- α A2	3.0 \pm 0.6	12.3 \pm 1.0	17.5 \pm 3.2
DN PKC- α C2	2.1 \pm 0.1	5.0 \pm 0.8	8.1 \pm 0.9
DN PKC- α B1	2.3 \pm 0.2	5.0 \pm 0.6	8.1 \pm 1.9
DN PKC- α D1	1.7 \pm 0.1	10.6 \pm 0.5	15.6 \pm 3.6
Expt. 2			
pCIN-4	2.9 \pm 0.7	14.5 \pm 4.3	19.4 \pm 2.5
PKC ζ A1	3.2 \pm 0.2	15.6 \pm 1.9	20.4 \pm 5.2
PKC ζ A2	3.0 \pm 0.5	10.4 \pm 1.1	17.4 \pm 2.9
PKC ζ B1	3.2 \pm 0.2	11.8 \pm 1.2	19.1 \pm 1.4

^a These values represent the mean \pm SE of one experiment performed in triplicate samples

Figure 1

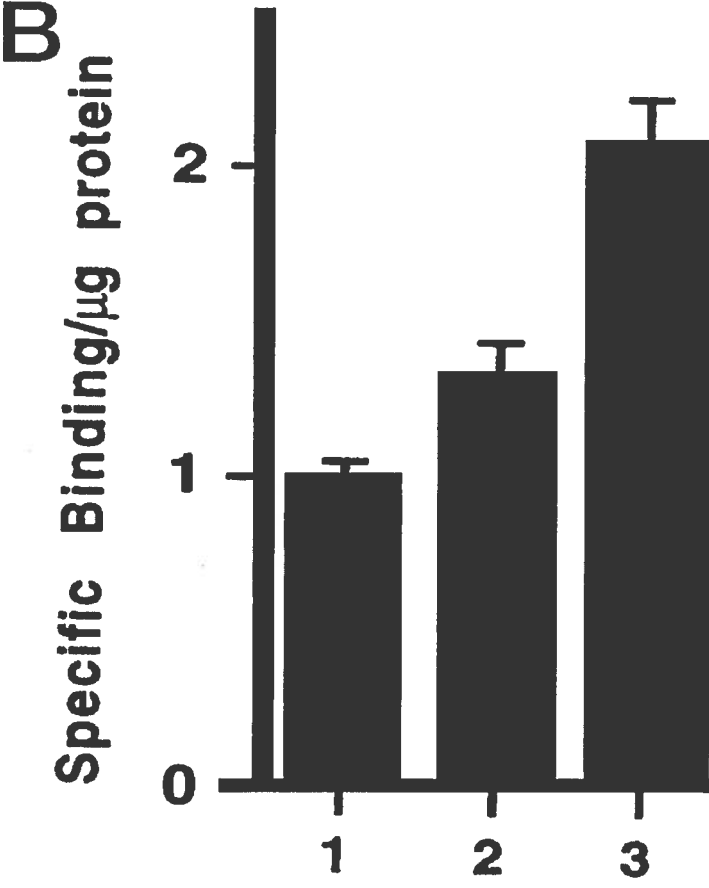
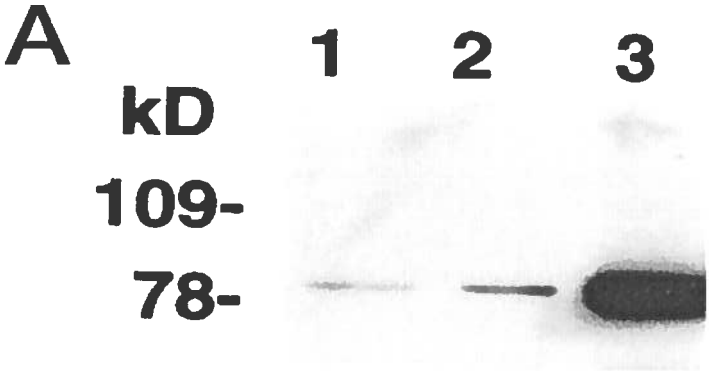


Figure 2

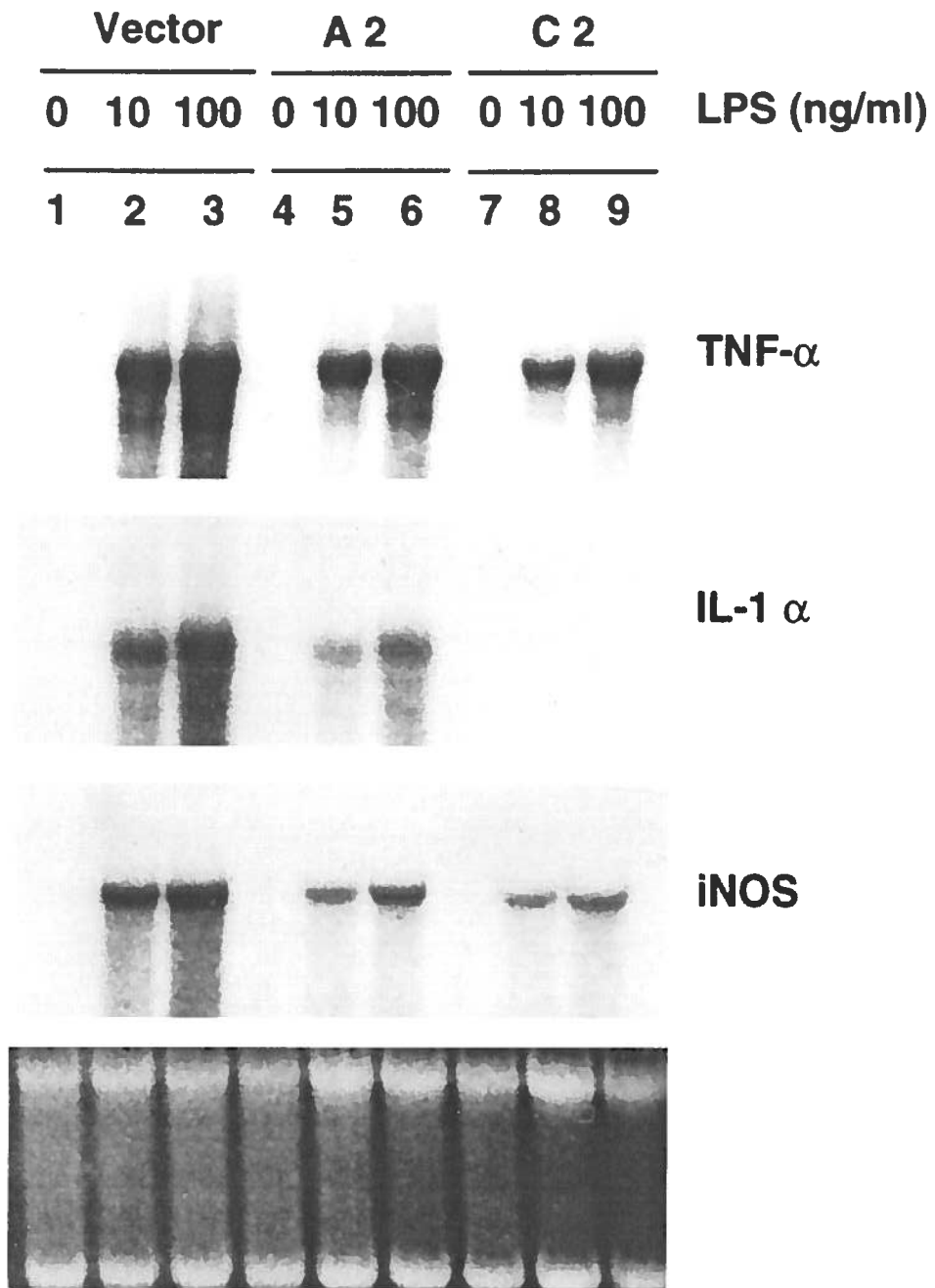


Figure 3

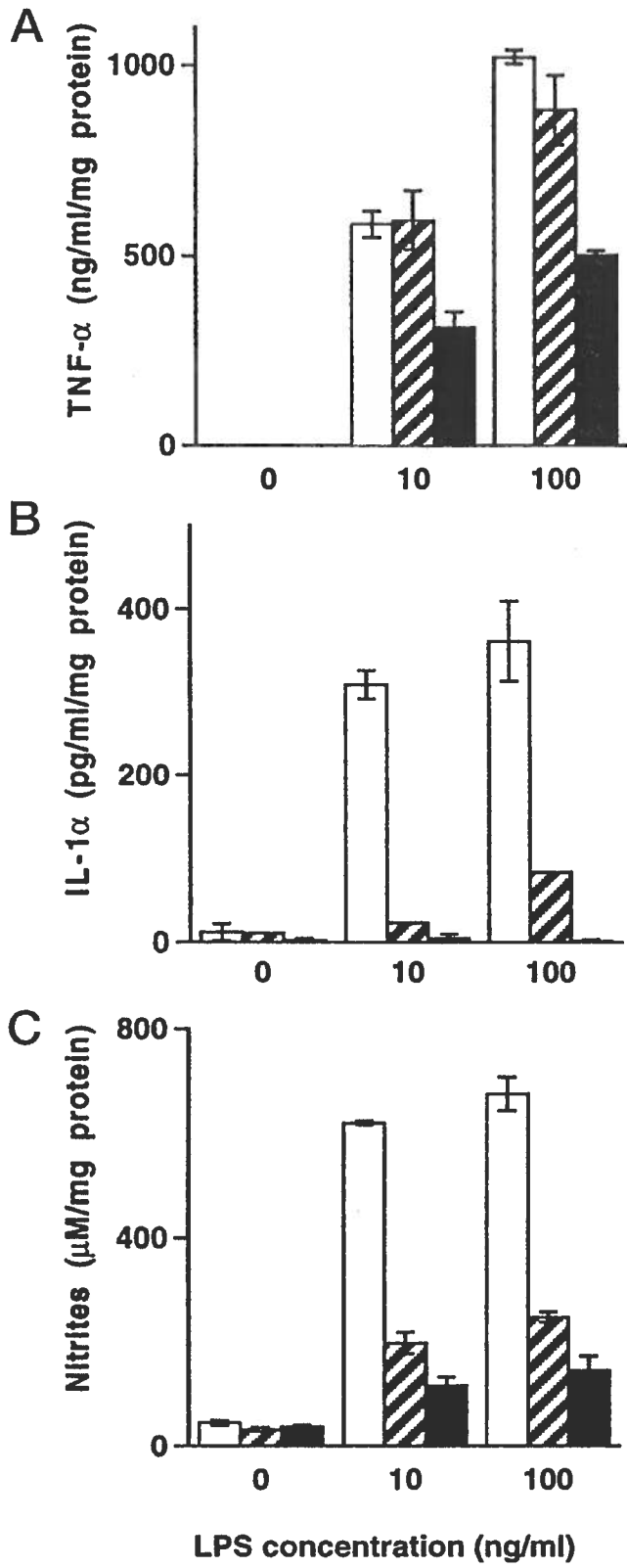


Figure 4

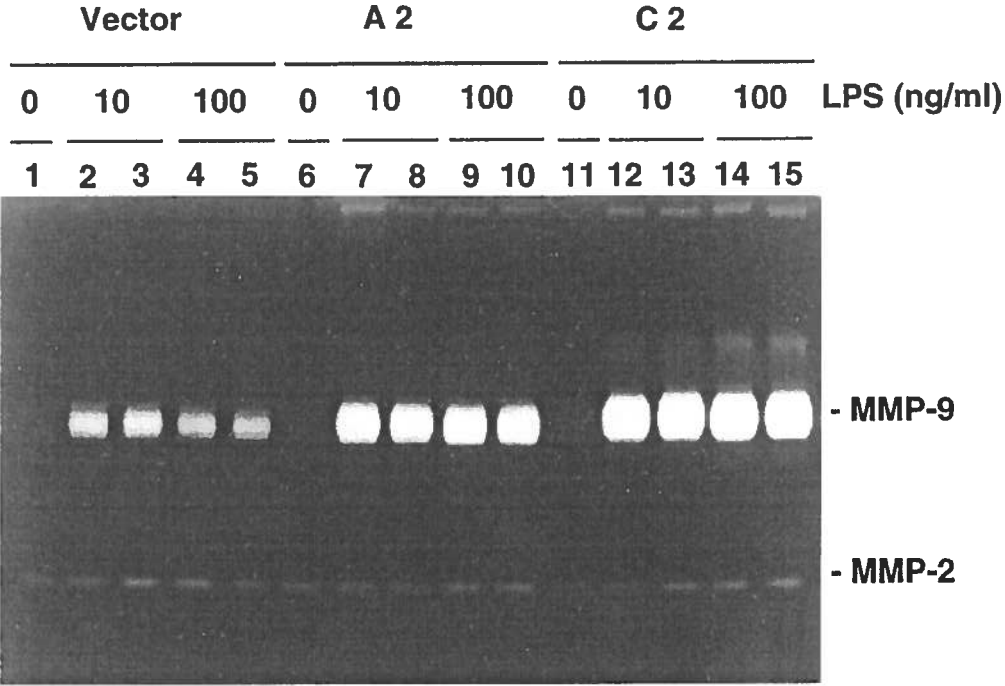


Figure 5

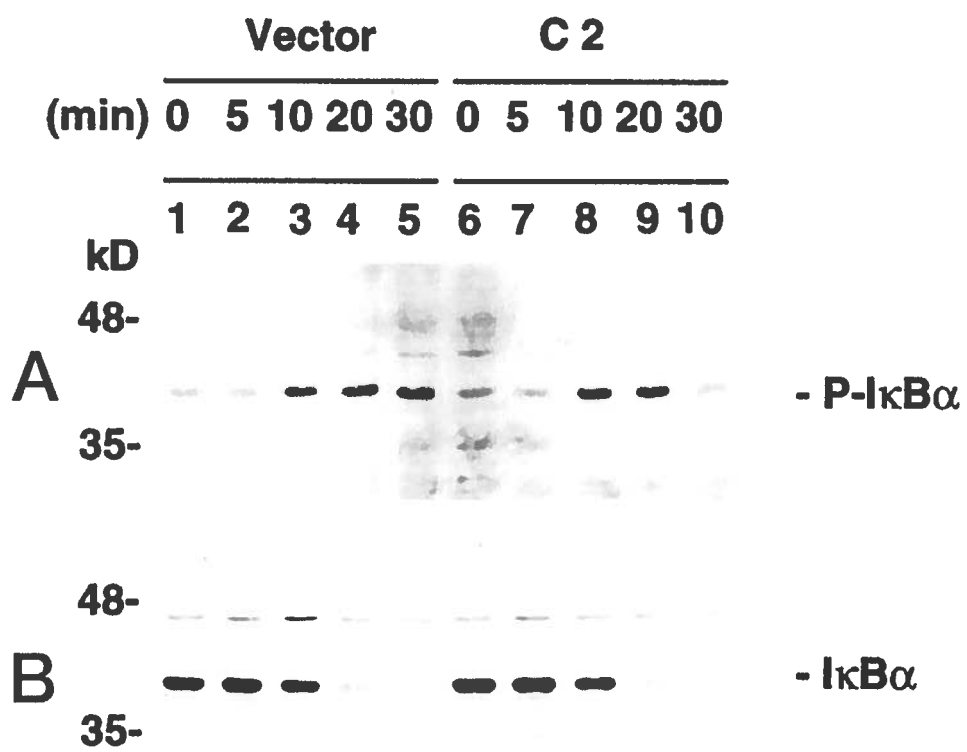


Figure 6

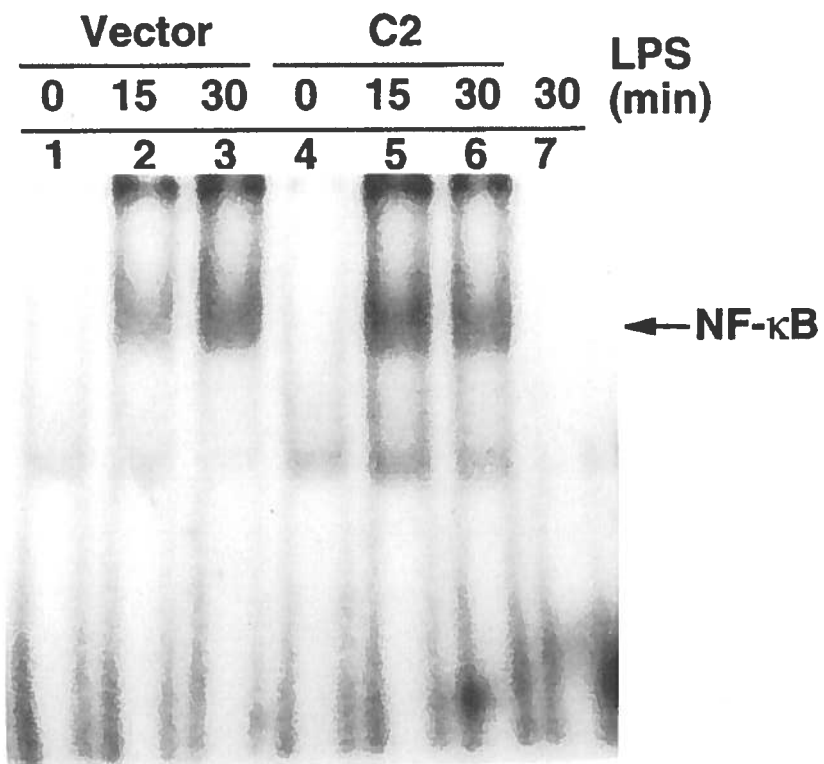
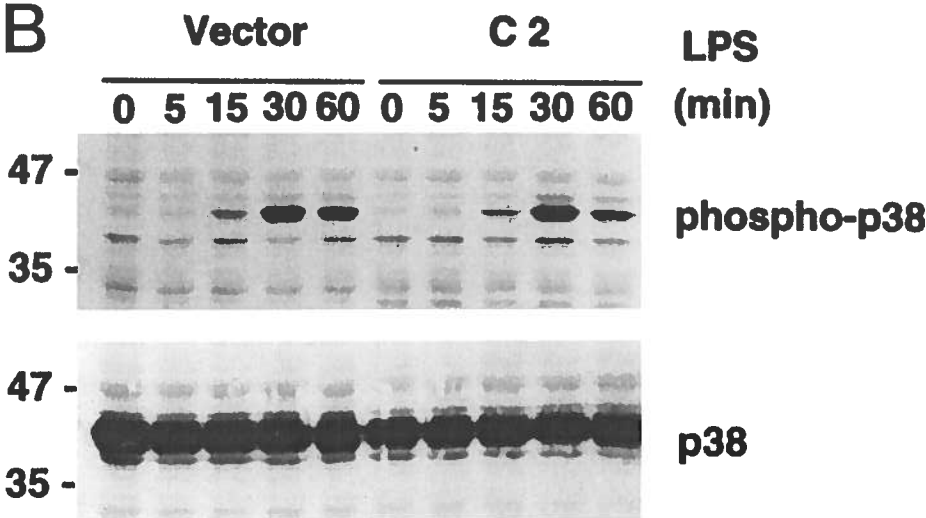
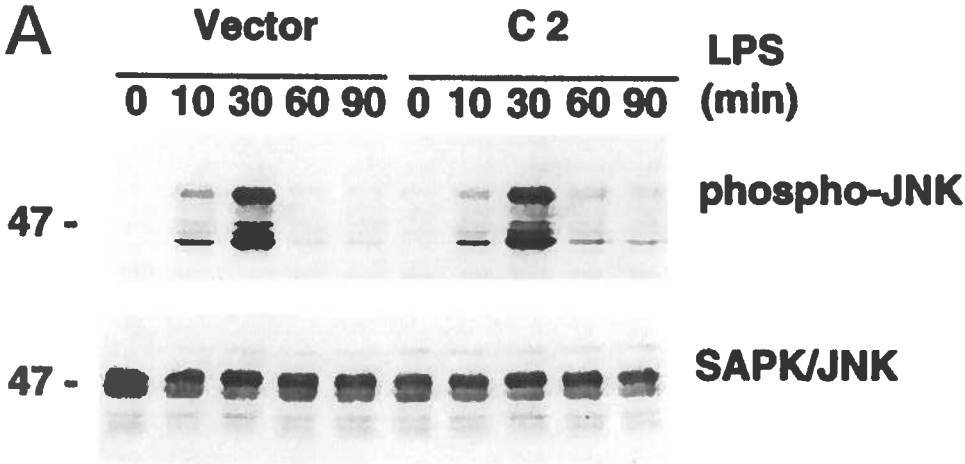


Figure 7



RÉSUMÉ DE LA SECONDE PUBLICATION

Nous avons précédemment démontré que la surexpression d'un dominant-négatif de la PKC- α dans la lignée de macrophages RAW 264.7 inhibait l'expression d'IL-1 α , iNOS et COX-2 induite par le LPS. Cette inhibition n'était pas due à un défaut relié à la translocation nucléaire du NF- κ B, suggérant que la PKC- α régule d'autres facteurs de transcription dont l'activité serait induite par le LPS. Dans cette étude, nous avons investigué le rôle de la PKC- α dans l'activation induite par le LPS d'AP-1 et du NF-IL-6. Les gels électrophorétiques de mobilité à décalage et les transfections transitoires avec le gène rapporteur luciférase ont révélé que l'activation d'AP-1 induite par le LPS était normale dans les clones DN PKC- α . Par contre, l'activité transcriptionnelle du NF-IL6 était inhibée dans les clones DN PKC- α , ce qui corellait avec une translocation nucléaire défectueuse. À l'inverse, la surexpression de la forme sauvage ou d'un mutant constitutivement actif de la PKC- α augmentait de façon significative l'activité du NF-IL6. Et finalement, l'expression induite par le LPS des gènes IL-1 β et G-CSF, qui est sous le contrôle du facteur NF-IL6, était fortement diminuée dans les clones DN PKC- α . Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que la régulation de l'activité du NF-IL6 soit un des mécanismes par lequel PKC- α régule l'expression de gènes induit par le LPS.

Contribution des auteurs :

Frédéric Chano : Totalité des travaux. Rédaction du manuscrit;

Albert Descoteaux : Directeur de F. Chano. Révision et édition du manuscrit.

SECONDE PUBLICATION

June 17, 2002

EJI-22932 Rev

Modulation of lipopolysaccharide-induced NF-IL6 activation by protein kinase C- α in a mouse macrophage cell line

Frédéric Chano and Albert Descoteaux

INRS- Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, Canada H7V 1B7

Correspondence: Albert Descoteaux, INRS- Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada. Tel.: 1-450-687-5010 (ext. 4465); Fax: 1-450-686-5301; E-mail: albert.descoteaux@iaf.quebec.ca

Running title: PKC- α modulates LPS-induced transcriptional activity

Keywords: macrophages/lipopolysaccharide/protein kinase C/transcription factors

Abbreviations: DN, dominant-negative /iNOS, inducible NO synthase /COX, cyclooxygenase /EMSA, electrophoretic mobility shift assay

Summary

We have previously shown that overexpression of a dominant-negative (DN) mutant of PKC- α in RAW 264.7 macrophages inhibited LPS-induced IL-1 α , iNOS, and COX-2 expression. This inhibition was not related to defective NF- κ B nuclear translocation, suggesting that PKC- α might be involved in the modulation of other LPS-inducible transcription factors. In the present study, we have investigated the impact of PKC- α on the activation of AP-1 and NF-IL6 in LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Electrophoretic mobility shift assays and luciferase reporter constructs revealed that LPS-induced AP-1 transcriptional activity was normal in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells. In contrast, LPS-induced DNA-binding and transcriptional activities of NF-IL6 were inhibited in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells, and correlated with an impairment of NF-IL6 nuclear translocation. Conversely, overexpression of either wild type PKC- α or a constitutively active PKC- α mutant significantly enhanced LPS-stimulated NF-IL6-dependent promoter activity. Finally, LPS-induced expression of two genes regulated by NF-IL6, namely IL-1 β and G-CSF, was impaired in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells. Taken together, these results suggest that regulation of NF-IL6 activity constitutes one of the mechanisms by which PKC- α modulates LPS-induced gene expression in the mouse macrophage cell line RAW 264.7.

1 INTRODUCTION

Bacterial LPS induces profound functional alterations in macrophages, including the secretion of proinflammatory cytokines, prostaglandins, and nitric oxide. Binding of LPS to the cell surface CD14/MD-2/Toll-like receptor (TLR) 4 receptor complex triggers multiple phosphorylation cascades involving both protein tyrosine and serine/threonine kinases, which regulate the transcriptional activation of LPS-responsive genes [1].

Recent studies revealed that activation of TLR4 involves the recruitment of the adaptor proteins MyD88 and TIRAP to the cytoplasmic domain of TLR4, leading to the downstream activation of two distinct signaling pathways [2]. MyD88-dependent signaling leads to the activation of IRAK, whereas TIRAP-dependent signaling involves PKR [2, 3]. Both TLR4-induced signaling pathways lead to the activation NF- κ B, as well as p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK) [2].

Several observations indicate that members of the protein kinase C (PKC) superfamily of protein serine/threonine kinases play a role in the modulation of LPS-induced responses. Incubation of macrophages with LPS induces PKC activity [4-9], and PKC inhibitors block the expression of several LPS responses [6, 10, 11]. At least six members of the PKC family are expressed in macrophages and recent studies have addressed their respective role in modulating LPS responses [12-17]. We have previously investigated the role of PKC- α in LPS-induced responses using clones of the RAW 264.7 macrophage cell line overexpressing a dominant-negative mutant of this isoenzyme (DN PKC- α). We

obtained evidence that PKC- α modulates LPS-induced iNOS, IL-1 α and COX-2 expression independently of NF- κ B nuclear translocation, as well as of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), JNK and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) phosphorylation [12, 15, 18]. These observations suggested that PKC- α might be involved in the modulation of other LPS-inducible transcription factor(s).

To further understand the mechanism(s) by which PKC- α modulates LPS-induced responses, we investigated the activity of LPS-induced transcription factors. Our data indicates that in the mouse macrophage cell line RAW 264.7, PKC- α plays a role in the induction of NF-IL6 activation by LPS, which may participate in LPS-induced IL-1 β , COX-2 and G-CSF gene expression.

2 Results

We previously reported that LPS-induced NF- κ B nuclear translocation takes place normally in DN PKC- α -overexpressing macrophages [12], suggesting that the inhibition of LPS-induced IL-1 α , iNOS, and COX-2 expression observed in DN PKC- α -overexpressing macrophages [12, 15] is related to the defective activation of transcription factor(s) other than NF- κ B. To further elucidate the role of PKC- α in the modulation of LPS responses, we have investigated its impact on the activation of AP-1 and NF-IL6, which are involved in the regulation of LPS-inducible genes.

2.1 LPS-induced nuclear translocation and activity of AP-1 do not require PKC- α in RAW 264.7 macrophages.

The AP-1 complex consists of either a homodimer of *Jun* family members or a heterodimer of *Jun* and *Fos* family members of transcription factors [19] and is rapidly activated by LPS in mononuclear cells [1]. AP-1 consensus sequences are present within the promoter region of numerous LPS-inducible genes including IL-1 α and iNOS [1, 20]. We first compared AP-1 DNA binding activity by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) in normal and DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells stimulated with 100 ng/ml LPS for 1, 3, and 4 h. As shown in Figure 1A, induction of AP-1 complexes DNA binding activity took place with similar kinetics in both normal (lanes 1-4) and DN PKC- α -overexpressing (clone C2) (lanes 5-8) macrophages. Similar results were obtained with other DN PKC- α -overexpressing clones (data not shown). We next transfected normal

and DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells (clones B1 and C2) with an AP-1 luciferase reporter construct [21], and we quantified luciferase activity following a 6 h incubation in the absence (open bars) or presence (closed bars) of 100 ng/ml LPS. As shown in Figure 1B, LPS induced a significant increase in AP-1-dependent luciferase activity in both normal and DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 macrophages. These results suggest that PKC- α is not required for the activation of AP-1 DNA binding and transcriptional activities in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

2.2 PKC- α modulates LPS-induced NF-IL6 activation in RAW 264.7 macrophages.

NF-IL6, also known as C/EBP β , is a member of the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) family of leucine zipper transcription factors [22]. In monocytes/ macrophages, NF-IL6 mediates LPS responses and regulates the expression of a variety of genes involved in host defense and inflammation including IL-1, IL-6, IL-12, G-CSF, COX-2, and iNOS [1, 22, 23]. Phosphorylation of NF-IL6 on Ser-105, which involves PKC activity, enhances its DNA binding activity and transcriptional activity in HepG2 cells [24]. To assess whether a defective activation of NF-IL6 could have accounted for the inhibition of LPS-induced gene expression in DN PKC- α -overexpressing macrophages [12, 15], we first compared NF-IL6 DNA-binding activity by EMSA in normal (transfected with the empty vector) and DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells incubated in the absence or presence of 100 ng/ml LPS for 1, 3, and 4 h. In normal RAW 264.7 macrophages, LPS induced a rapid and sustained NF-IL6 DNA-binding activity for up to 4 hours (Fig. 2A, lanes 1-4). In contrast, LPS-induced NF-IL6 DNA-binding

activity was minimal in DN PKC- α -overexpressing macrophages (clone C2) (Fig. 2A, lanes 5-8). Similar results were obtained with other normal (transfected with vector) and DN PKC- α -overexpressing clones (data not shown). We next transfected normal and DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells with a NF-IL6 luciferase reporter PKC- α construct [25] and quantified luciferase activity following a 12 h incubation in the absence (open bars) or presence (closed bars) of 100 ng/ml LPS. This NF-IL6 luciferase reporter construct contains the C/EBP β site from the human ICAM-1 promoter [25]. As shown in Figure 2B, LPS induced a three to four-fold increase in NF-IL6-dependent luciferase activity in normal RAW 264.7 cells. In DN PKC- α -overexpressing cells, LPS-induced NF-IL6-dependent luciferase activity was increased by two-fold in clone A2, and was barely over basal levels in clones B1 and C2 (Fig. 2B). Inhibition of LPS-induced NF-IL6 DNA-binding and transcriptional activities was not the consequence of a reduced synthesis of NF-IL6, as Western blot analyses on total cellular extracts revealed that normal and DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 macrophages (clones B1 and C2) expressed similar levels of NF-IL6 in response to LPS (Fig. 4A, upper panel). LPS-induced levels of C/EBP δ , another member of the c/EBP family which can form heterodimers with NF-IL6 to regulate gene expression [26], were also similar in normal and DN PKC- α -overexpressing cells (Fig. 4A, lower panel). However, Western blot analyses on nuclear extracts revealed that nuclear translocation of NF-IL6, but not c/EBP δ , was impaired in LPS-stimulated DN PKC- α -overexpressing cells (Fig 4B).

To further assess the role of PKC- α in LPS-induced NF-IL6-dependent gene expression, we co-transfected normal RAW 264.7 macrophages with either a wild type

PKC- α expression vector, a constitutively active (CA) PKC- α (A25E), or the control vector, along with the NF-IL6 luciferase reporter construct. As shown in Figure 3, overexpression of wild type PKC- α significantly increased LPS-induced NF-IL6-dependent luciferase activity with respect to control transfections (1.4-fold). Overexpression of CA PKC- α (A25E) significantly increased both the basal and the LPS-induced NF-IL6-dependent luciferase activity with respect to control transfections (2.2- and 2-fold, respectively). These data strongly suggest that PKC- α might play a role in the activation of NF-IL6 by LPS in RAW 264.7 macrophages.

2.3 Inhibition of LPS-induced IL-1 β and G-CSF mRNA accumulation in DN PKC- α -overexpressing macrophages.

We have previously shown that PKC- α plays a role in the modulation of IL-1 α , iNOS, and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages [12, 15]. To further assess the contribution of PKC- α in the modulation of genes whose expression requires NF-IL6, we compared the levels of IL-1 β and G-CSF mRNA in normal and DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells (clones A2, B1, and C2) after stimulation with 10 ng/ml LPS. As shown in Figure 5A, LPS-induced IL-1 β mRNA accumulation, which was maximal at 9 h post-stimulation in normal macrophages (transfected with empty vector) (lanes 2, 3, and 5, 6), was barely detectable in DN PKC- α -overexpressing macrophages (lanes 8, 9, 11, 12, 14, 15). Similarly, LPS-induced G-CSF mRNA accumulation was significantly impaired in DN PKC- α -overexpressing macrophages (Fig. 5B, lanes 8, 9, 11, 12, 14, 15) with respect to the RAW 264.7 cells transfected with the empty vector (lanes 2, 3, and 5, 6).

3 Discussion

We previously showed that overexpression of DN PKC- α in RAW 264.7 macrophages inhibited LPS-induced iNOS, IL-1 α and COX-2 expression, indicating that PKC- α participates in the regulation of macrophage genes which contribute to inflammatory responses [12, 15]. In the present study, we have investigated the underlying mechanism responsible for the inhibitory effect of DN PKC- α -overexpression on LPS-induced gene expression. Using a combination of EMSAs, and transient transfections, we obtained data indicating that PKC- α plays a role in the regulation of LPS-induced NF-IL6 activation in RAW 264.7 macrophages.

NF-IL6 (or C/EBP β), a member of the CCAAT/enhancer-binding protein family, was originally identified as a nuclear factor binding to IL-1-responsive elements in the promoter of IL-6 and several acute phase response genes [22, 27]. Accumulating evidence indicates that NF-IL6 is an important, if not essential, mediator of immune and inflammatory responses in macrophages, as it regulates the expression of several genes including G-CSF, COX-2, iNOS, IL-12, and IL-1 [23, 28-33]. Our finding that PKC- α modulates LPS-induced NF-IL6 activation raises the possibility that defective activation of NF-IL6 contributes to the inhibition of LPS-induced expression of these genes in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 macrophages ([12, 15] and this study). There is currently little information concerning the pathway(s) leading to NF-IL6 activation. In NIH 3T3 cells NF-IL6 activity is regulated through phosphorylation at Thr 235 by mitogen-activated protein kinases in response to activated *ras* [34]. In addition to Thr

235, studies in the rat hepatoma cell line HepG2 showed that activation of PKC- α increased NF-IL6 activity through the phosphorylation of Ser 105 [24]. Since PKC does not phosphorylate Ser 105 on NF-IL6 *in vitro*, this effect of PKC- α is likely to be indirect [35]. One way by which PKC- α could modulate the phosphorylation of NF-IL6 could be through the activation of Raf-1, as it has been established that PKC- α directly activates Raf-1 [36]. Alternatively, PKC-mediated phosphorylation and activation of NF-IL6 could involve the p90 ribosomal S6 kinase, which is downstream of activated PKC [37]. However, in macrophages, there is no available data that LPS induces NF-IL6 phosphorylation. In this regard, Caivano and colleagues [26] were unable to detect NF-IL6 phosphorylation taking place following LPS stimulation of macrophages.

The observation that NF-IL6 nuclear translocation is impaired in DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells raises the possibility is that PKC- α is involved in the regulation of this process. Nuclear protein import is a complex and highly regulated process which involves recognition of nuclear localization sequences by cytosolic receptors of the importin/karyopherin superfamily [38]. Recognition of nuclear localization sequence-containing proteins is followed by their docking at the cytoplasmic side of the nuclear pore complex, and their subsequent translocation and release into the nucleus [38]. The mechanisms underlying recognition of c/EBP proteins nuclear localization signals [39] and their nuclear translocation are poorly understood. Of interest, a mutated NF-IL6 lacking its nuclear localization sequence can be translocated to the nucleus when co-expressed with c/EBP α , indicating that a single nuclear localization sequence is sufficient to promote nuclear transport of a bZIP dimer [39]. This

observation raises the possibility that in response to LPS, NF-IL6 is transported to the nucleus in association with a protein which is phosphorylated by PKC- α . Clearly, the mechanism(s) by which PKC- α modulates LPS-induced NF-IL6 activation in RAW 264.7 cells remains speculative, as additional studies will be required to elucidate the regulation of NF-IL6 activation in LPS-stimulated macrophages.

Previous studies based on pharmacological inhibitors indicated a role for PKC in regulating the expression of several LPS responses [6, 10, 11]. More recently, it has been shown that PKC- β I, PKC- δ , and PKC- ϵ are required for LPS-induced responses, including iNOS, TNF- α , and IL-1 β expression [13, 17]. However, in contrast to PKC- α which acts through the regulation of NF-IL6 activity (this study), PKC- β I and PKC- δ modulate LPS-induced iNOS expression by regulating NF- κ B activation [13]. PKC- ϵ appears to play a major role in macrophage biology, since several LPS-activated signaling pathways, involving NF- κ B, ERK MAP kinases, and p38 MAP kinase, are impaired in PKC- ϵ -deficient macrophages [17]. Taken together, these data support the notion that in a macrophage, individual PKC isoenzymes contribute to the regulation of LPS-induced responses by modulating specific signaling and transcriptional events.

4 Materials and methods

4.1 Cell culture

Normal (transfected with vector) and DN PKC- α -overexpressing RAW 264.7 cells (clones A2, B1, C2) [12] were cultured in a 37°C incubator with 5% CO₂ in DMEM with glutamine (Life Technologies Inc., ON, Canada), supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Hyclone, Logan, UT), 10 mM HEPES pH 7.3, and antibiotics (complete medium). G418 was added at a concentration of 250 μ g/ml.

4.2 Nuclear protein extracts and EMSAs

Adherent macrophages (10^7 per 100-mm tissue culture dish) were stimulated with 100 ng/ml LPS (*E. coli*, strain 0127:B8, Sigma, St-Louis, MO, USA) for the indicated time points, washed, and scraped into 1.5 ml of cold PBS. The cell suspensions were transferred to microcentrifuge tubes, pelleted, and the nuclear protein extracts were prepared essentially as described [12, 40]. Protein concentrations were determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA) and the extracts were aliquoted and stored at -80°C prior to being used. EMSA were performed with ³²P-labeled double-stranded oligonucleotide probes representing the consensus sequences of the following transcription factors: AP-1 (5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3') and NF-IL6 (5'-TGCAGATTGCGCAATCTGCA-3'). For NF-IL6, the ³²P-labeled oligonucleotide probes were incubated at room temperature for 20 min with 6 μ g of nuclear protein

extracts. For AP-1, the ^{32}P -labeled oligonucleotide probe was incubated at 4°C for 2 h with 3 μg of nuclear protein extracts. Composition of the binding buffers, which contained 1 μg of poly dIdC per 3 μg of nuclear protein extracts, was as described: NF-IL6 [41] and AP-1 [20]. The DNA-protein complexes were resolved in 6 % native polyacrylamide gels in a buffer containing 44 mM Tris-HCl, 44 mM borate and 1 mM EDTA. The specificity of binding was determined by competition with 50-fold excess unlabeled oligonucleotides. After electrophoresis, the gels were exposed to films at -80°C .

4.3 Western blot analyses

Western blot analyses were performed as previously described [12], with the exception that cellular extracts were sonicated to obtain nuclear proteins. Nuclear extracts were prepared essentially as described [26]. Rabbit anti-mouse C/EBP β and C/EBP δ polyclonal antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

4.4 Transient transfections and luciferase assays

The NF-IL6 luciferase reporter construct was kindly provided by Dr. J. M. Stark (Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH) [25]. The AP-1 luciferase reporter construct was kindly provided by Dr. M. W. Anders (University of Rochester, Rochester, NY) [21]. The pCMV/PKC- α expression vector was constructed by cloning the wild type human PKC- α cDNA ([42], purchased from the American Type Culture Collection)

into the *HindIII-XbaI* sites of the expression vector pRc/CMV (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The constitutively active (CA) PKC- α (A25E) expression vector was kindly provided by Dr. G. Baier (University of Innsbruck, Austria) [43]. All plasmids were prepared using Endofree Plasmid Extraction Kit from Qiagen (Mississauga, ON, Canada). For transient transfections with the AP-1 and NF-IL6 luciferase reporter constructs, adherent cells were transfected with 0.15 to 0.30 μ g of plasmid DNA, using Gene Porter (Gene Therapy Systems, San Diego, CA, USA). To control for transfection efficiency, all transfections included 0.15 μ g of the pRL-TK plasmid, which encodes for *Renilla* luciferase (Promega Corp., Madison, WI). For co-transfection experiments, adherent cells were transfected with 0.5 μ g of either pRC/CMV, pCMV/PKC- α , or pEF1/PKC α (A25E), 0.25 μ g of the NF-IL6 luciferase reporter construct, and 0.15 μ g of pRL-TK, using Gene Porter. After transfection, the cells were incubated for the indicated period of time in fresh media containing 5 % FBS prior to the addition of 100 ng/ml LPS. Luciferase activity was quantified with the Promega luciferase kit according to the manufacturer instructions (Promega Corp.). Briefly, cells were lysed with supplied lysis buffer, scrapped on ice and transferred in a microfuge tube. Aliquots of extracts were then transferred in a polycarbonate tube and the substrate was added prior to reading. Luciferase activity was measured on a Lumat LB 9507 luminometer (EG&G Berthold).

4.5 Northern blot analyses

Total RNA was extracted with RNazol (Teltest, Friendswood, TX, USA) and Northern blot analyses were carried out essentially as described [12]. The IL-1 β probe consisted of the 545 bp *Xba*I fragment from the mouse IL-1 β cDNA amplified by PCR using oligodeoxynucleotides AD-66 (5'-gctctagaTCAACAAGAGCTTCAGGCAGG-3') (forward) and AD-67 (5'-gctctagaGCAGACTCAA ACTCCACTTGC-3') (reverse). The G-CSF probe consisted of the 481 bp *Eco*RI fragment from the mouse G-CSF cDNA amplified by PCR using oligodeoxynucleotides AD-103 (5'-gccaattcAAGTGAAGGCTGGCATGGCG-3') (forward) and AD-104 (5'-gccaattcACTATGGTCAGGACGAGAGGC-3') (reverse). The actin probe consisted of the 868 bp *Eco*RI fragment from the mouse actin cDNA amplified by PCR using oligodeoxynucleotides AD-149 (ggaattccCCAATTGAACATGGCATTGTTAC) (forward) and AD-150 (ggaattccGCTGATCCACATCTGCTGGAAG) (reverse). The membranes were exposed to a phosphor screen, which was scanned on a PhosphoImager (Molecular Dynamics).

Acknowledgments

This work was supported by Grant MT-12933 from the Canadian Institutes of Health Research and by an establishment grant from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche. F.C. was partly supported by the Fondation Armand-Frappier. A.D. is Chercheur-boursier of the Fonds de la recherche en santé du Québec and holder of a Canada Research Chair. We are grateful to Dr. J. M. Stark for providing the NF-IL6 luciferase reporter construct, Dr. M. W. Anders for providing the AP-1 luciferase reporter construct and Dr. G. Baier for providing the constitutively active PKC- α (A25E) expression vector. We also thank M. Giroux for helpful discussions and critical comments on this manuscript.

References

- 1 **Sweet, M. J. and Hume, D. A.**, Endotoxin signal transduction in macrophages. *J Leukoc Biol* 1996. **60**: 8-26.
- 2 **Medzhitov, R.**, Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 2001. **1**: 135-145.
- 3 **Horng, T., Barton, G. M. and Medzhitov, R.**, TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001. **2**: 835-41.
- 4 **Fujihara, M., Connolly, N., Ito, N. and Suzuki, T.**, Properties of protein kinase C isoforms (beta II, epsilon, and zeta) in a macrophage cell line (J774) and their roles in LPS-induced nitric oxide production. *J Immunol* 1994. **152**: 1898-1906.
- 5 **Shinji, H., Akagawa, K. S. and Yoshida, T.**, LPS induces selective translocation of protein kinase C-beta in LPS- responsive mouse macrophages, but not in LPS- nonresponsive mouse macrophages. *J Immunol* 1994. **153**: 5760-71.
- 6 **Shapira, L., Takashiba, S., Champagne, C., Amar, S. and Van Dyke, T. E.**, Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF-alpha and IL-1 beta production by human monocytes. *J Immunol* 1994. **153**: 1818-24.

- 7 **Liu, M. K., Herrera, V. P., Brownsey, R. W. and Reiner, N. E.,** CD14-dependent activation of protein kinase C and mitogen-activated protein kinases (p42 and p44) in human monocytes treated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994. **153:** 2642-52.
- 8 **Herrera-Velit, P., Knutson, K. L. and Reiner, N. E.,** Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of protein kinase C- zeta in bacterial lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol Chem* 1997. **272:** 16445-52.
- 9 **Valledor, A. F., Xaus, J., Comalada, M., Soler, C. and Celada, A.,** Protein kinase C epsilon is required for the induction of mitogen- activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Immunol* 2000. **164:** 29-37.
- 10 **Kovacs, E. J., Radzioch, D., Young, H. A. and Varesio, L.,** Differential inhibition of IL-1 and TNF-alpha mRNA expression by agents which block second messenger pathways in murine macrophages. *J Immunol* 1988. **141:** 3101-5.
- 11 **Novotney, M., Chang, Z. L., Uchiyama, H. and Suzuki, T.,** Protein kinase C in tumoricidal activation of mouse macrophage cell lines. *Biochemistry* 1991. **30:** 5597-5604.
- 12 **St-Denis, A., Chano, F., Tremblay, P., St-Pierre, Y. and Descoteaux, A.,** Protein kinase C- α modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 1998. **273:** 32787-32792.

- 13 **Chen, C. C., Wang, J. K. and Lin, S. B.**, Antisense oligonucleotides targeting protein kinase C- α , - β I, or - δ but not - η inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages: involvement of a nuclear factor κ B-dependent mechanism. *J Immunol* 1998. **161**: 6206-14.
- 14 **Monick, M. M., Carter, A. B., Flaherty, D. M., Peterson, M. W. and Hunninghake, G. W.**, Protein kinase C zeta plays a central role in activation of the p42/44 mitogen-activated protein kinase by endotoxin in alveolar macrophages. *J Immunol* 2000. **165**: 4632-9.
- 15 **Giroux, M. and Descoteaux, A.**, Cyclooxygenase-2 expression in macrophages: regulation by protein kinase C- α . *J Immunol* 2000. **165**: 3985-3991.
- 16 **Mestre, J. R., Mackrell, P. J., Rivadeneira, D. E., Stapleton, P. P., Tanabe, T. and Daly, J. M.**, Redundancy in the signaling pathways and promoter elements regulating cyclooxygenase-2 gene expression in endotoxin-treated macrophage/monocytic cells. *J Biol Chem* 2001. **276**: 3977-82.
- 17 **Castrillo, A., Pennington, D. J., Otto, F., Parker, P. J., Owen, M. J. and Bosca, L.**, Protein kinase Cepsilon is required for macrophage activation and defense against bacterial infection. *J Exp Med* 2001. **194**: 1231-42.
- 18 **Breton, A. and Descoteaux, A.**, Protein kinase C-alpha participates in Fc γ 3R-mediated phagocytosis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2000. **276**: 472-6.
- 19 **Karin, M., Liu, Z. and Zandi, E.**, AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997. **9**: 240-6.

- 20 **Bailly, S., Fay, M., Israel, N. and Gougerot-Pocidallo, M. A.**, The transcription factor AP-1 binds to the human interleukin 1 alpha promoter. *Eur Cytokine Netw* 1996. **7**: 125-8.
- 21 **Tu, Z. and Anders, M. W.**, Enhancement of gene expression by transcription factor AP-1 is dependent on orientation of AP-1 element. *Biochem Biophys Res Commun* 1997. **238**: 285-8.
- 22 **Lekstrom-Himes, J. and Xanthopoulos, K. G.**, Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem* 1998. **273**: 28545-8.
- 23 **Wadleigh, D. J., Reddy, S. T., Kopp, E., Ghosh, S. and Herschman, H. R.**, Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin- treated RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* 2000. **275**: 6259-66.
- 24 **Trautwein, C., Caelles, C., van der Geer, P., Hunter, T., Karin, M. and Chojkier, M.**, Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain. *Nature* 1993. **364**: 544-7.
- 25 **Chini, B. A., Fiedler, M. A., Milligan, L., Hopkins, T. and Stark, J. M.**, Essential roles of NF-kappaB and C/EBP in the regulation of intercellular adhesion molecule-1 after respiratory syncytial virus infection of human respiratory epithelial cell cultures. *J Virol* 1998. **72**: 1623-6.
- 26 **Caivano, M., Gorgoni, B., Cohen, P. and Poli, V.**, The induction of cyclooxygenase-2 mRNA in macrophages is biphasic and requires both CCAAT enhancer-binding protein beta (C/EBP beta) and C/EBP delta transcription factors. *J Biol Chem* 2001. **276**: 48693-701.

- 27 **Akira, S., Isshiki, H., Sugita, T., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., Nakajima, T., Hirano, T. and Kishimoto, T.,** A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *Embo J* 1990. **9**: 1897-906.
- 28 **Tsukada, J., Saito, K., Waterman, W. R., Webb, A. C. and Auron, P. E.,** Transcription factors NF-IL6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1 beta gene. *Mol Cell Biol* 1994. **14**: 7285-97.
- 29 **Tanaka, T., Akira, S., Yoshida, K., Umemoto, M., Yoneda, Y., Shirafuji, N., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N. and Kishimoto, T.,** Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell* 1995. **80**: 353-61.
- 30 **Plevy, S. E., Gemberling, J. H., Hsu, S., Dorner, A. J. and Smale, S. T.,** Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins. *Mol Cell Biol* 1997. **17**: 4572-88.
- 31 **Dlaska, M. and Weiss, G.,** Central role of transcription factor NF-IL6 for cytokine and iron-mediated regulation of murine inducible nitric oxide synthase expression. *J Immunol* 1999. **162**: 6171-7.
- 32 **Yang, Z., Wara-aswapati, N., Chen, C., Tsukada, J. and Auron, P. E.,** NF-IL6 (C/EBPbeta) vigorously activates il1b gene expression via a Spi- 1 (PU.1) protein-protein tether. *J Biol Chem* 2000. **275**: 21272-7.
- 33 **Gorgoni, B., Caivano, M., Arizmendi, C. and Poli, V.,** The transcription factor C/EBPbeta is essential for inducible expression of the cox-2 gene in macrophages but not in fibroblasts. *J Biol Chem* 2001. **276**: 40769-77.

- 34 **Nakajima, T., Kinoshita, S., Sasagawa, T., Sasaki, K., Naruto, M., Kishimoto, T. and Akira, S.**, Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. **90**: 2207-11.
- 35 **Trautwein, C., van der Geer, P., Karin, M., Hunter, T. and Chojkier, M.**, Protein kinase A and C site-specific phosphorylations of LAP (NF-IL6) modulate its binding affinity to DNA recognition elements. *J Clin Invest* 1994. **93**: 2554-61.
- 36 **Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D. and Rapp, U. R.**, Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 1993. **364**: 249-52.
- 37 **Buck, M., Poli, V., van der Geer, P., Chojkier, M. and Hunter, T.**, Phosphorylation of rat serine 105 or mouse threonine 217 in C/EBP beta is required for hepatocyte proliferation induced by TGF alpha. *Mol Cell* 1999. **4**: 1087-92.
- 38 **Jans, D. A., Xiao, C. Y. and Lam, M. H.**, Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays* 2000. **22**: 532-44.
- 39 **Williams, S. C., Angerer, N. D. and Johnson, P. F.**, C/EBP proteins contain nuclear localization signals imbedded in their basic regions. *Gene Expr* 1997. **6**: 371-85.
- 40 **Andrews, N. C. and Faller, D. V.**, A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1991. **19**: 2499.

- 41 **Adams, D. S., Pero, S. C., Petro, J. B., Nathans, R., Mackin, W. M. and Wakshull, E.**, PGG-Glucan activates NF-kappaB-like and NF-IL-6-like transcription factor complexes in a murine monocytic cell line. *J Leukoc Biol* 1997. **62**: 865-73.
- 42 **Finkenzeller, G., Marme, D. and Hug, H.**, Sequence of human protein kinase C alpha. *Nucleic Acids Res* 1990. **18**: 2183.
- 43 **Baier Bitterlich, G., Uberall, F., Bauer, B., Fresser, F., Wachter, H., Grunicke, H., Utermann, G., Altman, A. and Baier, G.**, Protein kinase C-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 1996. **16**: 1842-50.

Figure legends

Fig. 1. (A) Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced AP-1 DNA binding activity. Adherent cells (vector alone, lanes 1-4 and DN PKC- α -overexpressing clone C2, lanes 5-8) were incubated in the absence (lanes 1 and 5) or in the presence of 100 ng/ml LPS (lanes 2-4 and 6-8) for the indicated time points. Nuclear extracts and EMSA for AP-1 were performed as described in *Materials and Methods*. In lane 9, a 50-fold excess of unlabelled probe was co-incubated with the reaction mixture containing nuclear extracts from control cells stimulated with LPS for 4 h prior to EMSA. Similar results were obtained in four separate experiments. (B) Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced AP-1 transcriptional activation. Adherent cells (vector alone and DN PKC- α -overexpressing clones B1 and C2) were transiently transfected with the AP-1 luciferase reporter construct and pRL-TK for 5 h and further incubated in fresh medium for 16 h, as described in *Materials and Methods*. Cells were then incubated in the absence (open bars) or in the presence of 100 ng/ml LPS (closed bars) for 6 h. Firefly and *Renilla* luciferase activities were determined in cell extracts. Data are expressed as a ratio of firefly luciferase value/*Renilla* luciferase value. Experiments were performed in triplicate and are representative of results obtained in three separate experiments.

Fig. 2. (A) Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced NF-IL6 DNA binding activity. Adherent cells (vector alone, lanes 1-4 and DN PKC- α -overexpressing clone C2, lanes 5-8) were incubated in the absence (lanes 1 and 5) or in the presence of 100 ng/ml LPS (lanes 2-4 and 6-8) for the indicated time points. Nuclear extracts and EMSA for NF-IL6 were performed as described in *Materials and Methods*. In lane 9, a 50-fold

excess of unlabelled probe was co-incubated with the reaction mixture containing nuclear extracts from control cells stimulated with LPS for 4 h prior to EMSA. Similar results were obtained in four separate experiments. (B) Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced NF-IL6 transcriptional activation. Adherent cells (vector alone and DN PKC- α -overexpressing clones A2, B1, and C2) were transiently transfected with the NF-IL6 luciferase reporter construct and pRL-TK for 5 h and further incubated in fresh medium for 7 h, as described in *Materials and Methods*. Cells were then incubated in the absence (open bars) or in the presence of 100 ng/ml LPS (closed bars) for 12 h. Firefly and *Renilla* luciferase activities were determined in cell extracts. Data are expressed as a ratio of firefly luciferase value/*Renilla* luciferase value. Experiments were performed in triplicate and are representative of results obtained in three separate experiments.

Fig. 3. Overexpression of both WT PKC- α and CA PKC- α (A25E) increase LPS-induced NF-IL6 transcriptional activity. Adherent RAW 264.7 cells were transiently transfected with the NF-IL6 luciferase reporter construct and pRL-TK for 5 h along with either the control vector, the WT PKC- α expression vector, or the CA PKC- α (A25E) expression vector and further incubated in fresh medium for 16 h, as described in *Materials and Methods*. Cells were then incubated in the absence (open bars) or in the presence of 100 ng/ml LPS (closed bars) for 10 h. Firefly and *Renilla* luciferase activities were determined in cell extracts. Data are expressed as a ratio of firefly luciferase value/*Renilla* luciferase value. Experiments were performed in triplicate and are representative of results obtained in three separate experiments. * indicates $p \leq 0.005$.

Fig. 4. NF-IL6 and C/EBP δ expression in DN PKC- α -overexpressing macrophages. Control cells and DN PKC- α -overexpressing clones B1 and C2 were incubated in the absence or the presence of 100 ng/ml LPS for 4 h. (A) Total cellular extracts and (B) nuclear extracts were prepared and the levels of NF-IL6 and c/EBP δ were determined by Western Blot analyses as described in *Materials and Methods*. Equivalent gel loading and transfer were assessed by Ponceau S staining of membrane prior to immunoblotting. Similar results were obtained in two independent experiments.

Fig. 5. Effect of DN PKC- α overexpression on LPS-induced IL-1 β and G-CSF expression. Adherent macrophages were incubated in the absence (*lanes 1, 4, 7, 10 and 13*) or in the presence of 10 ng/ml LPS (*lanes 2-3, 5-6, 8-9, 11-12 and 14-15*) for the indicated time points. Total RNA was extracted and Northern blotting was performed as described in *Materials and Methods*. (A) IL-1 β , (B) G-CSF. RNA integrity and loading were assessed by ethidium bromide staining. Membranes were stripped and hybridized with an actin probe to assess RNA transfer. Control macrophages consisted of a pool of RAW 264.7 cells transfected with empty vector (pCin4), as well as a clone of RAW 264.7 transfected with the empty vector (pCin4E1). For the DN PKC- α -overexpressing macrophages, three clones (A2, B1, and C2) were included in the analysis. Similar results were obtained in three separate experiments.

Figure 1

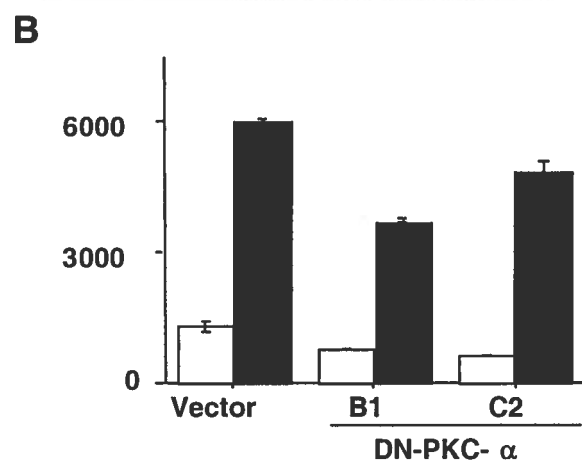
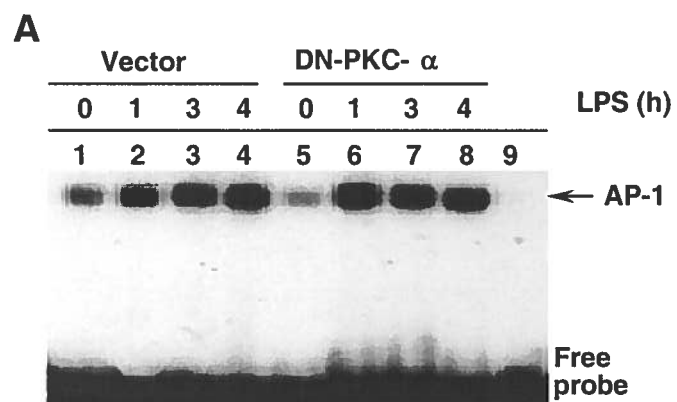


Figure 2

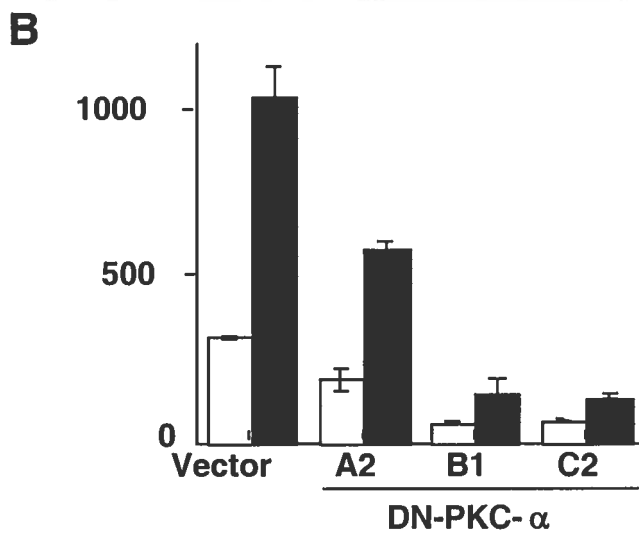
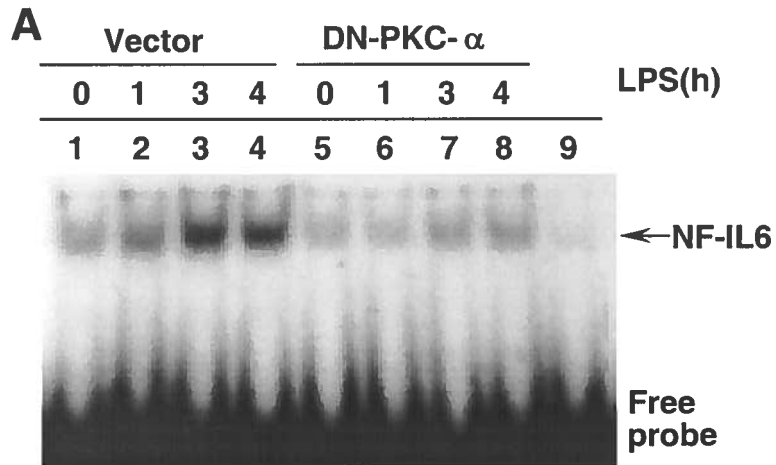


Figure 3

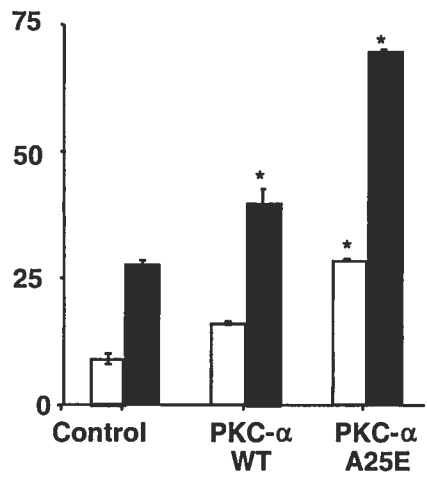


Figure 4

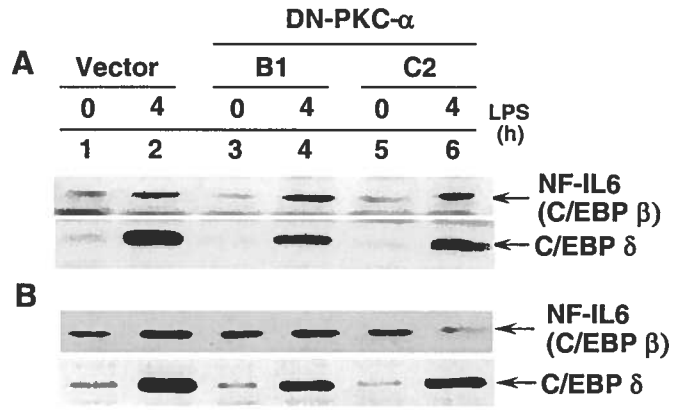
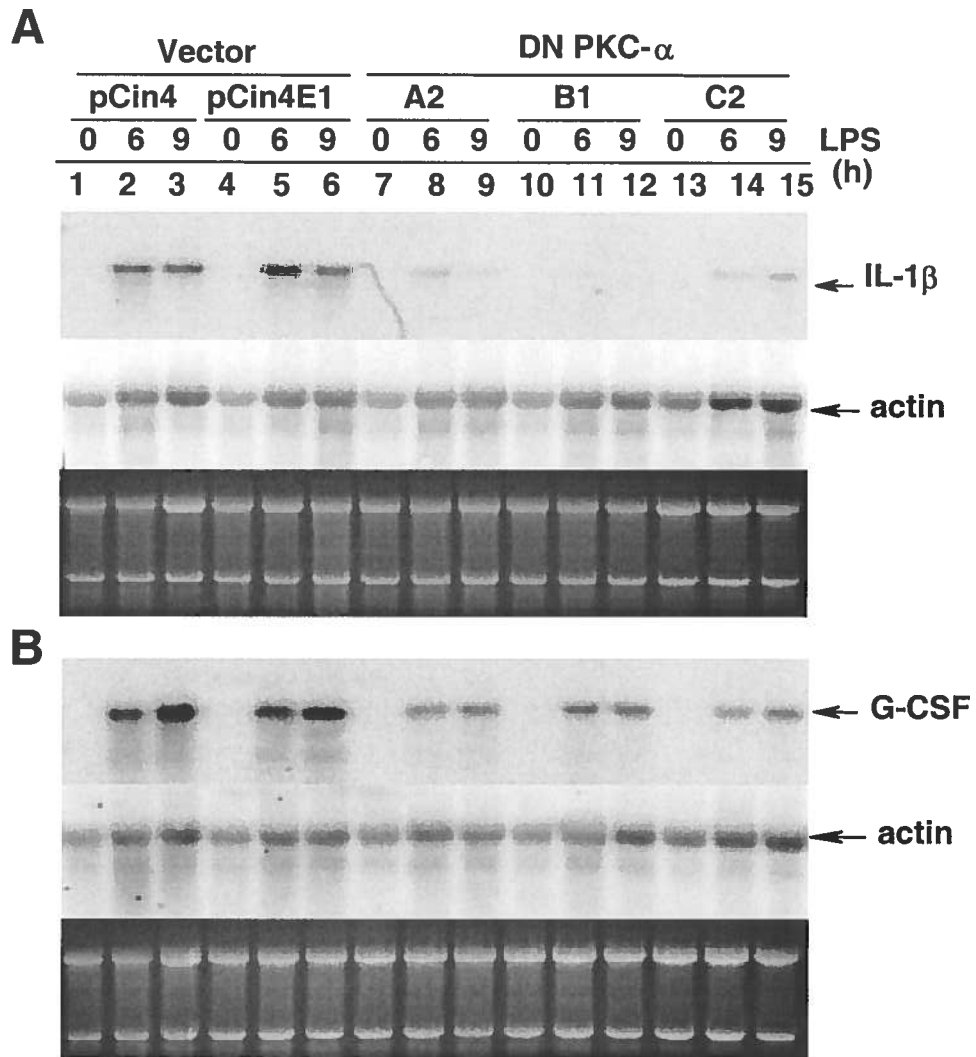


Figure 5



SECOND CHAPITRE

RÉSUMÉ DE LA TROISIÈME PUBLICATION

Nous avons précédemment démontré que l'infection de cellules naïves par *L. donovani* de type sauvage n'entraîne pas l'activation des MAPk ni du NF- κ B, mais que l'infection avec des parasites *Leishmania* déficients en LPG induit de façon significative l'activation de ERK 1/2. Puisque le LPG joue un rôle central dans l'évasion de l'activation du macrophage, nous avons voulu déterminer son rôle dans l'activation des facteurs de transcription et dans l'expression d'iNOS et de TNF- α chez des macrophages naïfs et pré-stimulés à l'IFN- γ . L'infection de cellules naïves avec des parasites de type sauvage menait à une faible activation d'AP-1 tandis que l'infection avec des *Leishmania* LPG^{-/-} a entraîné une activation beaucoup plus importante d'AP-1. Lorsque nous avons mesuré l'activité d'IRAK lors d'infection de cellules naïves, nous avons constaté que cette activité était plus forte chez les cellules infectées avec des *L. donovani* LPG2^{-/-}. Par contre, la mesure de l'activité d'IRAK lors d'infection de cellules pré-stimulées à l'IFN- γ a révélé que cette activité était plus importante chez les cellules infectées avec des parasites de type sauvage. Et finalement, la synthèse d'ARNm d'iNOS était plus importante lorsque les cellules pré-stimulées à l'IFN- γ étaient infectées avec des parasites de type sauvage. Ces résultats démontrent que le LPG de *L. donovani* joue un rôle dans l'évasion de l'activation du macrophage.

Contribution des auteurs :

F.Chano : Totalité des travaux. Rédaction .

A. Descoteaux : Directeur de F. Chano. Révision et édition du manuscrit.

TROISIÈME PUBLICATION

Activation of transcription factors by *Leishmania* parasites

Frédéric Chano and Albert Descoteaux

INRS- Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, Canada H7V 1B7

Correspondence: Albert Descoteaux, INRS- Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada. Tel.: 450-687-5010 (ext. 4465); Fax: 450-686-5501; E-mail: albert.descoteaux@iaf.ubc.ca

Key words: *Leishmania*, LPG, transcription factors, IRAK

Abbreviations: LPS: Lipopolysaccharide, LPG: lipophosphoglycan, WT: wild type, IRAK: interleukin-1 receptor associated kinase, BMM: Bone marrow-derived macrophages

ABSTRACT

We have previously demonstrated that WT *Leishmania* promastigotes evade activation of MAPk and NF- κ B pathways whereas LPG deficient promastigotes significantly induce ERK 1/2 activation. Since LPG plays a central role in the parasites' ability to evade macrophage activation, we sought to determine its role in transcription factor activation and in iNOS and TNF- α production in both naïve and IFN- γ -primed murine macrophages. In naïve cells, WT promastigotes induced a small AP-1 activation, whereas LPG-deficient promastigotes induced a pronounced AP-1 activation. When naïve cells were infected with LPG-deficient promastigotes, IRAK activity was stronger than cells infected with WT or LPG2⁻pLPG2 add-back promastigotes. In contrast, IRAK activity was more important when IFN- γ -primed cells were infected with WT promastigotes. Finally, iNOS mRNA production in IFN- γ -primed cells was significantly higher when cells were infected with WT promastigotes. Collectively, the data presented here indicated that *Leishmania* LPG plays an important role in evasion of macrophage activation.

INTRODUCTION

Protozoan parasites of the genus *Leishmania* are responsible for a wide spectrum of diseases termed leishmaniasis which afflict millions of people world wide. *L. donovani* is the causative agent of visceral leishmaniasis, the most severe form. This parasite, like all others of the same genus, has a digenic life, alternating between the promastigote form in the midgut of the *Phlebotomus* sand fly, and as amastigotes in the phagolysosomal compartment of mammalian monocytic cells. An important particularity of this parasite is that it enters its host cell relatively silently, avoiding a potentially destructive inflammatory response.

Leishmania parasites possess a wide variety of virulence factors which serve many different purposes. Amongst those is the lipophosphoglycan (LPG), the major surface molecule, which forms a dense glycocalyx around the parasite, essentially, protecting it from its hosts innate immune response: resistance from complement-mediated lysis (Desjardins and Descoteaux 1998), retardation of phagosome maturation (Desjardins and Descoteaux 1997) and modulation of immune response (Reiner and Locksley 1995). It has been previously reported that, upon entry into cells, shed LPG binds to protein kinase C and blocks subsequent activation of this signaling mediator (Descoteaux *et al.* 1992). Furthermore, it has also been demonstrated that *Leishmania* promastigotes not only inhibit IL-12 production, an important Th1 cytokine, but hinder IL-12 production by other stimuli, such as IFN- γ (Carrera *et al.* 1996) (Piedrafita *et al.* 1999). We have previously reported that phagocytosis of WT *L. donovani* promastigotes by naïve cells does not

induce MAPk activation, nor does it activate the NF- κ B pathway. Moreover, infection of naïve cells with WT promastigotes induced a small dephosphorylation of p38. In contrast, ingestion of LPG-deficient promastigotes significantly induced ERK 1/2 activation (Prive and Descoteaux 2000). As to further our knowledge on the role of *L. donovani* LPG during infection, we have chosen to study its role in transcription factor activation in naïve and IFN- γ -primed murine macrophages. We have focused our attention on AP-1, NF-IL6 and NF- κ B, all of which are essential for pro-inflammatory response. Indeed, most, if not all, inflammatory response genes contain in their promoter area at least one binding site for one of these transcription factors. In this report, we demonstrate that cell surface expression of LPG is required for evasion of AP-1 activation in naïve cells. Moreover, we have provided evidence for a potentially novel *Leishmania* receptor, which, upon binding, will lead to IRAK activation.

MATERIALS AND METHODS

Parasites

L. donovani (1s strain) were grown in a 26°C incubator in RPMI 1640 (Invitrogen, Mississauga, ON, Canada) supplemented with 20% heat inactivated FCS, 100 µM adenine, 20 µM MES, 5 µM hemin, 3 µM biopterin, 1 µM biotin and antibiotics (*Leishmania* medium, pH 5.5). The lipophosphoglycan repeating-unit defective mutant, generated by targeted deletion of the *LPG2* gene as previously described (Descoteaux *et al.* 1995), was grown in the *Leishmania* medium. The *lpg2*-KO + p*LPG2*, in which LPG expression was restored to WT levels, was made by transfecting the *LPG2* KO with pLeish*LPG2*. For infections, promastigotes were used in stationary phase of growth at a parasite-to-macrophage ratio of 10:1.

Macrophages

The murine macrophage cell line RAW 264.7 was cultured in a 37°C incubator with 5% CO₂ in complete medium (DMEM with glutamine (Invitrogen) supplemented with 10% heat inactivated FCS, 20 mM HEPES and antibiotics). Bone marrow-derived macrophages were obtained by growing marrow cells from 6-8 wks old female BALB/c mice at 37°C in complete medium supplemented with 15% (v/v) L929 cell-conditioned medium (LCM) for 7 days. BMM were made quiescent by culturing them in complete medium without LCM for 24h prior to being used. Cells were stimulated with either

lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli*, strain 0127:B8, Sigma, St-Louis, Mo) or 50U/ml IFN- γ (R&D systems, Minneapolis, MN) for indicated time points

Nuclear protein extracts and electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

Adherent macrophages (10^7 per 100-mm tissue culture dish) were washed and scraped into 1.5 ml of cold PBS. The cell suspensions were transferred to microcentrifuge tubes, pelleted, and the nuclear protein extracts were prepared essentially as described (St-Denis *et al.* 1998) (Andrews and Faller 1991). Protein concentrations were determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) and the extracts were aliquoted and stored at -80°C prior to being used. EMSA were performed with ^{32}P -labeled double-stranded oligonucleotide as described elsewhere (Chano and Descoteaux). The DNA-protein complexes were resolved in 4-6 % native polyacrylamide gels in a buffer containing 44 mM Tris-HCl, 44 mM borate and 1 mM EDTA. The gels were exposed to a phosphor screen which was scanned on a PhosphoImager (Molecular Dynamics).

Northern blot analyses

Total RNA was extracted with RNazol (Teltest, Friendswood, TX) and Northern blot analyses were carried out essentially as described (St-Denis, Chano, Tremblay, St-Pierre and Descoteaux 1998). The TNF- α probe was the 1.5 kilobase *Pst*I fragment from pmTNF- α (Fransen *et al.* 1985) obtained from W. Fiers and the iNOS probe was the 817-base pair *Hic*II-*Eco*RI fragment from piNOSL3 (Xie *et al.* 1992) provided by D.

Radzioch. The membranes were exposed to a phosphor screen which was scanned on a PhosphoImager (Molecular Dynamics).

In vitro kinase assays

In vitro kinase assays were performed essentially as described elsewhere (Swantek *et al.* 2000) (Swantek *et al.*, 1999). Briefly, adherent cells (10^7 per 100mm per tissue culture dish) were washed once with phosphate-buffered saline and homogenized in lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitors. Total IRAK was immunoprecipitated using recombinant immobilized protein A coated with anti-IRAK antibody (Upstate Biotechnology). Precipitates were washed twice with lysis buffer, than twice with kinase buffer (Swantek, Tsen, Cobb and Thomas 2000). Kinase reactions were performed in 20 μ l of kinase buffer with a final concentration of 0.3 μ g/ μ l of MBP and 10 μ Ci of γ - 32 P-ATP, at 30°C for 45 min. 32 P-labelled MBP was separated from free 32 P-ATP on a 15% SDS-PAGE. The gels were exposed to a phosphor screen which was scanned on a PhosphoImager (Molecular Dynamics) and levels were subsequently corrected to uninfected cells.

LPG-coated latex beads

Purified LPG (gift from S. Turco) was coated to polystyrene beads (1 μ M, Polyscience) as described elsewhere (Fratti *et al.* 2001). Briefly, purified LPG was added to polystyrene beads in carbonate buffer. Mixture was than rotated for an hour at room temperature, washed and non specific sites were blocked with 3% BSA in PBS for two

hours, at room temperature. Beads were washed twice in 0,3% BSA in PBS prior to infection. Efficiency of LPG coating was verified by agglutination with an anti-LPG antibody (CA7AE). Where indicated, cells were pre-stimulated with 50U/ml of IFN- γ prior to infection.

Quantification of TNF- α and determination of nitrite

The amount of TNF- α in cell supernatants was determined by enzyme-linked immunosorbent assay as described (St-Denis, Chano, Tremblay, St-Pierre and Descoteaux 1998). Nitric oxide release in cell supernatants was determined with the Griss reagent as described (Green *et al.* 1990).

RESULTS

Infection of naïve cells activates AP-1 transcription factor

Leishmania parasites invade macrophages in a relatively silent manner (Reiner and Locksley 1995). Indeed, as we have previously shown, only LPG-deficient *L. donovani* promastigotes will activate the ERK 1/2 pathway during infection of naïve macrophages (Prive and Descoteaux 2000). In this study, we sought to determine if invasion of macrophages by *Leishmania donovani* parasites would trigger activation of transcription factors, namely AP-1, NF-IL6 and NF- κ B. We first compared AP-1 DNA binding activity by EMSA in uninfected and in infected RAW 264.7 cells. LPS-stimulated extracts were used as a positive control. Addition of WT promastigotes to naïve cells induced a slight AP-1 DNA-binding activity (fig 1a), which was more prevalent in LPG-deficient infected cells (fig 1b). This is consistent with previously obtained data: LPG-deficient promastigotes significantly induced a rapid and transient ERK 1/2 phosphorylation, which is implicated in the formation of the AP-1 heterodimer (Karin *et al.* 1997). In contrast, no NF-IL6 (fig 1c-d) or NF- κ B (fig 1e-f) DNA-binding activities were induced by either type of promastigote during infection of naïve cells. There was, in fact, a slight reduction of basal NF- κ B in WT *L. donovani* infected cells (fig 1e). This is in agreement with results obtained by others in which NF- κ B levels were diminished in *Leishmania*-infected cells (Buates and Matlashewski 2001).

Infection of IFN- γ -primed cells activates NF- κ B and AP-1 transcription factors

BALB/c-derived macrophages are notoriously susceptible to certain intracellular microbes, such as *Leishmania* parasites, presumably due to the NRAMB defect (Vidal *et al.* 1993). However, pre-treatment with IFN- γ overcomes their susceptibility and induces potent leishmanicidal activity (Murray *et al.* 1985). To evaluate whether IFN- γ pre-treatment modifies the pattern of transcription factor activation, RAW 264.7 cells were prestimulated with 50 U/ml of IFN- γ 18 hours prior to infection with either wt *Leishmania* or LPG-deficient promastigotes. Infection of IFN- γ primed macrophages revealed that the DNA-binding activities of both AP-1 and NF- κ B were significantly increased as early as 30 minutes post-infection (fig 2a and 2b). Analysis of NF-IL6 binding activity in IFN- γ -primed cells was not possible since IFN- γ alone induces potent NF-IL6 binding activity in RAW 264.7 cells (Hu *et al.* 2001).

iNOS but not TNF- α mRNA accumulation and production in IFN- γ -primed cells is LPG-dependent

LPG is the major cell surface glycoconjugate of all *Leishmania* species and is a well known virulence factor (Descoteaux and Turco 1999). It has recently been demonstrated that *L. donovani* LPG causes periphagosomal actin accumulation essentially protecting the parasite and blocking phagosome maturation (Holm *et al.* 2001). However, this phenomenon is not observed when macrophages are infected with LPG-deficient promastigotes, thus clarifying LPGs' role in the retardation of phagosome maturation. In an attempt to uncover another role of LPG during infection, naïve and IFN- γ pre-treated

macrophages were infected with WT and LPG-defective *L. donovani* promastigotes. No iNOS or TNF- α mRNA was detected during infection of naïve cells (fig 3a-d, lanes 4 and 6). However, infection with WT promastigotes induced higher mRNA iNOS than infection with LPG-deficient promastigotes in IFN- γ -primed RAW 264.7 and BMM cells (fig 3a and 3b, lanes 5 and 7). TNF- α mRNA levels in IFN- γ -primed cells infected with either WT or LPG-deficient promastigotes were of comparable levels in both cell types (fig 3c and 3d, lanes 5 and 7).

To determine whether the observed effect is solely mediated by LPG or by another expressed repeating unit or both, TNF- α and NO were measured from the supernatants of cells infected with LPG-coated latex beads. The measured TNF- α and NO levels from the supernatants of cells infected with LPG-coated latex beads (fig. 4, bricked bars) were similar to levels observed from supernatants obtained from cells infected with naked beads (fig. 4, lined bars). In contrast, high amounts of both mediators were produced when IFN- γ cells were infected with WT promastigotes (fig. 4, closed bars) suggesting that another surface molecule is involved either alone in or collaboration with LPG.

Parasite entry activates IRAK

Internalisation of promastigotes by macrophages occurs through receptor-mediated phagocytosis, namely through CR1 and CR3 receptors (Descoteaux and Turco 1999). This is consistent with *Leishmania*'s silent entry, since complement receptors do not induce a proinflammatory response. However, infection of IFN- γ -primed macrophages with *Leishmania* promastigotes does induce an inflammatory response, such as

production of TNF- α and NO. Thus, it is plausible to assume that Pathogen Associated Motif Recognition (PAMP) receptors, such as toll-like receptors (TLR's), may also be involved in *Leishmania* recognition. To verify this possibility, IRAK *in vitro* kinase assays were performed since IRAK is associated to all TLR' and plays a role in NF- κ B activation (Zhang *et al.* 1999). As can be seen in fig. 5a and 5b, infection of naïve cells with WT promastigotes induces a very mild kinase activation in RAW 264.7 cells (1,4 fold at its peak) and even leads to a deactivation in BMM (fig 5a and b, lanes 2-4). In contrast, infection with LPG-deficient promastigotes induces a moderate IRAK activation in RAW 264.7 cells but not in BMM: at their peak, activation level was 1,8 fold over uninfected cells (fig 5a and b, lanes 5-7). As to clarify the role of LPG in IRAK activation, naïve cells were infected with LPG add-back promastigotes. IRAK activation in add-back infected cells was similar or even lower to levels observed in WT infected cells (fig 5a and b, lanes 8-10).

When we investigated IRAK activation during infection of IFN- γ treated cells, the situation was reversed: infection with WT promastigotes induced a stronger IRAK activation than infection with LPG-deficient promastigotes (fig 6a and 6b). Indeed, peak activation during infection with WT promastigotes was 2,6 and 1,9 fold in RAW 264.7 cells and BMM, respectively, whereas peak activation during infection with LPG deficient promastigotes was 2,0 and 1,7 in RAW 264.7 and BMM respectively. The evidence presented here suggests that *L. donovani* parasites may employ an as yet unidentified pathway, leading to receptor mediated IRAK activation. In light of IRAKs' tight association with TLR, we propose that this novel receptor may in fact be a TLR.

DISCUSSION

Successful evasion of macrophage activation is crucial to promastigote survival. Indeed, while promastigotes are surprisingly resistant to complement mediated lysis, they are, contrary to amastigotes, very susceptible to phagosomal hydrolysis. *Leishmania* parasites utilize a variety of mechanisms to survive the hosts' hostile environment. For example, *Leishmania*-infected cells produce important amounts of TGF- β , an important immune suppressor, thus delaying onset of the immune response (Wilson *et al.* 1998). As has been extensively reported, *Leishmania* LPG plays an integral part in survival and evasion. Many reports clearly indicate that *L. donovani* LPG inhibits signal transduction in the macrophage, most likely by inhibiting certain members of the PKC family (Moore *et al.* 1993) (Descoteaux *et al.* 1991; Descoteaux, Matlashewski and Turco 1992); (Olivier *et al.* 1992) and is involved in delaying phagosome maturation, presumably to permit the promastigote to differentiate into its amastigotes form (Desjardins and Descoteaux 1997; Holm, Tejle, Magnusson, Descoteaux and Rasmusson 2001). In addition, we previously demonstrated that while WT promastigotes evade MAPk and NF- κ B activation, LPG-deficient promastigotes significantly induce ERK 1/2 activation (Prive and Descoteaux 2000). As to further our understanding on the role of LPG in evasion of macrophage activation, we investigated the role of LPG in transcription factor activation in naïve and IFN- γ -primed macrophages, as well as mRNA production of key mediators in the anti-*Leishmania* defence, specifically iNOS and TNF- α . Our main finding was that LPG-deficient promastigotes induce AP-1 formation and transcriptional activation during infection of naïve cells. Moreover, infection of naïve cells with WT promastigotes

caused a noticeable down-regulation of basal NF- κ B levels. Transcription factor activation in IFN- γ -primed cells was similar when infected with WT or LPG-deficient promastigotes. Infection of IFN- γ -primed macrophages with WT promastigotes induced significantly more iNOS mRNA levels than infection with LPG-deficient parasites. And finally, we provide evidence for a novel pathway, which leads to IRAK activation, suggesting that these parasites may achieve entry via a TLR receptor.

Previous studies by us (Prive and Descoteaux 2000) and others have revealed similar results in regards to successful evasion and down-modulation of key macrophage mediators. IL-12, which is mainly produced by macrophages, is instrumental in directing the immune response towards a Th1-type response. *L. major* successfully inhibits IL-12 production and subsequent production by a mechanism that has yet to be identified, but which is NF- κ B independent. Interestingly enough, amastigotes induce IL-12 expression (Piedrafita, Proudfoot, Nikolaev, Xu, Sands, Feng, Thomas, Brewer, Ferguson, Alexander *et al.* 1999). In this regard, it would be of interest to verify if LPG-deficient promastigotes would react in a manner similar to WT amastigotes, in as much as similar surface molecules might be expressed on the surface of LPG-deficient promastigotes. Being ill equipped for phagosomal survival and being unable to delay phagosome maturation due to the absence of LPG could explain why LPG deficient promastigotes are especially vulnerable to phagosomal hydrolysis. Recently, Buates and Matlashewski have demonstrated that incubation of macrophages with *L. donovani* causes a general suppression of macrophage gene expression, NF- κ B being amongst the genes listed (Buates and Matlashewski 2001). Since NF- κ B regulates its own production, as well as

many other genes (Ghosh *et al.* 1998), our results indicated that, possibly, *L. donovani* infection would block basal NF- κ B translocation, thus delaying or blocking NF- κ B transcription and translation, eventually causing a down-regulation of many constitutively expressed genes regulated by NF- κ B. Interestingly, many other pathogens seem to block the NF- κ B pathway as a means of survival. *Yersinia enterocolitica* YopP protein inhibits macrophage apoptosis by blocking NF- κ B activation (Ruckdeschel *et al.* 2001), the measles virus blocks IFN- β and MHC-I expression by inhibiting I κ B degradation (Fang *et al.* 2001) and NF- κ B translocation was shown to be blocked during infection with *T. gondii* (Butcher *et al.* 2001). These results and ours suggest that inhibiting the NF- κ B pathway may be an important evasion strategy evolved by many intracellular parasites. Another recently elucidated manner in which *Leishmania* successfully evade a pro-inflammatory response is apoptotic mimicry (de Freitas Balanco *et al.* 2001). Phosphatidylserine (PS) is exposed at the cell surface of apoptotic cells and is ultimately phagocytized by macrophages via a CD14 dependant-TLR4 independent manner, thus avoiding TLR4 activation and the pro-inflammatory response that would result (Fadok *et al.* 2000). Upon exiting cells, amastigotes acquire PS and are recognized as apoptotic cells, at the same time avoiding a pro-inflammatory response and being engulfed by their desired cell.

We have previously reported that in IFN- γ -primed BMM, infection with LPG deficient promastigotes induced lower levels of NO than infection with WT promastigotes. In this report, we show that infection with *LPG 2^{-/-}* promastigotes induced lower mRNA levels, as expected, than infection with WT promastigotes. Proudfoot and colleagues

demonstrated that LPG glycoconjugates synergize with IFN- γ to stimulate macrophages to produce NO (Proudfoot *et al.* 1996). These findings and ours support the hypothesis that, in IFN- γ primed cells, LPG is recognized by a macrophage receptor, leading to IRAK activation and culminating in NO and TNF- α release. The reason why LPG deficient promastigotes induce less NO during infection might be two pronged. Clearly, LPG synergizes with IFN- γ to induce NO. In addition, LPG-deficient promastigotes are more readily destroyed by macrophages. NO being the most important mediator in *Leishmania* destruction for murine macrophages, the amount needed to eliminate LPG-deficient promastigotes might simply be lower than the amount needed to destroy WT promastigotes, which could, in part, explain the lower amount of NO produced during infection with LPG deficient promastigotes.

Toll-like receptors are a rapidly growing family which now counts at least 10 members (Mushegian and Medzhitov 2001). Each member has a distinct PAMP, allowing thus certain specificity to each receptor. Of the 10 receptors, TLR4 has been extensively studied and is the long sought after LPS co-receptor, which is responsible for LPS-induced signal transduction in macrophages and B cells (Poltorak *et al.* 1998; Qureshi *et al.* 1999). Knowledge about the ligands of the other members is rapidly growing. For example, TLR9 has been identified as the receptor for CpG DNA (Takeshita *et al.* 2001), TLR2 and TLR6 dimerize and recognize soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein (Bulut *et al.* 2001). Once activated, adapter proteins such as MyD88 recruit signaling molecules and initiate multiple signal transduction pathways. An important mediator linked to TLR is IRAK, which is recruited

to activated MyD88. To determine if *Leishmania* entry into cells could be mediated by a TLR, we performed IRAK *in vitro* kinase assays using both WT and LPG-deficient promastigotes. Our results indicate that, independently of IFN- γ priming, IRAK is strongly activated during infection with LPG-deficient promastigotes. In contrast, during infection of naïve cells with WT promastigotes, IRAK is mildly activated. However, when IFN- γ prestimulated cells were infected with WT promastigotes, a strong IRAK activation ensued. IRAK activation during infection of IFN- γ primed cells with LPG 2^{-/-} promastigotes was consistently lower than observed during infection with WT promastigotes. A certain amount of evidence leads us to believe that a TLR or TLR might be responsible for the observed IRAK activation. To begin with, preliminary data obtained in our laboratory indicates that a certain number of TLR receptors are upregulated in response to IFN- γ stimulation. Secondly, aside from the IL-1 and IL-18 receptors, TLR are the only known receptors to recruit IRAK upon ligand bound activation. Lastly, engagement of CR does not induce a proinflammatory response in macrophages. Clearly, infection of IFN- γ primed macrophages with either type of promastigotes induces a strong TNF- α and NO release. We do not exclude the possibility that WT promastigotes and LPG deficient promastigotes engage different receptors. Indeed, the absence of LPG at the cells' surface reveals molecules that are normally buried under the LPG. These molecules, such as GPIPLS, may be recognized by an as yet unknown receptor and induce different responses than the WT promastigote. Interestingly, WT amastigotes induce different responses than WT promastigotes, possibly due to the fact that amastigotes express no or undetectable LPG levels at their surface, leaving previously buried molecules readily detectable by receptors. A

comparative study between amastigotes and LPG deficient promastigotes might shed some light on this matter. As to clarify the role of LPG during infection of IFN- γ -primed cells, we infected naïve and IFN- γ -primed cells with LPG-coated latex beads. However, TNF- α and NO levels were similar to levels observed with naked beads. There are a few possibilities for the apparent lack of macrophage activation by LPG-coated beads.

Leishmania promastigotes express $\approx 10^6$ copies of LPG at the cell surface. LPG coating of latex beads may not be representative of such a large number of copies per cell and thus, the beads may not be as immuno-stimulatory as the parasite itself. Another possible explanation is that LPG is recognized along with another *Leishmania* surface molecule and that the receptor recognizes only both *Leishmania* surface molecules. Coating latex beads with a combination of *Leishmania* surface molecules could be instrumental in identifying other surface molecules implicated in receptor ligation.

In conclusion, we have provided evidence of a novel pathway induced by phagocytosis of *Leishmania* parasites, which leads to activation of IRAK. Moreover, we have presented data which indicates that *Leishmania* LPG is implicated in this pathway. Further study of other *Leishmania* surface molecule will be instrumental in clarifying the exact role of *Leishmania* LPG in evasion of macrophage activation.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. (A-B) Effect of *Leishmania* infection on AP-1 DNA binding activity.

Adherent cells were incubated in the absence (*lane 1*) or in the presence of either WT (*fig. 1c, lanes 6-9*) or LPG deficient promastigotes (*fig 1d, lanes 6-9*) for the indicated time points. Nuclear extracts and EMSA were performed as described in *Materials and Methods* (C-D) Effect of *Leishmania* infection on NF-IL6 DNA binding activity.

Adherent cells were incubated in the absence (*lane 1*) or in the presence of either WT (*fig. 1c, lanes 6-9*) or LPG deficient promastigotes (*fig 1d, lanes 6-9*) for the indicated time points. Nuclear extracts and EMSA were performed as described in *Materials and Methods*. Similar results were obtained in three separate experiments. LPS-stimulated nuclear extracts were used as control for each probe. Similar results were obtained in three separate experiments. (E-F) Effect of *Leishmania* infection on NF- κ B DNA binding activity. Adherent cells were incubated in the absence (*lane 1*) or in the presence of either WT (*fig. 1e, lanes 5-7*) or LPG deficient promastigotes (*fig 1f, lanes 5-7*) for the indicated time points. Nuclear extracts and EMSA were performed as described in *Materials and Methods*.

FIGURE 2. Effect of IFN- γ priming on NF- κ B (A) or AP-1 (B) DNA binding activity during *Leishmania* infection. IFN- γ (50 U/ml) was added 18h prior to infection (*fig 2a, lanes 3-9, fig 2b, lanes 2-10*). Adherent cells were incubated in the absence (*lane 1*) or in the presence of either WT (*fig. 2a, lanes 4-6, fig. 2b, lanes 3-6*) or LPG deficient promastigotes (*fig 2a, lanes 7-9, fig 2b, lanes 7-10*) for the indicated time points. Nuclear extracts and EMSA were performed as described in *Materials and Methods*. Similar results were obtained in two separate experiments.

FIGURE 3. Effect of *Leishmania* infection on mRNA production in RAW 264.7 cells and BMM. Where indicated, IFN- γ (50 U/ml) was added 18h prior to infection.

Adherent cells were incubated in the absence (*lane 1*) or in the presence of either LPS (*lane 2*), WT (*lanes 4-5*) or LPG deficient promastigotes (*lanes 6-7*) Total RNA was extracted and Northern blotting was performed as described in *Materials and Methods*. (A/B) TNF- α , (C/D) iNOS. RNA integrity and loading were assessed by ethidium bromide staining. Similar results were obtained in three separate experiments.

FIGURE 4. Effect of *Leishmania* infection on NO₂⁻ and TNF- α release in RAW 264.7 cells and BMM. Where indicated, IFN- γ (50 U/ml) was added 18h prior to infection.

Adherent cells were incubated in the absence (open bars) or in the presence of either WT promastigotes (closed bars), LPG deficient promastigotes (hatched bars), latex beads (lined bars) or LPG-coated latex beads (bricked bars) in *Materials and Methods* for 18 hours. These values represent +/- SE of one experiment performed in triplicate. The data presented here are representative of results obtained in four separate experiments.

FIGURE 5. Effect of *Leishmania* infection on IRAK activation in (A) RAW 264.7 cells and (B) BMM. Adherent cells were incubated in the absence (*lane 1*) or in the presence of either WT (*lanes 2-4*) LPG deficient (*lanes 5-7*) or LPG2⁻pLPG2 promastigotes (*lanes 8-10*) for the indicated time points. IRAK protein was immuno-precipitated and incubated with γ -³²P-ATP MBP as described under *Materials and Methods*. Activity was than corrected to uninfected levels. Similar results were obtained in three separate experiments.

FIGURE 6. Effect of IFN- γ priming on IRAK activation in (A) RAW 264.7 cells and (B) BMM during *Leishmania* infection. IFN- γ (50 U/ml) was added 18h prior to infection (*lanes 2-8*). Adherent cells were incubated in the absence (*lane 1*) or in the presence of either WT (*lanes 3-5*) or LPG deficient promastigotes (*lanes 6-8*) for the indicated time points. IRAK protein was immuno-precipitated and incubated with γ -³²P-ATP and MBP as described under Materials and Methods. Activity was than corrected to uninfected levels. Similar results were obtained in three separate experiments

REFERENCE

- Andrews, N. C. and D. V. Faller (1991). "A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells." *Nucleic Acids Res* **19**: 2499.
- Buates, S. and G. Matlashewski (2001). "General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection." *J Immunol* **166**: 3416-22.
- Bulut, Y., E. Faure, L. Thomas, O. Equils and M. Arditi (2001). "Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling." *J Immunol* **167**: 987-94.
- Butcher, B. A., L. Kim, P. F. Johnson and E. Y. Denkers (2001). "Toxoplasma gondii tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B." *J Immunol* **167**: 2193-201.
- Carrera, L., R. T. Gazzinelli, R. Badolato, S. Hieny, W. Muller, R. Kuhn and D. L. Sacks (1996). "Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice." *J Exp Med* **183**: 515-26.
- de Freitas Balanco, J. M., M. E. Moreira, A. Bonomo, P. T. Bozza, G. Amarante-Mendes, C. Pirmez and M. A. Barcinski (2001). "Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity." *Curr Biol* **11**: 1870-3.
- Descoteaux, A., Y. Luo, S. J. Turco and S. M. Beverley (1995). "A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*." *Science* **269**: 1869-72.
- Descoteaux, A., G. Matlashewski and S. J. Turco (1992). Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Immunol*. **149**: 3008-15.
- Descoteaux, A. and S. J. Turco (1999). "Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity." *Biochim Biophys Acta* **1455**: 341-52.
- Descoteaux, A., S. J. Turco, D. L. Sacks and G. Matlashewski (1991). "*Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages." *J Immunol* **146**: 2747-53.
- Desjardins, M. and A. Descoteaux (1997). "Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan." *J Exp Med* **185**: 2061-8.

- Desjardins, M. and A. Descoteaux (1998). "Survival strategies of *Leishmania donovani* in mammalian host macrophages." *Res Immunol* **149**: 689-92.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, D. M. Rose, A. Pearson, R. A. Ezekewitz and P. M. Henson (2000). "A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells." *Nature* **405**: 85-90.
- Fang, Y. Y., Z. M. Song and S. Dhib-Jalbut (2001). "Mechanism of measles virus failure to activate NF-kappaB in neuronal cells." *J Neurovirol* **7**: 25-34.
- Fransen, L., R. Muller, A. Marmenout, J. Tavernier, J. Van der Heyden, E. Kawashima, A. Chollet, R. Tizard, H. Van Heuverswyn, A. Van Vliet, *et al.* (1985). "Molecular cloning of mouse tumour necrosis factor cDNA and its eukaryotic expression." *Nucleic Acids Res* **13**: 4417-29.
- Fratti, R. A., J. M. Backer, J. Gruenberg, S. Corvera and V. Deretic (2001). "Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest." *J Cell Biol* **154**: 631-44.
- Ghosh, S., M. J. May and E. B. Kopp (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." *Annu Rev Immunol* **16**: 225-60.
- Green, S. J., M. S. Meltzer, J. B. Hibbs, Jr. and C. A. Nacy (1990). "Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism." *J Immunol* **144**: 278-83.
- Holm, A., K. Tejle, K. E. Magnusson, A. Descoteaux and B. Rasmusson (2001). "*Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKCalpha and defective phagosome maturation." *Cell Microbiol* **3**: 439-47.
- Hu, J., S. K. Roy, P. S. Shapiro, S. R. Rodig, S. P. Reddy, L. C. Platanius, R. D. Schreiber and D. V. Kalvakolanu (2001). "ERK1 and ERK2 activate CCAAAT/enhancer-binding protein-beta-dependent gene transcription in response to interferon-gamma." *J Biol Chem* **276**: 287-97.
- Karin, M., Z. Liu and E. Zandi (1997). "AP-1 function and regulation." *Curr Opin Cell Biol* **9**: 240-6.
- Moore, K. J., S. Labrecque and G. Matlashewski (1993). "Alteration of *Leishmania donovani* infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction." *J Immunol* **150**: 4457-65.
- Murray, H. W., G. L. Spitalny and C. F. Nathan (1985). "Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma." *J Immunol* **134**: 1619-22.

- Mushegian, A. and R. Medzhitov (2001). "Evolutionary perspective on innate immune recognition." *J Cell Biol* **155**: 705-10.
- Olivier, M., R. W. Brownsey and N. E. Reiner (1992). "Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 7481-5.
- Piedrafita, D., L. Proudfoot, A. V. Nikolaev, D. Xu, W. Sands, G. J. Feng, E. Thomas, J. Brewer, M. A. Ferguson, J. Alexander, *et al.* (1999). "Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania* phosphoglycans." *Eur J Immunol* **29**: 235-44.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. V. Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, *et al.* (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." *Science* **282**: 2085-8.
- Prive, C. and A. Descoteaux (2000). "*Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages." *Eur J Immunol* **30**: 2235-44.
- Proudfoot, L., A. V. Nikolaev, G. J. Feng, W. Q. Wei, M. A. Ferguson, J. S. Brimacombe and F. Y. Liew (1996). "Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10984-9.
- Qureshi, S. T., L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K. J. Moore, P. Gros and D. Malo (1999). "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)." *J Exp Med* **189**: 615-25.
- Reiner, S. L. and R. M. Locksley (1995). "The regulation of immunity to *Leishmania major*." *Annu Rev Immunol* **13**: 151-77.
- Ruckdeschel, K., K. Richter, O. Mannel and J. Heesemann (2001). "Arginine-143 of *Yersinia enterocolitica* YopP crucially determines isotype-related NF-kappaB suppression and apoptosis induction in macrophages." *Infect Immun* **69**: 7652-62.
- St-Denis, A., F. Chano, P. Tremblay, Y. St-Pierre and A. Descoteaux (1998). "Protein kinase C-alpha modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line." *J Biol Chem* **273**: 32787-92.
- Swantek, J. L., M. F. Tsen, M. H. Cobb and J. A. Thomas (2000). "IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin." *J Immunol* **164**: 4301-6.
- Takeshita, F., C. A. Leifer, I. Gursel, K. J. Ishii, S. Takeshita, M. Gursel and D. M. Klinman (2001). "Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells." *J Immunol* **167**: 3555-8.

- Vidal, S. M., D. Malo, K. Vogan, E. Skamene and P. Gros (1993). "Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg." *Cell* **73**: 469-85.
- Wilson, M. E., B. M. Young, B. L. Davidson, K. A. Mente and S. E. McGowan (1998). "The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis." *J Immunol* **161**: 6148-55.
- Xie, Q. W., H. J. Cho, J. Calaycay, R. A. Mumford, K. M. Swiderek, T. D. Lee, A. Ding, T. Troso and C. Nathan (1992). "Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages." *Science* **256**: 225-8.
- Zhang, F. X., C. J. Kirschning, R. Mancinelli, X. P. Xu, Y. Jin, E. Faure, A. Mantovani, M. Rothe, M. Muzio and M. Arditi (1999). "Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes." *J Biol Chem* **274**: 7611-4.

Figure 1

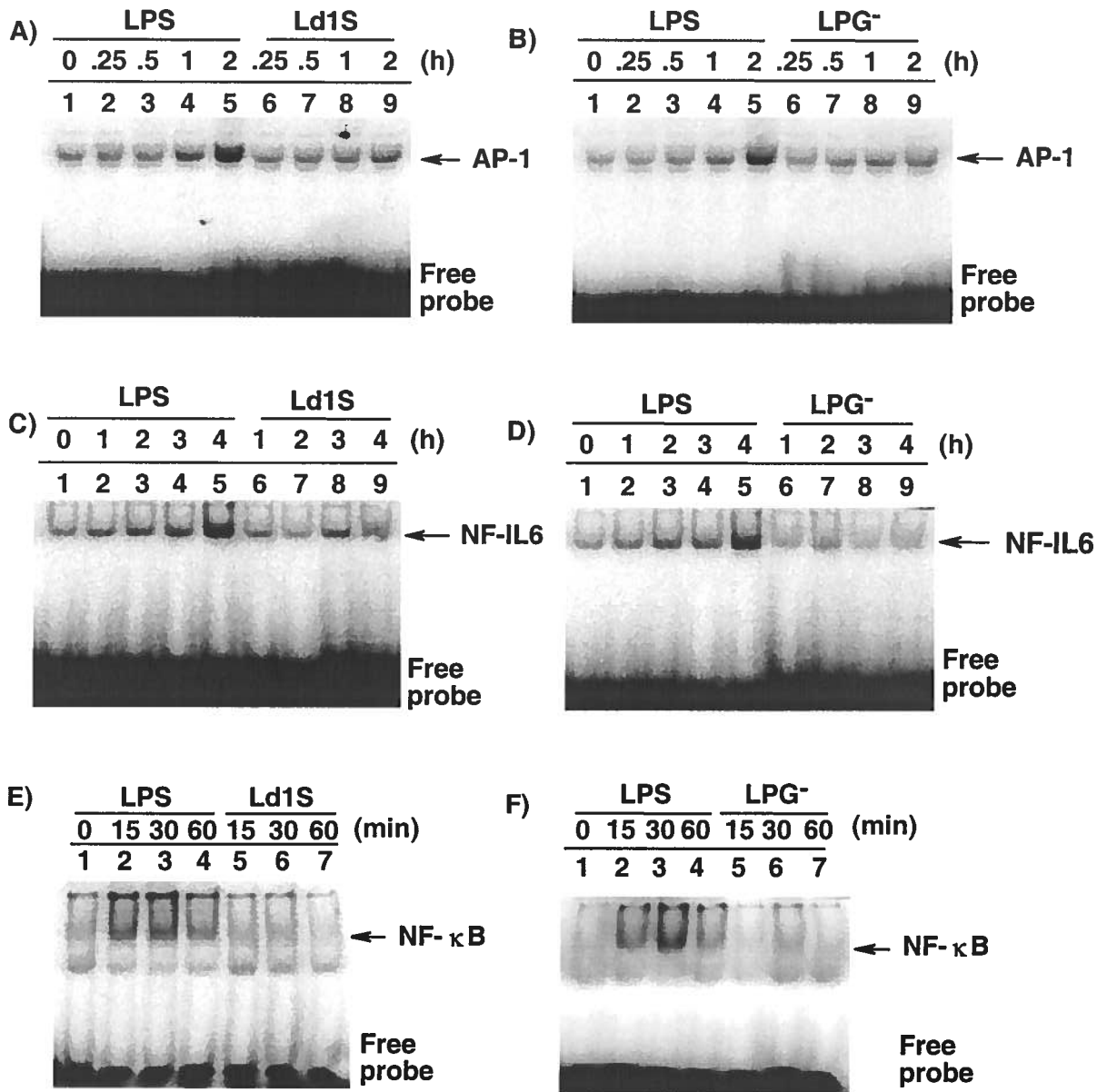


Figure 2

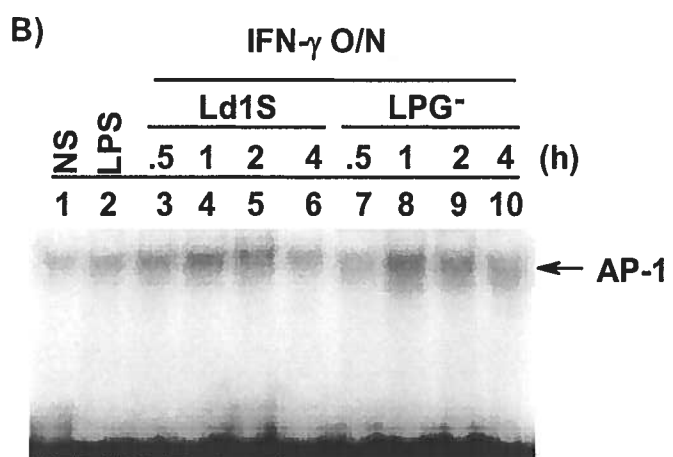
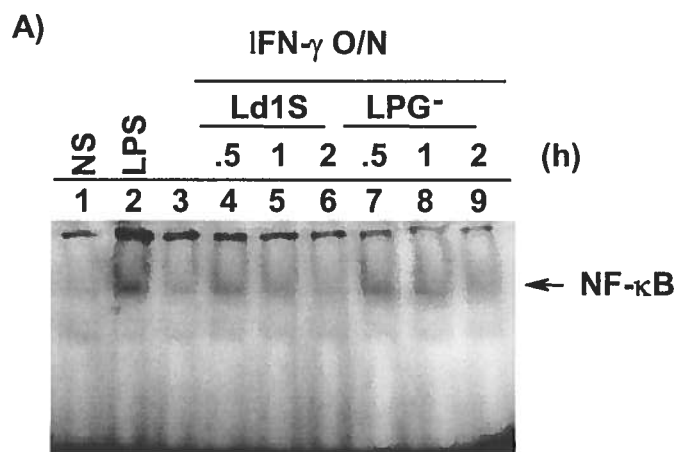


Figure 3

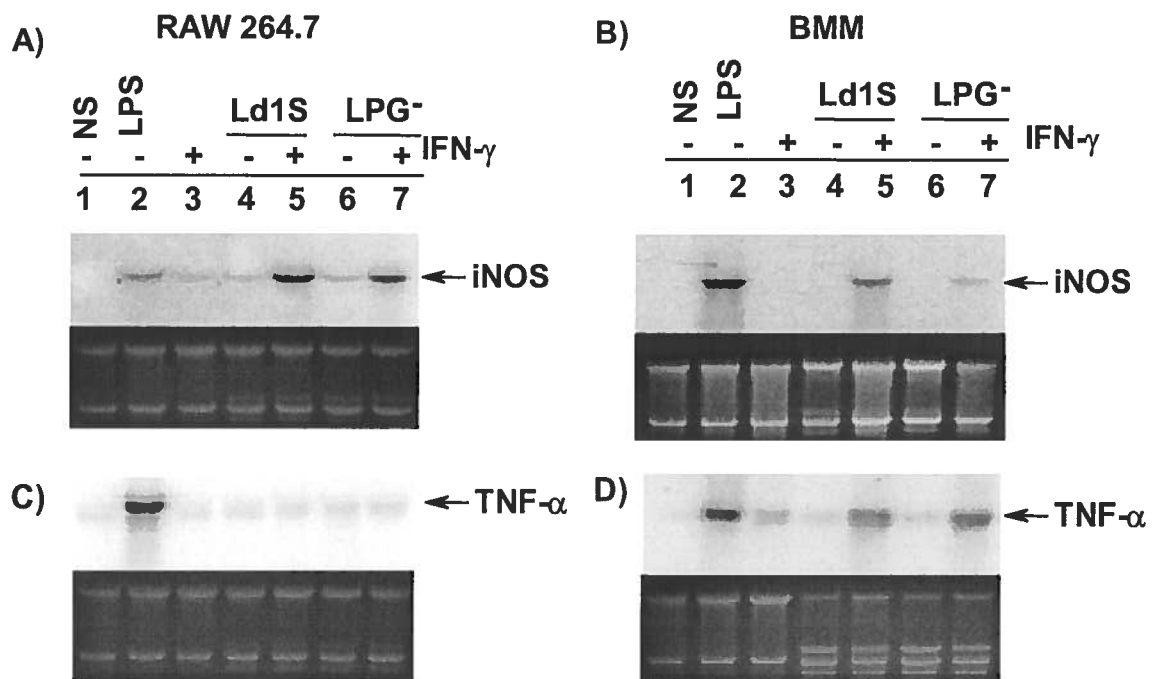


Figure 4

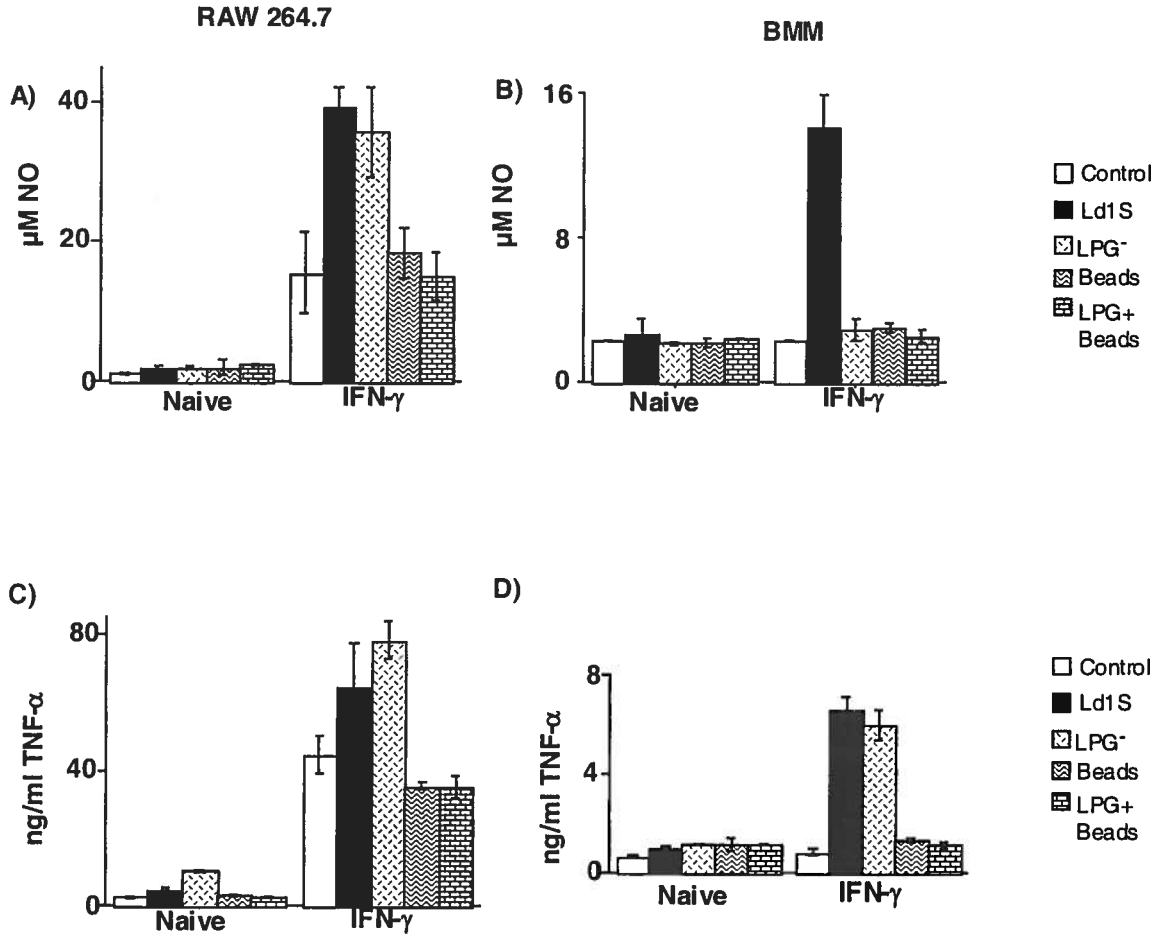


Figure 5

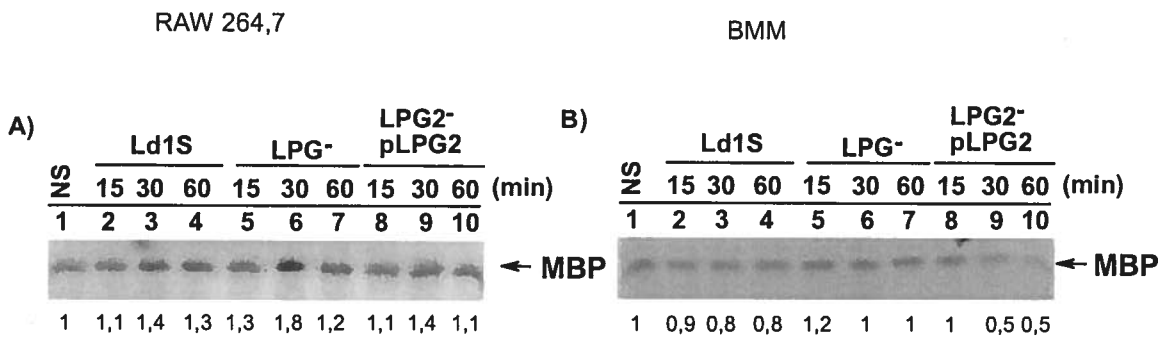
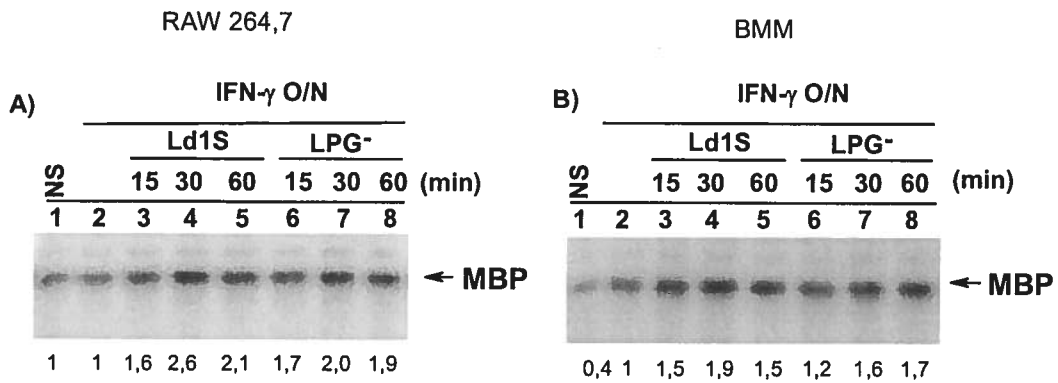


Figure 6



DISCUSSION

4.0.Rôle des macrophages dans l'immunité

Le système immunitaire est divisé en deux types de réponses : la réponse innée et la réponse adaptative [199]. Les principaux joueurs de la réponse adaptative sont les lymphocytes B et T. Comme c'est le cas pour le récepteur des lymphocytes T, le TCR, les gènes codant pour les immunoglobulines présentes à la surface des lymphocytes B subissent des réarrangements somatiques afin d'augmenter l'affinité pour leur ligands [26]. De plus, de quatre à sept jours sont requis avant qu'un nombre suffisant de lymphocytes soit disponible pour lutter contre une infection, un délai qui peut être fatal pour un animal [21].

Alors que la réponse adaptative est unique aux vertébrés, tous les êtres pluricellulaires ont un système immunitaire inné sous une forme ou une autre [26, 200]. Chez les vertébrés, il y a deux types de mécanismes de défense innée: soit constitutif ou inductible. Les barrières physiques tels que la peau et les muqueuses ainsi que certains peptides et enzymes antibactériens sont compris dans les mécanismes constitutifs [200]. Chez les vertébrés, les cellules effectrices sont principalement les macrophages, les granulocytes et les cellules NK. Les récepteurs impliqués ne subissent pas de réarrangements somatiques et aucun délai n'est nécessaire pour que ces cellules soient activées. Les cellules NK reconnaissent l'absence de soi ou le soi modifié du CMH I. Les récepteurs responsables sont une famille de lectines de type C appelées Ly49 chez la souris et CD94/NK2G2 chez l'humain [201]. Les macrophages et les granulocytes reconnaissent les microbes (le non soi) grâce à une multitude de récepteurs nommés PRR, tels que le récepteur du mannose, les récepteurs scavengers et les TLR. Le rôle premier de l'immunité innée est de distinguer entre les microorganismes (le non soi) et le soi [26].

Il est par contre bien évident que le système immunitaire inné n'est pas toujours capable d'éliminer les microorganismes pathogènes. Ces derniers utilisent plusieurs stratégies afin d'éviter leur destruction par le système immunitaire inné. Une stratégie employée par quelques microorganismes pathogènes est de « corrompre » le macrophage [15]. Deux pathogènes sur lesquels nous nous sommes penchés et qui ciblent le macrophage

sont les bactéries à Gram négatif et le trypanosomatidae *Leishmania donovani*. Les mécanismes employés par ces pathogènes diffèrent grandement. Tandis que les bactéries à Gram négatif stimulent de manière exagérée le système immunitaire, le parasite *L. donovani* non seulement évite mais empêche l'activation du système immunitaire. Nous avons obtenu des résultats qui suggèrent que la PKC- α régule l'activation du facteur de transcription NF-IL6 en réponse au LPS. Les résultats obtenus lors de nos travaux avec *Leishmania donovani* suggèrent qu'une molécule exprimée à la surface cellulaire du parasite joue un rôle dans l'évasion de l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B. De plus, nos résultats suggèrent que l'entrée du parasite *L. donovani* chez des macrophages pré-stimulés à l'IFN- γ se fait par un récepteur TLR, dont l'expression est induite par l'IFN- γ . Finalement, nos résultats démontrent que la protéine kinase IRAK est activée lors d'infection de macrophages préstimulés à l'IFN- γ , suggérant que le récepteur puisse être un TLR.

5.0.Rôle de la PKC- α dans l'activation des facteurs de transcription AP-1, NF- κ B et NF-IL6 en réponse au LPS

Depuis quelques années, les récepteurs TLR ont pris une place importante au niveau de la réponse innée. Le spectre de reconnaissance des TLR est très large et permet la reconnaissance d'un nombre important de microorganismes. Parmi ceux-ci on retrouve les bactéries à Gram positif et négatif, les mycobactéries, des levures ainsi que certains virus [202]. La cascade de signalisation enclenchée par les TLR exprimés par les cellules dendritiques permet leur maturation et augmente l'expression des molécules de co-stimulation [203] tandis que l'activation des TLR exprimés par les macrophages mène à la sécrétion de médiateurs solubles et cytokines proinflammatoires [111]. Les cytokines et chimiokines libérées par les macrophages auront pour effet d'attirer et activer d'autres cellules, tels les lymphocytes T, menant à une réponse de type Th1 [46, 47].

La cascade de signalisation du LPS mène à l'activation de protéines tyrosine kinases [204] ainsi qu'à l'activation des PKC, une famille de protéines sérine/thréonine kinases [67, 205]. L'implication des protéines tyrosine kinases dans la réponse au LPS reste encore à être précisée puisque des souris déficientes en trois membres de famille Src (Hck, Fgr et Lyn) répondent normalement au LPS [206].

Plusieurs publications ont démontré que les PKC sont impliquées dans la régulation des fonctions du macrophage induites par le LPS [66-68, 205, 207]. Par contre, ces travaux n'ont pas permis d'identifier le rôle d'un isoenzyme en particulier dans ces conditions. Nous avons donc entrepris d'étudier le rôle de la PKC- α chez les macrophages en réponse au LPS en surexprimant un mutant de la PKC- α qui agit comme dominant-négatif. Nous avons démontré, dans un premier temps, que la production de NO, IL-1 α et MMP-9, en réponse au LPS, était sous le contrôle de la PKC- α . Par contre, ni les voies des MAPk (p38, ERK 1/2 ou SAPK/JNK) ou la voie du NF- κ B n'étaient affectées (chapitre 1, 1^{er} article, figure 7) [4]. Malgré le fait que la translocation nucléaire du NF- κ B était normale, il était néanmoins possible que l'activité transcriptionnelle du NF- κ B

soit défectueuse dans les clones de RAW 264.7 surexprimant le DN PKC- α puisque NF- κ B lui-même doit être phosphorylé sur des résidus sérine afin d'être activé [118]. Nous avons donc procédé à des transfections transitoires en utilisant la luciférase comme gène rapporteur sous le contrôle du facteur de transcription NF- κ B. Les résultats que nous avons obtenus nous ont permis de conclure que la translocation nucléaire et l'activité transcriptionnelle du NF- κ B induites par le LPS étaient indépendantes de PKC- α dans la lignée RAW 264.7 ([4] et annexe I, figure E).

Une étude récente a démontré un rôle pour PKC- α , β et δ dans la production de NO et l'activation du NF- κ B en réponse au LPS chez le macrophage RAW 264.7 [71]. Leur résultat concernant le rôle de la PKC- α dans l'activation du NF- κ B en réponse au LPS était apparemment contradictoire au nôtre. Chen et collaborateurs ont suggéré que bloquer l'expression de ces isoenzymes en transfectant des oligonucléotides anti-sens empêche la translocation nucléaire du NF- κ B en réponse au LPS. Par contre, leurs résultats démontrent que c'est en fait la translocation du dimère p50/p50 qui diminue. Certaines études ont démontré que ce dimère aurait un rôle d'inhibition de la transcription [120]. Donc, il est possible que l'inhibition d'iNOS observée par ce groupe soit due à un autre facteur que le NF- κ B. En considérant le nombre de publications qui démontrent un rôle pour PKC- ε et ζ dans l'activation du NF- κ B, il est peu surprenant d'avoir observé que PKC- α ne régule pas l'activation du NF- κ B en réponse au LPS [68, 70, 79, 80, 130]. Par contre, il est à noter que le rôle de la PKC- α dans la translocation nucléaire du NF- κ B chez les souris PKC- $\alpha^{-/-}$ n'a pas encore été étudié [76].

Suite à ces résultats, nous nous sommes penchés sur le rôle de la PKC- α dans l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF-IL6. Ces facteurs sont activés en réponse au LPS et une quantité importante de gènes ont, dans leur région promotrice, des séquences de liaisons pour ces facteurs de transcription [3].

Nos résultats ont permis de démontrer que la PKC- α n'est pas impliquée dans la voie d'activation d'AP-1 en réponse au LPS (chapitre 1, article 2, figure 1A et B [6]). Par

contre, il est possible que PKC- α soit impliquée dans la voie d'activation de AP-1 lors du pontage des récepteurs Fc puisque l'activation de ERK1/2, qui mène à l'activation et phosphorylation de *c-fos*, est défectueuse dans les clones de la lignée RAW 264.7 surexprimant le DN PKC- α [72]. À l'heure actuelle, il est impossible d'affirmer avec certitude si un ou plusieurs isoenzymes sont impliqués dans l'activation d'AP-1 puisque les résultats ont été obtenus à l'aide d'inhibiteurs de PKC [208]. Il sera intéressant d'étudier le rôle des PKC dans cette voie en utilisant des souris déficientes pour un isoenzyme particulier.

Le rôle de la PKC- α dans l'activation du NF-IL6 a initialement été démontré chez la lignée hépatocytaire humaine HepG2 [209]. Un rôle indirect pour PKC- α a aussi été suggéré dans la lignée murine NIH 3T3. Cette étude démontrait que Raf-1, qui est un substrat pour PKC- α [210], peut aussi phosphoryler NF-IL6 [211]. Parallèlement à ceci, la p90 Rsk est activée en réponse au LPS [212] et est impliquée dans l'activation du NF-IL6 [213]. Par contre, lors de nos essais kinases *in vitro*, nous avons observé que l'activation de p90 Rsk en réponse au LPS est normale dans les cellules RAW 264.7 surexprimant le DN PKC- α (annexe I, figure Fi et Fii). De plus, considérant l'importance de c-Raf dans l'activation de la voie de ERK1/2 [210], il est peu probable que cette kinase soit affectée puisque l'activation de ERK1/2 en réponse au LPS n'est pas affectée par le mutant DN PKC- α [4].

Nos travaux sur le rôle de la PKC- α dans la régulation du NF-IL6 en réponse au LPS ont permis de démontrer que cet isoenzyme pourrait être impliqué dans la régulation de la translocation nucléaire du NF-IL6. En effet, les niveaux du NF-IL6 induits par le LPS sont comparables entre la lignée parentale et les clones de RAW 264.7 surexprimant le DN PKC- α (chapitre 1, 2^e article, fig 4A) [6]. Par contre, la quantité du NF-IL6 transloquée au noyau des clones de RAW 264.7 surexprimant le DN PKC- α suite à une stimulation au LPS est très faible (chapitre 1, 2^e article, fig 4B) [6].

L'effet de la phosphorylation sur l'activation du NF-IL6 reste encore à déterminer puisque plusieurs études ont démontré que la phosphorylation du NF-IL6 sur certains

résidus inhibe son interaction avec l'ADN [214, 215]. De plus, tandis que la phosphorylation du NF-IL6 en réponse au TGF- β a clairement été établie [213], sa phosphorylation en réponse au LPS demeure spéculative [216]. Donc, PKC- α pourrait être impliquée dans l'activation d'une protéine responsable du transport du NF-IL6 au noyau. Il a effectivement été démontré que NF-IL6 transloque au noyau via un transporteur [217].

Il est aussi intéressant de noter que les clones de RAW 264.7 surexprimant le DN PKC- α sont déficients au niveau de la destruction de parasites intracellulaires [218]. Ces déficiences pourraient être attribuées à l'absence de G-CSF dont l'expression est régulée par NF-IL6. En effet, le groupe de Gorvel a démontré que l'ajout de G-CSF aux macrophages des souris NF-IL6^{-/-} restaurait leur capacité à éliminer certains pathogènes intracellulaires [150]. Il est aussi possible que la production de médiateurs inflammatoires soit inhibée dans les clones DN PKC- α en réponse à certains pathogènes. À cet effet, nous avons analysé l'expression des gènes IL-1 β et G-CSF et avons constaté que leur expression était diminuée en réponse au LPS chez les clones de RAW 264.7 surexprimant le DN PKC- α (chapitre 1, 2^e article, figure 5A et B) [6]. Il est possible que cette inhibition soit causée par l'absence de translocation nucléaire du NF-IL6. Il est aussi intéressant de constater qu'une lignée de macrophages immortalisés à partir des macrophages NF-IL6^{-/-} et nos clones de RAW 264.7 surexprimant le DN PKC- α répondent au LPS de façon similaire [152].

Nous avons aussi observé que dans les clones de RAW 264.7 surexprimant le DN PKC- α , l'expression de COX-2 en réponse au LPS est fortement diminuée [5]. Depuis quelques années, plusieurs études ont démontré l'importance du NF-IL6 dans l'expression de COX-2 en réponse au LPS [151, 219]. De plus, l'utilisation de souris NF-IL6^{-/-} a permis de déterminer que ce facteur a un rôle double dans l'expression de COX-2. Il est impliqué dans la « première vague » d'ARNm en tant qu'homodimère et dans la « seconde vague », en tant qu'hétérodimère avec un autre membre de sa famille, C/EBP δ [216, 220]. Il est donc tentant de relier l'absence de synthèse d'ARNm d'IL-1, iNOS,

COX-2 et G-CSF en réponse au LPS à l'inhibition de la translocation nucléaire du NF-IL6.

La construction de souris PKC^{-/-} permet maintenant d'étudier le rôle d'un isoenzyme en particulier sur plusieurs systèmes en même temps. Il est intéressant de constater que l'élimination d'isoenzymes ubiquitaires, tels que les isoenzymes α et ζ , ne soit pas létale pour les souris [76, 80]. Nous sommes en droit de nous demander s'il n'y a pas de redondances dans les fonctions des différents membres d'une même sous-famille. Par contre, l'élimination d'isoenzymes n'est pas sans conséquences pour les animaux. Par exemple, les souris PKC- γ ^{-/-} ont des troubles de mémoire et de raisonnement [73, 74]. Les souris PKC- β ^{-/-}, δ ^{-/-}, ϵ ^{-/-}, ζ ^{-/-} et θ ^{-/-} ont toutes des déficiences immunitaires à différents niveaux [75, 78-82]. Et finalement les souris PKC- α ^{-/-} exhibent des problèmes reliées à la signalisation induite par l'insuline [76]. Jusqu'à présent, l'effet d'éliminer un isoenzyme n'a été étudié que sur un seul système ou type cellulaire. Il sera fascinant à l'avenir de voir si les résultats obtenus à l'aide d'inhibiteurs, d'ARN anti-sens ou de dominants-négatifs seront les mêmes qu'avec les souris déficientes pour un ou des combinaisons d'isoenzymes. Si une conclusion peut être tirée de tous ces travaux, c'est qu'il semble que chaque isoenzyme joue un rôle unique dans un système en particulier.

6.0. Évasion de l'activation du macrophage par le parasite intracellulaire *Leishmania donovani*

Le parasite *Leishmania donovani* est l'agent responsable du Kala-azar (ou leishmaniose viscérale) et cause des infections surtout en Afrique, en Asie et au sud de l'Europe [160, 164]. Un des plus graves problèmes associés avec ce pathogène est le manque de traitements efficaces.

L'entrée de ce parasite dans le macrophage se fait de façon silencieuse, grâce, en partie, à une molécule de surface, le LPG. Afin d'approfondir nos connaissances sur le rôle du LPG, nous avons analysé et comparé l'activation de facteurs de transcription lors de l'infection de macrophages naïfs et pré-stimulés à l'IFN- γ en utilisant des promastigotes de *L. donovani* de type sauvage et des mutants déficients dans la biosynthèse du LPG. Nous avons aussi examiné le rôle du LPG dans la sécrétion de médiateurs inflammatoires lors de l'infection de cellules naïves et pré-stimulées à l'IFN- γ . Et finalement, nous avons vérifié la possibilité que l'IFN- γ induise l'expression d'un récepteur TLR impliqué dans la reconnaissance d'une molécule du parasite en mesurant l'activité kinase d'IRAK, molécule de signalisation commune à tous les TLR.

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'activation des facteurs de transcription NF- κ B, AP-1 et NF-IL6 vue leur importance dans la régulation de l'expression de gènes inflammatoires. L'infection de macrophages naïfs avec des promastigotes de *L. donovani* de type sauvage mène à une baisse du niveau basal du NF- κ B nucléaire (chapitre 2, article 3, figure 1E). Nous avons aussi observé une baisse transitoire de translocation par les promastigotes LPG^{-/-} (chapitre 2, article 3, figure 1F). Dans le but de vérifier l'effet de l'infection de *Leishmania* sur l'expression de gènes, Buates et Matlashewski ont pu démontrer que plusieurs dizaines de gènes sont modulés par ce parasite. Entre autre, l'expression des gènes de la famille Rel lors d'infections avec *L. donovani* était fortement diminuée [185]. En sachant que le NF- κ B contrôle l'expression de ces gènes ainsi que celle des CMH I et II [116, 221], il est intéressant de constater que l'infection de la lignée

de macrophages murins RAW 264.7 par des promastigotes de *L. donovani* mène à une diminution de la translocation nucléaire du NF- κ B (chapitre 2, article 3, fig 1E et F).

La capacité du parasite à éviter l'activation du facteur AP-1 semble dépendre du LPG puisque l'infection de macrophages naïfs avec des promastigotes déficients en LPG (LPG2⁻) mène à l'activation de ce facteur (chapitre 2, 3^e article, figure 1B). Par contre, l'infection de macrophages naïfs avec des promastigotes de type sauvage n'induit pas l'activation d'AP-1 (chapitre 2, 3^e article, figure 1A). Puisque ERK 1/2 est impliqué dans la voie de signalisation menant à l'activation d'AP-1, il est tentant de faire le parallèle entre ces résultats et les résultats obtenus précédemment concernant l'activation de ERK 1/2 lors de l'infection de macrophages de moelle osseuse par des promastigotes déficients en LPG [10]. L'activation du facteur NF-IL6 n'a pas été observée lors d'infection de macrophages naïfs par des promastigotes de type sauvage ou déficients en LPG (LPG2⁻) (chapitre 2, 3^e article, figure 1C et D).

L'IFN- γ est un des plus puissant activateur des macrophages et induit, entre autres, leurs activités microbicides et tumoricides [57]. De plus, l'IFN- γ confère aux macrophages normalement susceptibles aux infections par *Leishmania* un phénotype résistant [192]. Afin de vérifier l'effet de l'IFN- γ sur l'activation des facteurs de transcription lors de l'infection par des promastigotes de *Leishmania donovani*, nous avons pré-stimulé des macrophages RAW 264.7 avec l'IFN- γ 18 heures avant l'infection et avons constaté une importante translocation nucléaire du NF- κ B et AP-1 en réponse à l'infection et ce, par les deux types de parasites utilisés (chapitre 2, 3^e article, figure 2A et B). Il a par contre été impossible de vérifier l'activation du NF-IL6 lors d'infection de cellules pré-stimulées puisque l'IFN- γ induit l'activation du NF-IL6 [222]. Nous avons aussi analysé l'expression des gènes codant pour TNF- α et iNOS, lors de l'infection de macrophages RAW 264.7 et de macrophages dérivés de moelle osseuse naïfs et pré-stimulés à l'IFN- γ . Alors que l'infection de cellules naïves ne mène pas à l'induction de l'expression de ces gènes, l'infection de cellules pré-stimulées à l'IFN- γ induit l'accumulation d'ARNm de TNF- α et iNOS chez les macrophages dérivés de la moelle osseuse et d'iNOS chez la lignée RAW 264.7 (chapitre 2, 3^e article, figure 3A-D). Il est intéressant de constater que

l'accumulation d'ARNm d'iNOS lors d'infections avec des *L. donovani* LPG2^{-/-} est inférieure à celle observée lors d'infections avec des promastigotes de *L. donovani* de type sauvage. Ceci concorde avec la plus faible production de NO observée dans nos travaux antérieurs [10].

Les TLR sont une famille de protéines impliquées dans la reconnaissance de microorganismes. Les membres qui la constituent reconnaissent chacun des PAMPs différents [21] et peuvent s'hétérodimériser, augmentant ainsi le répertoire de molécules reconnues [202]. Commune à tous les récepteurs TLR, ainsi qu'aux récepteurs IL-1 et IL-18, sont les kinases de la famille IRAK. Il a été démontré que cette kinase n'est pas essentielle aux réponses mais va permettre une réponse optimale à un microbe ou à une cytokine [110, 112].

Les macrophages normalement susceptibles à l'infection par *L. donovani* acquièrent un phénotype résistant à cette infection lorsqu'ils sont pré-stimulés à l'IFN- γ [192]. Vu le nombre grandissant de ligands reconnus par les récepteurs TLR, il nous semblait important de vérifier la possibilité que la pré-stimulation puisse induire l'expression d'un TLR et que ce récepteur reconnaisse une molécule exprimée à la surface du promastigote de *L. donovani*, menant à l'activation d'IRAK-1. L'infection de BMM naïfs avec des promastigotes de type sauvage mène à une baisse d'activité basale d'IRAK, tandis que l'infection avec des promastigotes déficients en LPG (*lpg2^{-/-}*) n'a aucun effet sur l'activité basale d'IRAK (chapitre 2, 3^e article, figure 5B). Les résultats obtenus avec la lignée de macrophages RAW 264.7 naïfs sont similaires : alors que l'infection par des promastigotes de type sauvage mène à une faible activation transitoire d'IRAK, l'infection avec les promastigotes LPG2^{-/-} provoque une activation plus forte (chapitre 2, 3^e article, figure 5A). Afin de confirmer le rôle du LPG sur l'activation d'IRAK, nous avons utilisé des promastigotes LPG^{-/-} dont l'expression du gène délété a été rétablie à l'aide d'un vecteur d'expression («rescue mutants»). Les résultats obtenus sont les mêmes que lors de l'infection avec des promastigotes de type sauvage, démontrant que la présence du LPG module l'activité d'IRAK (chapitre 2, 3^e article, figure 5A et B). Finalement, l'activation d'IRAK lors d'infections des macrophages pré-stimulés à l'IFN- γ

par des parasites de type sauvage est supérieure à l'activation d'IRAK observée lors d'infections par des parasites déficients en LPG (chapitre 2, figure 6 A-B).

Puisque la kinase IRAK-1 n'est activée qu'en réponse à l'IL-1, l'IL-18 et suite à l'activation des TLR, les résultats obtenus lors d'infections de macrophages pré-stimulés avec de l'IFN- γ suggèrent que la pré-stimulation à l'IFN- γ induit l'expression d'un TLR qui reconnaît une ou des molécules exprimées à la surface du promastigote de *L. donovani*. De plus, des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire suggèrent qu'IRAK-1 joue un rôle important dans la réponse anti-*Leishmania* des macrophages pré-stimulés à l'IFN- γ . En effet, l'inhibition de l'expression d'IRAK-1 par RNAi diminue fortement la production de TNF- α en réponse à l'infection (J-F Flandin et A. Descoteaux, communication personnelle). Il est clair que le LPG de *L. donovani* module certaines réponses du macrophage. Par contre, la présence du LPG seul n'est pas suffisante pour expliquer les réponses observées. En effet, lorsque nous avons exposé des macrophages pré-stimulés à l'IFN- γ à des billes de latex recouvertes de LPG purifié, la sécrétion de cytokines n'était pas supérieure à celle obtenue avec des billes nues (chapitre 2, 3^e article, figure 4 A-D). Certaines explications s'offrent à nous. Dans un premier temps, il nous est impossible de déterminer avec exactitude le nombre de molécules présentes à la surface des billes lorsque nous les recouvrons de LPG. Sachant qu'un promastigote exprime environ 5×10^6 copies de la molécule de LPG à sa surface [156], il est possible que la quantité de molécules de LPG présentes à la surface des billes soit insuffisante pour induire une réponse chez les macrophages. Une autre possibilité est que le LPG et une autre molécule présente à la surface de *Leishmania* soient reconnus ensemble par un récepteur du macrophage. La «molécule accessoire» étant absente, les billes recouvertes de LPG purifié seraient reconnues par un autre récepteur que les parasites.

Le LPG de *L. donovani* joue un rôle essentiel dans l'évasion du système immunitaire et donc ultimement, dans la survie de la forme promastigote chez l'hôte mammifère. Ce n'est pas le cas pour toutes les espèces de *Leishmania*. En effet, une étude récente a démontré que des promastigotes de *L. mexicana* déficients en LPG sont aussi infectieux que le type sauvage. Il a été proposé que les PPG (protéophosphoglycans) assurent la virulence chez cette espèce [223]. Sachant que les promastigotes de *L. donovani* et *L.*

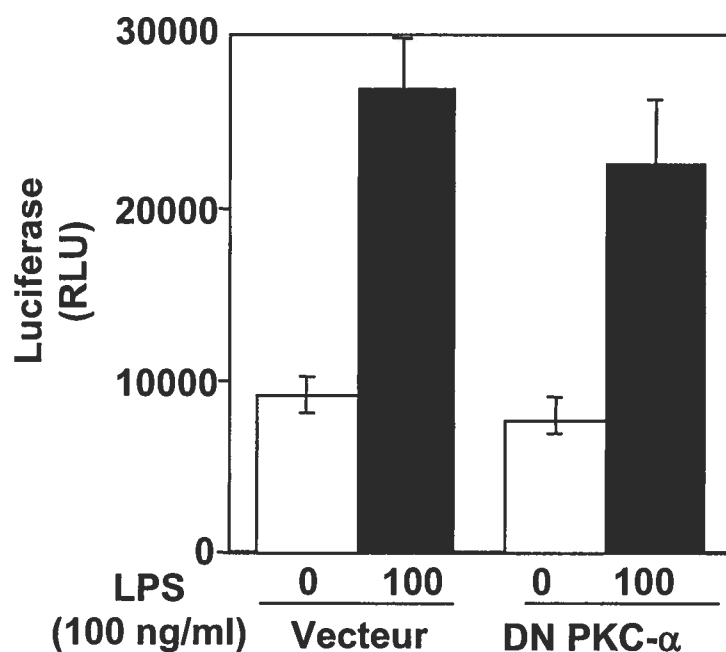
major déficients en LPG ne peuvent survivre chez la mouche [161, 164], il serait intéressant de vérifier la viabilité chez la mouche de sable des *L. mexicana* déficients en LPG. En plus d'altérer les voies de signalisation, les parasites du genre *Leishmania* utilisent d'autres mécanismes d'évasion. Un de ces mécanismes est le mimétisme apoptotique. Les cellules apoptotiques expriment à leur surface le phospholipide phosphatidylsérine (PS), qui se trouve normalement dans la partie cytoplasmique. Ce phospholipide est reconnu par les macrophages grâce au CD14, ce qui leur permet de phagocyter les cellules apoptotiques sans mener à une réponse inflammatoire [224]. L'amastigote utilise ce mécanisme : lorsqu'il lyse le macrophage, il acquiert de la phosphatidylsérine (PS) de sa cellule-hôte. Il apparaît donc comme une cellule apoptotique et sera internalisé par un macrophage sans activer la réponse inflammatoire [225]. En plus de la PS, les amastigotes expriment à leur surface d'autres glycolipides de l'hôte afin d'éviter d'être reconnus comme étant un organisme étranger [155]. L'infection par ce parasite mène à une diminution de l'expression de plusieurs dizaines de gènes par des mécanismes qui restent encore à déterminer. Un fait intéressant est que, parmi les gènes dont l'expression est diminuée, on peut compter les récepteurs G-CSF et TNF, tous deux impliqués dans la destruction parasitaire et l'activation du macrophage [185]. Finalement, il a été démontré que les macrophages infectés par *Leishmania* sécrètent du TGF- β . Cette cytokine est associée avec une réponse de type Th2 et est capable d'inhiber l'action de l'IFN- γ , menant donc à une réponse non-protectrice et bloquant l'effet activateur de l'IFN- γ sur les macrophages [226].

CONCLUSION GÉNÉRALE

Lors de cette étude, nous avons pu démontrer que la protéine kinase C- α est requise pour l'activation du facteur de transcription NF-IL6 en réponse au LPS dans la lignée de macrophages murin RAW 264.7. Alors qu'un lien entre les PKC et l'activation de NF-IL6 était déjà connu, aucun isoenzyme en particulier n'avait été impliqué jusqu'à présent. Ce résultat permet d'éclaircir la voie de signalisation du NF-IL6 en réponse au LPS. Dans l'état actuel des choses, il est impossible de dire exactement à quel niveau PKC- α se situe dans cette voie. Puisque la phosphorylation du NF-IL6 en réponse au LPS n'a pu être démontrée, il est possible que PKC- α regule l'activité d'une des molécules participant au transport du NF-IL6 du cytoplasme vers le noyau. Il serait intéressant, comme projet futur, de générer une lignée RAW 264.7 déficiente en NF-IL6 afin de déterminer hors de tout doute que ce facteur est responsable des déficiences observées en réponse au LPS dans les clones de RAW 264.7 surexprimant le DN PKC- α . Nous avons aussi démontré que la présence du LPG de *L. donovani* affecte le niveau basal du NF- κ B et joue un rôle dans l'évasion de l'activation du facteur de transcription AP-1. De plus, nos résultats indiquent que la pré-stimulation avec l'IFN- γ induit une activité IRAK accrue lors d'infections avec des promastigotes de *L. donovani* de type sauvage. Il serait essentiel de déterminer s'il s'agit effectivement d'un récepteur TLR et d'identifier ce récepteur. De plus, étant donné que le LPG ne semble pas être la seule molécule impliquée dans la reconnaissance de *L. donovani*, il serait également important de déterminer quelle(s) autre(s) molécule(s) est (sont) impliquée(s).

ANNEXE I

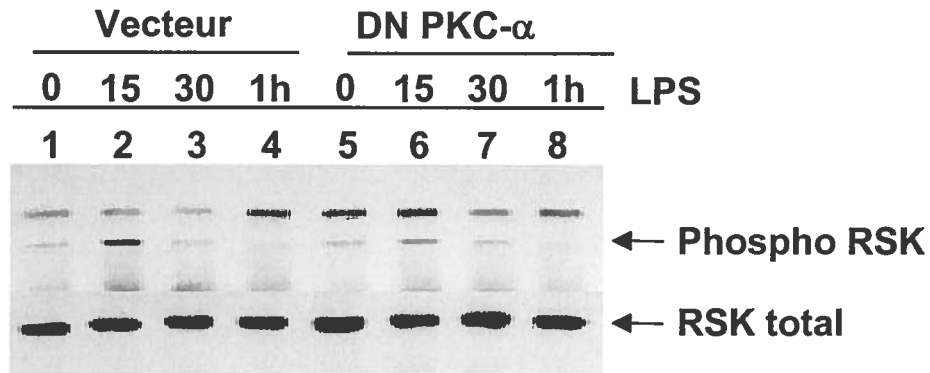
Figure E: Effet de la surexpression d'un DN PKC- α sur l'activité transcriptionnelle du NF- κ B.



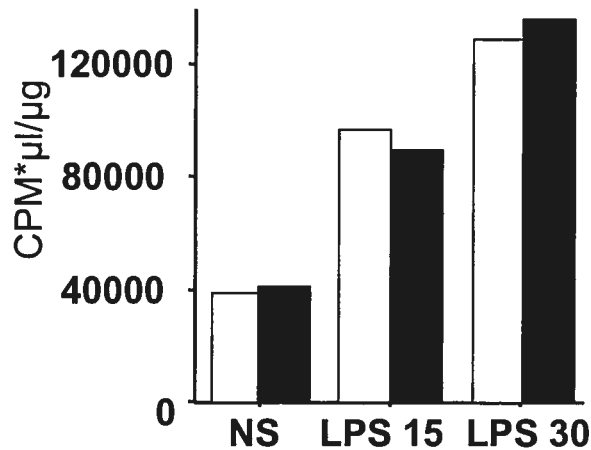
Légende figure E: Effet de la surexpression d'un DN PKC- α sur l'activité transcriptionnelle du NF- κ B. Des cellules contrôles (transfectées avec le vecteur seul) ou surexprimant un DN PKC- α (clone C2) ont été transfectées de manière transitoire avec le plasmide rapporteur luciférase sous le contrôle du facteur NF- κ B pour 5 heures. Les cellules ont été laissées dans du milieu frais pendant 18 heures avant de les exposées (barres pleines) ou non (barres vides) à 100 ng/ml de LPS pour 4 heures. Les cellules ont été ensuite lysées et l'activité luciférase mesurée.

Figure F: Effet de la surexpression d'un DN PKC- α sur l'activation de la p90RSK.

i



ii



Légende figure F: Effet de la surexpression d'un DN PKC- α sur l'activation de la p90RSK. Des cellules contrôles (transfectées avec le vecteur seul) ou surexprimant un DN PKC- α (clone C2) ont été laissées au repos ou stimulées avec du LPS. En A), la p90RSK a été immunoprécipitée et un immunobuvardage contre la forme phosphorylée (haut) et totale (bas) a été effectué. En B), la forme totale de RSK a été immunoprécipitée. L'activité a été mesurée en incubant la protéine immunoprécipitée avec du γ - 32 P-ATP et le peptide substrat S6 (Upstate biotechnologie). Les résultats sont une moyenne des CPM/ μ g de protéines totales. Les barres vides représentent les cellules au repos et les barres pleines représentent les cellules stimulées au LPS.

REMERCIEMENTS

À tout seigneur tout honneur. Je tiens d'abord et avant tout à remercier mon directeur de recherche Albert Descoteaux sans qui la réalisation de ces travaux n'aurait été possible. Je le remercie autant pour sa disponibilité que pour la latitude qu'il m'a laissée tout au long de ce chemin. J'ai tant appris avec lui, mais surtout comment être autonome et à avoir confiance en moi. Merci Albert. Je tiens aussi à remercier tous les membres passés et présents du laboratoire : Mireille Varin, Anik St-Denis, Charles Privé, Anouk Breton, John Derek Ng Yan Hing, Frédéric Dallaire et Jean-Frédéric Flandin. Un merci spécial à Claire Beauchemin, amie et technicienne du laboratoire, qui a tristement et subitement quitté ce monde le 14 mai 2002. Je dois faire des remerciements particuliers à Angélique Longtin et à Mélanie Giroux qui ont ensoleillé mes journées plus qu'elles ne le savent. Les nombreuses discussions (scientifiques et non scientifiques) que j'ai eues avec Mélanie m'ont fait grandir et m'ont aidé à devenir la personne que je suis aujourd'hui.

Je dois aussi remercier mes amis qui, plus que tout, m'ont appris qu'il faut travailler pour vivre et non vivre pour travailler. Je n'ai pas toujours été disponible pour eux mais ils sont encore là. Donc merci à Alain Azzam, Judith Pointejour, Ghislain Boudreaux et Benoit Loyer pour toutes ces soirées divertissantes et... bien arrosées. Je ne peux oublier ma mère, Jeannette Chano, qui m'a sans cesse encouragée à continuer et à faire mieux. Finalement, merci à Guillaume Blondel qui est arrivé dans ma vie de manière bien inattendue et qui a donné un sens à ma vie. Merci à vous tous.

La recherche n'est pas possible sans fonds. Merci aux FRSQ, CRM-IRSC, CRSNG ainsi qu'à la Fondation Armand-Frappier pour des fonds qui ont été octroyés à mon directeur de recherche et à moi-même.

RÉFÉRENCES

1. Banchereau, J. and R.M. Steinman. *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
2. Karima, R., S. Matsumoto, H. Higashi and K. Matsushima. *The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure*. Mol Med Today, 1999. **5**(3): p. 123-32.
3. Sweet, M.J. and D.A. Hume. *Endotoxin signal transduction in macrophages*. J Leukoc Biol, 1996. **60**(1): p. 8-26.
4. St-Denis, A., F. Chano, P. Tremblay, Y. St-Pierre and A. Descoteaux. *Protein kinase C-alpha modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32787-92.
5. Giroux, M. and A. Descoteaux. *Cyclooxygenase-2 expression in macrophages: modulation by protein kinase C-alpha*. J Immunol, 2000. **165**(7): p. 3985-91.
6. Chano, F. and A. Descoteaux. *Modulation of lipopolysaccharide-induced NF-IL6 activation by protein kinase C-alpha in a mouse macrophage cell line*. Eur J Immunol, 2002. **32**(10): p. 2897-904.
7. McNeely, T.B. and S.J. Turco. *Inhibition of protein kinase C activity by the Leishmania donovani lipophosphoglycan*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **148**(2): p. 653-7.
8. Descoteaux, A., S.J. Turco, D.L. Sacks and G. Matlashewski. *Leishmania donovani lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages*. J Immunol, 1991. **146**(8): p. 2747-53.
9. Olivier, M., R.W. Brownsey and N.E. Reiner. *Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with Leishmania donovani is associated with altered activation and translocation of protein kinase C*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(16): p. 7481-5.
10. Prive, C. and A. Descoteaux. *Leishmania donovani promastigotes evade the activation of mitogen- activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages*. Eur J Immunol, 2000. **30**(8): p. 2235-44.
11. Daeron, M. *Fc receptor biology*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 203-34.
12. Crowley, M.T., P.S. Costello, C.J. Fitzer-Attas, M. Turner, F. Meng, C. Lowell, V.L. Tybulewicz and A.L. DeFranco. *A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc gamma receptors on macrophages*. J Exp Med, 1997. **186**(7): p. 1027-39.
13. Abo, A., J. Qu, M.S. Cammarano, C. Dan, A. Fritsch, V. Baud, B. Belisle and A. Minden. *PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization*

- of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. Embo J, 1998. 17(22): p. 6527-40.*
14. Cox, D., P. Chang, Q. Zhang, P.G. Reddy, G.M. Bokoch and S. Greenberg. *Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. J Exp Med, 1997. 186(9): p. 1487-94.*
 15. Aderem, A. and D.M. Underhill. *Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol, 1999. 17: p. 593-623.*
 16. Underhill, D.M. and A. Ozinsky. *Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. Curr Opin Immunol, 2002. 14(1): p. 103-10.*
 17. Franc, N.C., K. White and R.A. Ezekowitz. *Phagocytosis and development: back to the future. Curr Opin Immunol, 1999. 11(1): p. 47-52.*
 18. Goldstein, J.L. and M.S. Brown. *Familial hypercholesterolemia: pathogenesis of a receptor disease. Johns Hopkins Med J, 1978. 143(1): p. 8-16.*
 19. Goldstein, J.L., Y.K. Ho, S.K. Basu and M.S. Brown. *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(1): p. 333-7.*
 20. Gerrity, R.G. *The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. Am J Pathol, 1981. 103(2): p. 181-90.*
 21. Medzhitov, R. *Toll-like receptors and innate immunity. Nature Rev Immunol, 2001. 1(2): p. 135-45.*
 22. Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, *et al.* *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature, 2000. 408(6813): p. 740-5.*
 23. Hayashi, F., K.D. Smith, A. Ozinsky, T.R. Hawn, E.C. Yi, *et al.* *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature, 2001. 410(6832): p. 1099-103.*
 24. Alexopoulou, L., A.C. Holt, R. Medzhitov and R.A. Flavell. *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature, 2001. 413(6857): p. 732-8.*
 25. Haworth, R., N. Platt, S. Keshav, D. Hughes, E. Darley, H. Suzuki, Y. Kurihara, T. Kodama and S. Gordon. *The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. J Exp Med, 1997. 186(9): p. 1431-9.*

26. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov. *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
27. Smith, L.C., L. Chang, R.J. Britten and E.H. Davidson. *Sea urchin genes expressed in activated coelomocytes are identified by expressed sequence tags. Complement homologues and other putative immune response genes suggest immune system homology within the deuterostomes*. J Immunol, 1996. **156**(2): p. 593-602.
28. Nonaka, M. *Origin and evolution of the complement system*. Curr Top Microbiol Immunol, 2000. **248**: p. 37-50.
29. Krych-Goldberg, M. and J.P. Atkinson. *Structure-function relationships of complement receptor type 1*. Immunol Rev, 2001. **180**: p. 112-22.
30. Allen, L.A. and A. Aderem. *Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 627-37.
31. Caron, E. and A. Hall. *Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases*. Science, 1998. **282**(5394): p. 1717-21.
32. Capodici, C., S. Hanft, M. Feoktistov and M.H. Pillinger. *Phosphatidylinositol 3-kinase mediates chemoattractant-stimulated, CD11b/CD18-dependent cell-cell adhesion of human neutrophils: evidence for an ERK-independent pathway*. J Immunol, 1998. **160**(4): p. 1901-9.
33. Hazan, I., R. Dana, Y. Granot and R. Levy. *Cytosolic phospholipase A2 and its mode of activation in human neutrophils by opsonized zymosan. Correlation between 42/44 kDa mitogen-activated protein kinase, cytosolic phospholipase A2 and NADPH oxidase*. Biochem J, 1997. **326** (Pt 3): p. 867-76.
34. Ross, G.D. *Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/alphaMbeta2-integrin glycoprotein*. Crit Rev Immunol, 2000. **20**(3): p. 197-222.
35. Wright, S.D. and S.C. Silverstein. *Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes*. J Exp Med, 1983. **158**(6): p. 2016-23.
36. Marth, T. and B.L. Kelsall. *Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling*. J Exp Med, 1997. **185**(11): p. 1987-95.
37. Sutterwala, F.S., G.J. Noel, R. Clynes and D.M. Mosser. *Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation*. J Exp Med, 1997. **185**(11): p. 1977-85.

38. Yoshida, Y., K. Kang, M. Berger, G. Chen, A.C. Gilliam, A. Moser, L. Wu, C. Hammerberg and K.D. Cooper. *Monocyte induction of IL-10 and down-regulation of IL-12 by iC3b deposited in ultraviolet-exposed human skin*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 5873-9.
39. Takahashi, K., M.J. Donovan, R.A. Rogers and R.A. Ezekowitz. *Distribution of murine mannose receptor expression from early embryogenesis through to adulthood*. Cell Tissue Res, 1998. **292**(2): p. 311-23.
40. Underhill, D.M. and A. Ozinsky. *PHAGOCYTOSIS OF MICROBES: Complexity in Action*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 825-52.
41. Kane, M.M. and D.M. Mosser. *Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation*. Curr Opin Hematol, 2000. **7**(1): p. 26-31.
42. Fraser, I.P., H. Koziel and R.A. Ezekowitz. *The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity*. Semin Immunol, 1998. **10**(5): p. 363-72.
43. Hashimoto, C., K.L. Hudson and K.V. Anderson. *The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein*. Cell, 1988. **52**(2): p. 269-79.
44. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart and J.A. Hoffmann. *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996. **86**(6): p. 973-83.
45. Janeway, C.A., Jr. *How the immune system works to protect the host from infection: a personal view*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7461-8.
46. Underhill, D.M., A. Ozinsky, A.M. Hajjar, A. Stevens, C.B. Wilson, M. Bassetti and A. Aderem. *The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens*. Nature, 1999. **401**(6755): p. 811-5.
47. Schnare, M., G.M. Barton, A.C. Holt, K. Takeda, S. Akira and R. Medzhitov. *Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 947-50.
48. Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R.L. Modlin and S. Akira. *Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins*. J Immunol, 2002. **169**(1): p. 10-4.
49. Takeuchi, O., K. Hoshino and S. Akira. *Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection*. J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5392-6.
50. Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira. *Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-*

- negative and gram-positive bacterial cell wall components.* Immunity, 1999. 11(4): p. 443-51.
51. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M.Y. Liu, C.V. Huffel, *et al.* *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene.* Science, 1998. 282(5396): p. 2085-8.
 52. Qureshi, S.T., L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K.J. Moore, P. Gros and D. Malo. *Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4).* J Exp Med, 1999. 189(4): p. 615-25.
 53. Ohashi, K., V. Burkart, S. Flohe and H. Kolb. *Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex.* J Immunol, 2000. 164(2): p. 558-61.
 54. Takeuchi, O., T. Kawai, P.F. Muhlradt, M. Morr, J.D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda and S. Akira. *Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6.* Int Immunol, 2001. 13(7): p. 933-40.
 55. Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, *et al.* *Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway.* Nat Immunol, 2002.
 56. Diefenbach, A., H. Schindler, N. Donhauser, E. Lorenz, T. Laskay, J. MacMicking, M. Rollinghoff, I. Gresser and C. Bogdan. *Type 1 interferon (IFNalpha/beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite.* Immunity, 1998. 8(1): p. 77-87.
 57. Murray, H.W., G.L. Spitalny and C.F. Nathan. *Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma.* J Immunol, 1985. 134(3): p. 1619-22.
 58. Farrar, M.A. and R.D. Schreiber. *The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor.* Annu Rev Immunol, 1993. 11: p. 571-611.
 59. Bach, E.A., M. Aguet and R.D. Schreiber. *The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling.* Annu Rev Immunol, 1997. 15: p. 563-91.
 60. Mach, B., V. Steimle, E. Martinez-Soria and W. Reith. *Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease.* Annu Rev Immunol, 1996. 14: p. 301-31.
 61. Boehm, U., T. Klamp, M. Groot and J.C. Howard. *Cellular responses to interferon-gamma.* Annu Rev Immunol, 1997. 15: p. 749-95.
 62. Inoue, M., A. Kishimoto, Y. Takai and Y. Nishizuka. *Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain.* J Biol Chem, 1977. 252(21): p. 7610-6.

63. Takai, Y., A. Kishimoto, M. Inoue and Y. Nishizuka. *Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum.* J Biol Chem, 1977. **252**(21): p. 7603-9.
64. Nishizuka, Y. *Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C.* Science, 1992. **258**(5082): p. 607-14.
65. Herrera-Velitz, P., K.L. Knutson and N.E. Reiner. *Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of protein kinase C-zeta in bacterial lipopolysaccharide-treated human monocytes.* J Biol Chem, 1997. **272**(26): p. 16445-52.
66. Kovacs, E.J., D. Radzioch, H.A. Young and L. Varesio. *Differential inhibition of IL-1 and TNF-alpha mRNA expression by agents which block second messenger pathways in murine macrophages.* J Immunol, 1988. **141**(9): p. 3101-5.
67. Novotney, M., Z.L. Chang, H. Uchiyama and T. Suzuki. *Protein kinase C in tumoricidal activation of mouse macrophage cell lines.* Biochemistry, 1991. **30**(22): p. 5597-604.
68. Fujihara, M., N. Connolly, N. Ito and T. Suzuki. *Properties of protein kinase C isoforms (beta II, epsilon, and zeta) in a macrophage cell line (J774) and their roles in LPS-induced nitric oxide production.* J Immunol, 1994. **152**(4): p. 1898-906.
69. Diaz-Guerra, M.J., O.G. Bodelon, M. Velasco, R. Whelan, P.J. Parker and L. Bosca. *Up-regulation of protein kinase C-epsilon promotes the expression of cytokine-inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 cells.* J Biol Chem, 1996. **271**(50): p. 32028-33.
70. Diaz-Meco, M.T., E. Berra, M.M. Municio, L. Sanz, J. Lozano, et al. *A dominant negative protein kinase C zeta subspecies blocks NF-kappa B activation.* Mol Cell Biol, 1993. **13**(8): p. 4770-5.
71. Chen, C.C., J.K. Wang and S.B. Lin. *Antisense oligonucleotides targeting protein kinase C-alpha, -beta I, or -delta but not -eta inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages: involvement of a nuclear factor kappa B-dependent mechanism.* J Immunol, 1998. **161**(11): p. 6206-14.
72. Breton, A. and A. Descoteaux. *Protein kinase C-alpha participates in Fc gamma R-mediated phagocytosis in macrophages.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **276**(2): p. 472-6.
73. Abeliovich, A., C. Chen, Y. Goda, A.J. Silva, C.F. Stevens and S. Tonegawa. *Modified hippocampal long-term potentiation in PKC gamma-mutant mice.* Cell, 1993. **75**(7): p. 1253-62.

74. Abeliovich, A., R. Paylor, C. Chen, J.J. Kim, J.M. Wehner and S. Tonegawa. *PKC gamma mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1263-71.
75. Leitges, M., C. Schmedt, R. Guinamard, J. Davoust, S. Schaal, S. Stabel and A. Tarakhovsky. *Immunodeficiency in protein kinase cbeta-deficient mice*. Science, 1996. **273**(5276): p. 788-91.
76. Letiges, M., M. Plomann, M.L. Standaert, G. Bandyopadhyay, M.P. Sajan, Y. Kanoh and R.V. Farese. *Knockout of PKCalpha Enhances Insulin Signaling Through PI3K*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(4): p. 847-58.
77. Standaert, M.L., G. Bandyopadhyay, L. Galloway, J. Soto, Y. Ono, U. Kikkawa, R.V. Farese and M. Leitges. *Effects of knockout of the protein kinase C beta gene on glucose transport and glucose homeostasis*. Endocrinology, 1999. **140**(10): p. 4470-7.
78. Miyamoto, A., K. Nakayama, H. Imaki, S. Hirose, Y. Jiang, *et al.* *Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase Cdelta*. Nature, 2002. **416**(6883): p. 865-9.
79. Castrillo, A., D.J. Pennington, F. Otto, P.J. Parker, M.J. Owen and L. Bosca. *Protein kinase Cepsilon is required for macrophage activation and defense against bacterial infection*. J Exp Med, 2001. **194**(9): p. 1231-42.
80. Leitges, M., L. Sanz, P. Martin, A. Duran, U. Braun, *et al.* *Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway*. Mol Cell, 2001. **8**(4): p. 771-80.
81. Sun, Z., C.W. Arendt, W. Ellmeier, E.M. Schaeffer, M.J. Sunshine, *et al.* *PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes*. Nature, 2000. **404**(6776): p. 402-7.
82. Isakov, N. and A. Altman. *Protein kinase C(theta) in T cell activation*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 761-94.
83. Rietschel, E.T., H. Brade, O. Holst, L. Brade, S. Muller-Loennies, *et al.* *Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **216**: p. 39-81.
84. Wenzel, R.P. *Anti-endotoxin monoclonal antibodies--a second look*. N Engl J Med, 1992. **326**(17): p. 1151-3.
85. Fenton, M.J. and D.T. Golenbock. *LPS-binding proteins and receptors*. J Leukoc Biol, 1998. **64**(1): p. 25-32.
86. Yu, B. and S.D. Wright. *Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein. Transfer of LPS to soluble CD14*. J Biol Chem, 1996. **271**(8): p. 4100-5.

87. Wurfel, M.M., B.G. Monks, R.R. Ingalls, R.L. Dedrick, R. Delude, *et al.* *Targeted deletion of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein gene leads to profound suppression of LPS responses ex vivo, whereas in vivo responses remain intact.* J Exp Med, 1997. **186**(12): p. 2051-6.
88. Jack, R.S., X. Fan, M. Bernheiden, G. Rune, M. Ehlers, *et al.* *Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection.* Nature, 1997. **389**(6652): p. 742-5.
89. Akira, S. *Toll-like receptors and innate immunity.* Adv Immunol, 2001. **78**: p. 1-56.
90. Haziot, A., E. Ferrero, F. Kontgen, N. Hijiya, S. Yamamoto, J. Silver, C.L. Stewart and S.M. Goyert. *Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice.* Immunity, 1996. **4**(4): p. 407-14.
91. Devitt, A., O.D. Moffatt, C. Raykundalia, J.D. Capra, D.L. Simmons and C.D. Gregory. *Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells.* Nature, 1998. **392**(6675): p. 505-9.
92. Cocco, R.E. and D.S. Ucker. *Distinct modes of macrophage recognition for apoptotic and necrotic cells are not specified exclusively by phosphatidylserine exposure.* Mol Biol Cell, 2001. **12**(4): p. 919-30.
93. Wright, S.D., R.A. Ramos, P.S. Tobias, R.J. Ulevitch and J.C. Mathison. *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein.* Science, 1990. **249**(4975): p. 1431-3.
94. Haziot, A., S. Chen, E. Ferrero, M.G. Low, R. Silber and S.M. Goyert. *The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage.* J Immunol, 1988. **141**(2): p. 547-52.
95. Filipp, D., K. Alizadeh-Khiavi, C. Richardson, A. Palma, N. Paredes, O. Takeuchi, S. Akira and M. Julius. *Soluble CD14 enriched in colostrum and milk induces B cell growth and differentiation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(2): p. 603-8.
96. Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda and S. Akira. *Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product.* J Immunol, 1999. **162**(7): p. 3749-52.
97. Akashi, S., R. Shimazu, H. Ogata, Y. Nagai, K. Takeda, M. Kimoto and K. Miyake. *Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages.* J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3471-5.

98. Lord, K.A., B. Hoffman-Liebermann and D.A. Liebermann. *Complexity of the immediate early response of myeloid cells to terminal differentiation and growth arrest includes ICAM-1, Jun-B and histone variants*. *Oncogene*, 1990. **5**(3): p. 387-96.
99. Hultmark, D. *Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **199**(1): p. 144-6.
100. Adachi, O., T. Kawai, K. Takeda, M. Matsumoto, H. Tsutsui, M. Sakagami, K. Nakanishi and S. Akira. *Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function*. *Immunity*, 1998. **9**(1): p. 143-50.
101. Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira. *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. *Immunity*, 1999. **11**(1): p. 115-22.
102. Horng, T., G.M. Barton and R. Medzhitov. *TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(9): p. 835-41.
103. Fitzgerald, K.A., E.M. Palsson-McDermott, A.G. Bowie, C.A. Jefferies, A.S. Mansell, *et al.* *Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction*. *Nature*, 2001. **413**(6851): p. 78-83.
104. Horng, T., G.M. Barton, R.A. Flavell and R. Medzhitov. *The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors*. *Nature*, 2002. **420**(6913): p. 329-33.
105. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, H. Sanjo, S. Uematsu, *et al.* *Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4*. *Nature*, 2002. **420**(6913): p. 324-9.
106. Burns, K., J. Clatworthy, L. Martin, F. Martinon, C. Plumpton, *et al.* *Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(6): p. 346-51.
107. Zhang, G. and S. Ghosh. *Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(9): p. 7059-65.
108. Kobayashi, K., L.D. Hernandez, J.E. Galan, C.A. Janeway, Jr., R. Medzhitov and R.A. Flavell. *IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling*. *Cell*, 2002. **110**(2): p. 191-202.
109. Martin, M., G.F. Bol, A. Eriksson, K. Resch and R. Brigelius-Flohe. *Interleukin-1-induced activation of a protein kinase co-precipitating with the type I interleukin-1 receptor in T cells*. *Eur J Immunol*, 1994. **24**(7): p. 1566-71.

110. Thomas, J.A., J.L. Allen, M. Tsen, T. Dubnicoff, J. Danao, X.C. Liao, Z. Cao and S.A. Wasserman. *Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor-associated kinase*. J Immunol, 1999. **163**(2): p. 978-84.
111. Martin, M.U. and H. Wesche. *Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(3): p. 265-80.
112. Swantek, J.L., M.F. Tsen, M.H. Cobb and J.A. Thomas. *IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin*. J Immunol, 2000. **164**(8): p. 4301-6.
113. Li, S., A. Strelow, E.J. Fontana and H. Wesche. *IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(8): p. 5567-72.
114. Xu, H., J.A. Gonzalo, Y. St Pierre, I.R. Williams, T.S. Kupper, R.S. Cotran, T.A. Springer and J.C. Gutierrez-Ramos. *Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 95-109.
115. Netea, M.G., B.J. Kullberg, L.A. Joosten, T. Sprong, I. Verschueren, O.C. Boerman, F. Amiot, W.B. van den Berg and J.W. Van der Meer. *Lethal Escherichia coli and Salmonella typhimurium endotoxemia is mediated through different pathways*. Eur J Immunol, 2001. **31**(9): p. 2529-38.
116. Kopp, E.B. and S. Ghosh. *NF-kappa B and rel proteins in innate immunity*. Adv Immunol, 1995. **58**: p. 1-27.
117. Sen, R. and D. Baltimore. *Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences*. Cell, 1986. **46**(5): p. 705-16.
118. Karin, M. and Y. Ben-Neriah. *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 621-63.
119. Li, Q. and I.M. Verma. *NF-kappaB regulation in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 725-34.
120. Ziegler-Heitbrock, H.W., A. Wedel, W. Schraut, M. Strobel, P. Wendelgass, T. Sternsdorf, P.A. Bauerle, J.G. Haas and G. Riethmuller. *Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers*. J Biol Chem, 1994. **269**(25): p. 17001-4.
121. Ghosh, S. and M. Karin. *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle*. Cell, 2002. **109** Suppl: p. S81-96.
122. Baeuerle, P.A. and T. Henkel. *Function and activation of NF-kappa B in the immune system*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 141-79.

123. Baeuerle, P.A. and D. Baltimore. *I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor*. Science, 1988. **242**(4878): p. 540-6.
124. Ghosh, S., M.J. May and E.B. Kopp. *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.
125. DiDonato, J.A., M. Hayakawa, D.M. Rothwarf, E. Zandi and M. Karin. *A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB*. Nature, 1997. **388**(6642): p. 548-54.
126. Regnier, C.H., H.Y. Song, X. Gao, D.V. Goeddel, Z. Cao and M. Rothe. *Identification and characterization of an IkappaB kinase*. Cell, 1997. **90**(2): p. 373-83.
127. Silverman, N. and T. Maniatis. *NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity*. Genes Dev, 2001. **15**(18): p. 2321-42.
128. Peters, R.T. and T. Maniatis. *A new family of IKK-related kinases may function as I kappa B kinase kinases*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1471**(2): p. M57-62.
129. O'Connell, M.A., B.L. Bennett, F. Mercurio, A.M. Manning and N. Mackman. *Role of IKK1 and IKK2 in lipopolysaccharide signaling in human monocytic cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30410-4.
130. Dominguez, I., L. Sanz, F. Arenzana-Seisdedos, M.T. Diaz-Meco, J.L. Virelizier and J. Moscat. *Inhibition of protein kinase C zeta subspecies blocks the activation of an NF-kappa B-like activity in Xenopus laevis oocytes*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(2): p. 1290-5.
131. Figueira, L., J.A. McElhinny, G.D. Bren, W.S. MacMorrán, M.T. Diaz-Meco, J. Moscat and C.V. Paya. *Protein kinase C-zeta mediates NF-kappa B activation in human immunodeficiency virus-infected monocytes*. J Virol, 1996. **70**(1): p. 223-31.
132. Diaz-Meco, M.T., M.M. Municio, P. Sanchez, J. Lozano and J. Moscat. *Lambda-interacting protein, a novel protein that specifically interacts with the zinc finger domain of the atypical protein kinase C isotype lambda/iota and stimulates its kinase activity in vitro and in vivo*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(1): p. 105-14.
133. Lallena, M.J., M.T. Diaz-Meco, G. Bren, C.V. Paya and J. Moscat. *Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 2180-8.
134. Beg, A.A., W.C. Sha, R.T. Bronson, S. Ghosh and D. Baltimore. *Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B*. Nature, 1995. **376**(6536): p. 167-70.

135. Sha, W.C., H.C. Liou, E.I. Tuomanen and D. Baltimore. *Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses.* Cell, 1995. **80**(2): p. 321-30.
136. Foletta, V.C., D.H. Segal and D.R. Cohen. *Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1.* J Leukoc Biol, 1998. **63**(2): p. 139-52.
137. Liebermann, D.A., B. Gregory and B. Hoffman. *AP-1 (Fos/Jun) transcription factors in hematopoietic differentiation and apoptosis.* Int J Oncol, 1998. **12**(3): p. 685-700.
138. Karin, M., Z. Liu and E. Zandi. *AP-1 function and regulation.* Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 240-6.
139. Bailly, S., M. Fay, N. Israel and M.A. Gougerot-Pocidallo. *The transcription factor AP-1 binds to the human interleukin 1 alpha promoter.* Eur Cytokine Netw, 1996. **7**(2): p. 125-8.
140. Field, S.J., R.S. Johnson, R.M. Mortensen, V.E. Papaioannou, B.M. Spiegelman and M.E. Greenberg. *Growth and differentiation of embryonic stem cells that lack an intact c-fos gene.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(19): p. 9306-10.
141. Brown, J.R., H. Ye, R.T. Bronson, P. Dikkes and M.E. Greenberg. *A defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene fosB.* Cell, 1996. **86**(2): p. 297-309.
142. Hilberg, F., A. Aguzzi, N. Howells and E.F. Wagner. *c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis.* Nature, 1993. **365**(6442): p. 179-81.
143. Johnson, R.S., B. van Lingen, V.E. Papaioannou and B.M. Spiegelman. *A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture.* Genes Dev, 1993. **7**(7B): p. 1309-17.
144. Isshiki, H., S. Akira, O. Tanabe, T. Nakajima, T. Shimamoto, T. Hirano and T. Kishimoto. *Constitutive and interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene.* Mol Cell Biol, 1990. **10**(6): p. 2757-64.
145. Akira, S., H. Isshiki, T. Sugita, O. Tanabe, S. Kinoshita, Y. Nishio, T. Nakajima, T. Hirano and T. Kishimoto. *A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family.* Embo J, 1990. **9**(6): p. 1897-906.
146. Poli, V., F.P. Mancini and R. Cortese. *IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP.* Cell, 1990. **63**(3): p. 643-53.

147. Lekstrom-Himes, J. and K.G. Xanthopoulos. *Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors*. J Biol Chem, 1998. **273**(44): p. 28545-8.
148. Screpanti, I., L. Romani, P. Musiani, A. Modesti, E. Fattori, *et al.* *Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice*. Embo J, 1995. **14**(9): p. 1932-41.
149. Tanaka, T., S. Akira, K. Yoshida, M. Umemoto, Y. Yoneda, *et al.* *Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages*. Cell, 1995. **80**(2): p. 353-61.
150. Pizarro-Cerda, J., M. Desjardins, E. Moreno, S. Akira and J.P. Gorvel. *Modulation of endocytosis in nuclear factor IL-6(-/-) macrophages is responsible for a high susceptibility to intracellular bacterial infection*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3519-26.
151. Wadleigh, D.J., S.T. Reddy, E. Kopp, S. Ghosh and H.R. Herschman. *Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages*. J Biol Chem, 2000. **275**(9): p. 6259-66.
152. Gorgoni, B., D. Maritano, P. Marthyn, M. Righi and V. Poli. *C/EBP beta gene inactivation causes both impaired and enhanced gene expression and inverse regulation of IL-12 p40 and p35 mRNAs in macrophages*. J Immunol, 2002. **168**(8): p. 4055-62.
153. Dlaska, M. and G. Weiss. *Central role of transcription factor NF-IL6 for cytokine and iron-mediated regulation of murine inducible nitric oxide synthase expression*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 6171-7.
154. Yang, Z., N. Wara-Aswapati, C. Chen, J. Tsukada and P.E. Auron. *NF-IL6 (C/EBPbeta) vigorously activates il1b gene expression via a Spi-1 (PU.1) protein-protein tether*. J Biol Chem, 2000. **275**(28): p. 21272-7.
155. McConville, M.J., K.A. Mullin, S.C. Ilgoutz and R.D. Teasdale. *Secretory pathway of trypanosomatid parasites*. Microbiol Mol Biol Rev, 2002. **66**(1): p. 122-54; table of contents.
156. Ilgoutz, S.C. and M.J. McConville. *Function and assembly of the Leishmania surface coat*. Int J Parasitol, 2001. **31**(9): p. 899-908.
157. Descoteaux, A. and S.J. Turco. *Glycoconjugates in Leishmania infectivity*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1455**(2-3): p. 341-52.
158. Descoteaux, A. and S.J. Turco. *Functional aspects of the Leishmania donovani lipophosphoglycan during macrophage infection*. Microbes Infect, 2002. **4**(9): p. 975-81.

159. Choi, C.M. and E.A. Lerner. *Leishmaniasis: recognition and management with a focus on the immunocompromised patient*. Am J Clin Dermatol, 2002. 3(2): p. 91-105.
160. <http://www.who.int/emc/diseases/leish/>, O. *Surveillance and control of leishmaniasis*. 2002.
161. Sacks, D. and S. Kamhawi. *Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis*. Annu Rev Microbiol, 2001. 55: p. 453-83.
162. Turco, S.J. and A. Descoteaux. *The lipophosphoglycan of Leishmania parasites*. Annu Rev Microbiol, 1992. 46: p. 65-94.
163. Pimenta, P.F., E.M. Saraiva and D.L. Sacks. *The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of Leishmania major*. Exp Parasitol, 1991. 72(2): p. 191-204.
164. Solbach, W. and T. Laskay. *The host response to Leishmania infection*. Adv Immunol, 2000. 74: p. 275-317.
165. Descoteaux, A., G. Matlashewski and S.J. Turco. *Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by Leishmania donovani lipophosphoglycan*, in *J Immunol*. 1992. p. 3008-15.
166. Guha-Niyogi, A., D.R. Sullivan and S.J. Turco. *Glycoconjugate structures of parasitic protozoa*. Glycobiology, 2001. 11(4): p. 45R-59R.
167. Joshi, P.B., B.L. Kelly, S. Kamhawi, D.L. Sacks and W.R. McMaster. *Targeted gene deletion in Leishmania major identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor*. Mol Biochem Parasitol, 2002. 120(1): p. 33-40.
168. Brittingham, A., C.J. Morrison, W.R. McMaster, B.S. McGwire, K.P. Chang and D.M. Mosser. *Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis*. J Immunol, 1995. 155(6): p. 3102-11.
169. McConville, M.J. and J.M. Blackwell. *Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of Leishmania donovani. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids*. J Biol Chem, 1991. 266(23): p. 15170-9.
170. Beverley, S.M. and S.J. Turco. *Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite Leishmania*. Trends Microbiol, 1998. 6(1): p. 35-40.
171. Ryan, K.A., L.A. Garraway, A. Descoteaux, S.J. Turco and S.M. Beverley. *Isolation of virulence genes directing surface glycosyl-phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of Leishmania*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(18): p. 8609-13.

172. Descoteaux, A., Y. Luo, S.J. Turco and S.M. Beverley. *A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of Leishmania*. Science, 1995. **269**(5232): p. 1869-72.
173. Descoteaux, A., H.A. Avila, K. Zhang, S.J. Turco and S.M. Beverley. *Leishmania LPG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability*. Embo J, 2002. **21**(17): p. 4458-69.
174. Descoteaux, A., B.J. Mengeling, S.M. Beverley and S.J. Turco. *Leishmania donovani has distinct mannosylphosphoryltransferases for the initiation and elongation phases of lipophosphoglycan repeating unit biosynthesis*. Mol Biochem Parasitol, 1998. **94**(1): p. 27-40.
175. Sacks, D.L., G. Modi, E. Rowton, G. Spath, L. Epstein, S.J. Turco and S.M. Beverley. *The role of phosphoglycans in Leishmania-sand fly interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 406-11.
176. Sacks, D.L., P.F. Pimenta, M.J. McConville, P. Schneider and S.J. Turco. *Stage-specific binding of Leishmania donovani to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan*. J Exp Med, 1995. **181**(2): p. 685-97.
177. Valenzuela, J.G., Y. Belkaid, M.K. Garfield, S. Mendez, S. Kamhawi, E.D. Rowton, D.L. Sacks and J.M. Ribeiro. *Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein*. J Exp Med, 2001. **194**(3): p. 331-42.
178. Morris, R.V., C.B. Shoemaker, J.R. David, G.C. Lanzaro and R.G. Titus. *Sandfly maxadilan exacerbates infection with Leishmania major and vaccinating against it protects against L. major infection*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5226-30.
179. Belkaid, Y., S. Kamhawi, G. Modi, J. Valenzuela, N. Noben-Trauth, E. Rowton, J. Ribeiro and D.L. Sacks. *Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of Leishmania major infection in the mouse ear dermis*. J Exp Med, 1998. **188**(10): p. 1941-53.
180. Reed, S.G. *Leishmaniasis vaccination: targeting the source of infection*. J Exp Med, 2001. **194**(3): p. F7-F9.
181. Murray, H.W. and C.F. Nathan. *Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral Leishmania donovani*. J Exp Med, 1999. **189**(4): p. 741-6.
182. Shiloh, M.U., J.D. MacMicking, S. Nicholson, J.E. Brause, S. Potter, M. Marino, F. Fang, M. Dinauer and C. Nathan. *Phenotype of mice and macrophages*

- deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase*. *Immunity*, 1999. **10**(1): p. 29-38.
183. Descoteaux, A. and G. Matlashewski. *c-fos and tumor necrosis factor gene expression in Leishmania donovani- infected macrophages*. *Mol Cell Biol*, 1989. **9**(11): p. 5223-7.
184. Moore, K.J. and G. Matlashewski. *Intracellular infection by Leishmania donovani inhibits macrophage apoptosis*. *J Immunol*, 1994. **152**(6): p. 2930-7.
185. Buates, S. and G. Matlashewski. *General suppression of macrophage gene expression during Leishmania donovani infection*. *J Immunol*, 2001. **166**(5): p. 3416-22.
186. Nandan, D. and N.E. Reiner. *Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with Leishmania donovani: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1*. *Infect Immun*, 1995. **63**(11): p. 4495-500.
187. Blanchette, J., N. Racette, R. Faure, K.A. Siminovitch and M. Olivier. *Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation*. *Eur J Immunol*, 1999. **29**(11): p. 3737-44.
188. Forget, G., K.A. Siminovitch, S. Brochu, S. Rivest, D. Radzioch and M. Olivier. *Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine leishmaniasis*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(11): p. 3185-96.
189. Reiner, S.L., S. Zheng, Z.E. Wang, L. Stowring and R.M. Locksley. *Leishmania promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection*. *J Exp Med*, 1994. **179**(2): p. 447-56.
190. Carrera, L., R.T. Gazzinelli, R. Badolato, S. Hieny, W. Muller, R. Kuhn and D.L. Sacks. *Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice*. *J Exp Med*, 1996. **183**(2): p. 515-26.
191. Wilson, M.E., B.M. Young, B.L. Davidson, K.A. Mente and S.E. McGowan. *The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis*. *J Immunol*, 1998. **161**(11): p. 6148-55.
192. Green, S.J., M.S. Meltzer, J.B. Hibbs, Jr. and C.A. Nacy. *Activated macrophages destroy intracellular Leishmania major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism*. *J Immunol*, 1990. **144**(1): p. 278-83.
193. Proudfoot, L., A.V. Nikolaev, G.J. Feng, W.Q. Wei, M.A. Ferguson, J.S. Brimacombe and F.Y. Liew. *Regulation of the expression of nitric oxide synthase*

- and leishmanicidal activity by glycoconjugates of Leishmania lipophosphoglycan in murine macrophages.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10984-9.
194. Garin, J., R. Diez, S. Kieffer, J.F. Dermine, S. Duclos, E. Gagnon, R. Sadoul, C. Rondeau and M. Desjardins. *The phagosome proteome: insight into phagosome functions.* J Cell Biol, 2001. **152**(1): p. 165-80.
 195. Desjardins, M. and A. Descoteaux. *Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan.* J Exp Med, 1997. **185**(12): p. 2061-8.
 196. Scianimanico, S., M. Desrosiers, J.F. Dermine, S. Meresse, A. Descoteaux and M. Desjardins. *Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by Leishmania donovani promastigotes.* Cell Microbiol, 1999. **1**(1): p. 19-32.
 197. Holm, A., K. Tejle, K.E. Magnusson, A. Descoteaux and B. Rasmusson. *Leishmania donovani lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation.* Cell Microbiol, 2001. **3**(7): p. 439-47.
 198. Turco, S.J., G.F. Spath and S.M. Beverley. *Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between Leishmania species.* Trends Parasitol, 2001. **17**(5): p. 223-6.
 199. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr. *Innate immune recognition and control of adaptive immune responses.* Semin Immunol, 1998. **10**(5): p. 351-3.
 200. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. *Innate immune recognition: mechanisms and pathways.* Immunol Rev, 2000. **173**: p. 89-97.
 201. Lanier, L.L. *NK cell receptors.* Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 359-93.
 202. Kaisho, T. and S. Akira. *Critical roles of Toll-like receptors in host defense.* Crit Rev Immunol, 2000. **20**(5): p. 393-405.
 203. Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R.W. Malefyt, R.A. Kastelein, F. Bazan and Y.J. Liu. *Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens.* J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 863-9.
 204. Weinstein, S.L., J.S. Sanghera, K. Lemke, A.L. DeFranco and S.L. Pelech. *Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in macrophages.* J Biol Chem, 1992. **267**(21): p. 14955-62.
 205. Shapira, L., S. Takashiba, C. Champagne, S. Amar and T.E. Van Dyke. *Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in*

- lipopolysaccharide-induced TNF-alpha and IL-1 beta production by human monocytes.* J Immunol, 1994. **153**(4): p. 1818-24.
206. Meng, F. and C.A. Lowell. *Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn.* J Exp Med, 1997. **185**(9): p. 1661-70.
207. Shinji, H., K.S. Akagawa and T. Yoshida. *LPS induces selective translocation of protein kinase C-beta in LPS-responsive mouse macrophages, but not in LPS-nonresponsive mouse macrophages.* J Immunol, 1994. **153**(12): p. 5760-71.
208. Kontny, E., M. Kurowska, K. Szczepanska and W. Maslinski. *Rottlerin, a PKC isozyme-selective inhibitor, affects signaling events and cytokine production in human monocytes.* J Leukoc Biol, 2000. **67**(2): p. 249-58.
209. Trautwein, C., C. Caelles, P. van der Geer, T. Hunter, M. Karin and M. Chojkier. *Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain.* Nature, 1993. **364**(6437): p. 544-7.
210. Kolch, W., G. Heidecker, G. Kochs, R. Hummel, H. Vahidi, H. Mischak, G. Finkenzeller, D. Marme and U.R. Rapp. *Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation.* Nature, 1993. **364**(6434): p. 249-52.
211. Nakajima, T., S. Kinoshita, T. Sasagawa, K. Sasaki, M. Naruto, T. Kishimoto and S. Akira. *Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(6): p. 2207-11.
212. Gupta, D.J., Y.P. and R Dziarski, R. *Peptidoglycan induces transcription and secretion of TNF-alpha and activation of lyn, extracellular signal-regulated kinase, and rsk signal transduction proteins in mouse macrophages.* The Journal of Immunology, 1995. **155**(5): p. 2620-2630.
213. Buck, M., V. Poli, P. van der Geer, M. Chojkier and T. Hunter. *Phosphorylation of rat serine 105 or mouse threonine 217 in C/EBP beta is required for hepatocyte proliferation induced by TGF alpha.* Mol Cell, 1999. **4**(6): p. 1087-92.
214. Mahoney, C.W., J. Shuman, S.L. McKnight, H.C. Chen and K.P. Huang. *Phosphorylation of CCAAT-enhancer binding protein by protein kinase C attenuates site-selective DNA binding.* J Biol Chem, 1992. **267**(27): p. 19396-403.
215. Williams, S.C., M. Baer, A.J. Dillner and P.F. Johnson. *CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity.* Embo J, 1995. **14**(13): p. 3170-83.
216. Caivano, M., B. Gorgoni, P. Cohen and V. Poli. *The induction of cyclooxygenase-2 mRNA in macrophages is biphasic and requires both CCAAT enhancer-binding*

- protein beta (C/EBP beta) and C/EBP delta transcription factors. J Biol Chem, 2001. 276(52): p. 48693-701.*
217. Williams, S.C., N.D. Angerer and P.F. Johnson. *C/EBP proteins contain nuclear localization signals imbedded in their basic regions. Gene Expr, 1997. 6(6): p. 371-85.*
 218. St-Denis, A., V. Caouras, F. Gervais and A. Descoteaux. *Role of protein kinase C-alpha in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages. J Immunol, 1999. 163(10): p. 5505-11.*
 219. Reddy, S.T., W. D.J. and H. H.R. *Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene in activated mast cells. J Biol Chem, 2000. 275(5): p. 3107-3113.*
 220. Gorgoni, B., M. Caivano, C. Arizmendi and V. Poli. *The transcription factor C/EBPbeta is essential for inducible expression of the cox-2 gene in macrophages but not in fibroblasts. J Biol Chem, 2001. 276(44): p. 40769-77.*
 221. May, M.J. and S. Ghosh. *Signal transduction through NF-kappa B. Immunol Today, 1998. 19(2): p. 80-8.*
 222. Hu, J., S.K. Roy, P.S. Shapiro, S.R. Rodig, S.P. Reddy, L.C. Platanius, R.D. Schreiber and D.V. Kalvakolanu. *ERK1 and ERK2 activate CCAAT/enhancer-binding protein-beta-dependent gene transcription in response to interferon-gamma. J Biol Chem, 2001. 276(1): p. 287-97.*
 223. Ilg, T., M. Demar and D. Harbecke. *Phosphoglycan repeat-deficient Leishmania mexicana parasites remain infectious to macrophages and mice. J Biol Chem, 2001. 276(7): p. 4988-97.*
 224. Fadok, V.A., D.L. Bratton, D.M. Rose, A. Pearson, R.A. Ezekewitz and P.M. Henson. *A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. Nature, 2000. 405(6782): p. 85-90.*
 225. de Freitas Balanco, J.M., M.E. Moreira, A. Bonomo, P.T. Bozza, G. Amarante-Mendes, C. Pirmez and M.A. Barcinski. *Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. Curr Biol, 2001. 11(23): p. 1870-3.*
 226. Barral, A., M. Barral-Netto, E.C. Yong, C.E. Brownell, D.R. Twardzik and S.G. Reed. *Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for Leishmania braziliensis. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(8): p. 3442-6.*

ANNEXE II

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

St-Denis A, Chano F, Tremblay P, St-Pierre Y, Descoteaux A.
Protein kinase C-alpha modulates lipopolysaccharide-induced functions in
a murine macrophage cell line.
The Journal of biological chemistry. 1998 Dec 4;273(49):32787-92.
PubMed PMID: 9830023.