UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
CENTRE INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

RÔLE DES PROTÉINES DOK DANS LA RÉGULATION DE LA PHAGOCYTOSE ET L'INFECTION PAR *LEISHMANIA* DANS LES MACROPHAGES

Par

Héctor ÁLVAREZ DE CELIS

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître
en sciences (M.Sc) de **Virologie et Immunologie**

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Maritza Jaramillo INRS Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	Martin Olivier McGill University
Directeur de recherche	Pascale Duplay INRS Institut Armand-Frappier

© Droits réservés de Héctor ÁLVAREZ DE CELIS, 2013

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier le Dr Pascale Duplay pour m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que pour l'aide et l'encadrement qu'elle m'a apportés. Je la remercie aussi pour sa confiance en moi, ses conseils et son support scientifique et personnel.

Ensuite, je remercie le Dr Albert Descoteaux pour l'aide et les conseils dans le travail avec *Leishmania* et les macrophages. Merci également à Marcel Desrosiers pour son aide précieuse en cytométrie en flux et microscopie confocale.

Je n'oublierai pas de remercier mes collègues du laboratoire qui m'ont aidé dans tout ce qu'ils ont pu, merci à Mitra pour son aide, son support et sa patience, merci aussi à Silvana et Gilles. Aussi un gros merci aux membres du laboratoire Descoteaux pour leur aide, conseils et patience. Merci à Christine, Carolina, Lydie et le reste des membres du labo. Un Merci spécial pour Neda Goli, pour son support inconditionnel, ses conseils autant dans le labo comme en dehors du labo, son immense patience et son aide avec les parasites.

Je suis également éternellement reconnaissant pour l'amour, le soutien et les encouragements incessants de ma mère Eugenia et mes grand parents Nori et Felix qui m'ont permis avec l'éducation et les valeurs qu'ils m'ont donnés d'arriver à être ce que je suis maintenant, mes tantes Amor et Margarita pour leur conseils et support et le reste de ma famille. Aussi je veux remercier de façon spéciale Caroline sans laquelle je n'aurai pas pu finir cette maîtrise, et aussi à Jessie, mes supports principaux au Canada et pendant mes études ici, pour m'avoir accompagné dans une période de ma vie qui des fois n'était pas si facile que ça, merci pour votre aide et compréhension. Je veux aussi remercier Michelle, la « coupable » qui m'a fait venir au Québec ainsi que Robert pour m'avoir montré l'institut Armand-Frappier. Un petit mot aussi pour remercier le support de mes amis Gustavo, Colinas et les autres amis en Espagne, au Québec ou au Mexique qui m'ont toujours montré leur affection.

GRACIAS A TODOS Y TODAS!!

RÉSUMÉ

La famille des protéines Dok est composée de 7 membres (Dok-1 à Dok-7). Seuls, Dok-1, Dok-2 et Dok-3 sont exprimées dans les macrophages. Dans ces cellules, il a été montré que les protéines Dok, agissent comme régulateurs négatifs de plusieurs réponses cellulaires comme celle qui a lieu suite à la stimulation par le LPS, plusieurs cytokines et facteurs de croissance. Cette régulation négative passe notamment par l'inhibition de l'activation de la voie ERK1/2.

Au cours de ce projet de recherche, nous avons étudié chez le macrophage, le rôle des protéines Dok dans la phagocytose de billes de latex et lors de l'infection avec des promastigotes de *Leishmania major*. *L. major* est un parasite protozoaire qui produit la leishmaniose cutanée et qui a la capacité de modifier les fonctions et la signalisation de la cellule hôte. Les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMM) déficients pour l'expression de Dok-1 et Dok-2 phagocytent des billes de latex opsonisées avec des IgG de façon comparable à celle de cellules de type sauvage. De la même façon, l'internalisation des promastigotes de *L. major* dans des BMM *Dok-1/Dok-2*$^{-/-}$ est normale. De plus, l'activation d'ERK1/2 et Akt induite par l'entrée des parasites ou par l'activation des récepteurs Fc est indépendente des protéines Dok-1 et Dok-2.

Nous avons également montré que les protéines Dok-1 et Dok-2 sont recrutées à la membrane du phagosome lors de la phagocytose de billes de latex et que ce recrutement se maintient pendant la maturation du phagosome. De façon surprenante, Dok-1 n'est pas présente à la membrane des phagosomes infectés avec *L. major*. Par contre, après infection des BMM avec des promastigotes de *L. major* déficients pour la métalloprotéase GP63, Dok-1 est recrutée au phagosome. Ce résultat indique clairement que GP63 dégrade Dok-1. De plus, par une approche biochimique, nous montrons que tout comme Dok-1, les protéines Dok-2 et Dok-3 sont dégradées par la metalloprotéase GP63.

Afin d'étudier l'impact des protéines Dok sur la réponse du macrophage suite à une infection par *Leishmania major*, nous avons comparé la production de NO et TNF chez des BMM *Dok-1/Dok-2*$^{-/-}$ et de type sauvage. Nous démontrons que

les protéines Dok-1 et Dok-2 régulent positivement la production de NO et TNF suite à une infection par *L. major* et ceci de façon indépendante de GP63

En conclusion, cette étude met en évidence l'implication des protéines Dok dans la phagocytose mais aussi dans les réponses du macrophage à l'infection par *Leishmania major*.

Etudiant

Directeur de recherche

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS III

RÉSUMÉ IV

TABLE DES MATIÈRES VI

LISTE DES TABLEAUX VIII

LISTE DE FIGURES IX

LISTE DES ABRÉVIATIONS XI

INTRODUCTION 1

REVUE DE LITTÉRATURE 4

1. LES MACROPHAGES 5

1.1. FONCTIONS 7

2. PROTÉINES DOK 9

2.1. Structure 12

2.1.1. Motifs ciblés par les domaines SH2 15

2.1.2. Domaine PTB 17

2.1.3. Domaine PH 19

2.2. Fonctions des protéines Dok 20

2.2.1. Fonctions des protéines Dok dans le système immunitaire 21

2.2.1.1. Proteines Dok dans les lymphocytes B 22

2.2.1.2. Proteines Dok dans les lymphocytes T 23

2.2.2. Rôles dans le développement tymique 25

2.2.2.1. Protéines Dok dans les cellules myéloïdes 25

2.2.3. Protéines Dok et son rôle comme suppresseurs tumoraux 27

3. LA PHAGOCYTOSE 29

3.1. Formation du phagosome et internalisation 30

3.1.1. Récepteurs 31

3.1.1.1. Récepteurs Fc (FcRs) 32

3.1.1.2. Récepteurs du complément (CRs) 34

3.1.1.3. Récepteurs de mannose (MRs) 35

3.1.1.4. Récepteurs scavenger (SR) 36

3.2. **Maturation du phagosome** **39**

3.2.1. Phagosome précoce 40

3.2.2. Phagosome tardif 40

3.2.3. Phagolysosome 41

3.3. **Signalisation et phagocytose** **42**

4. *LEISHMANIA* **44**

4.1. **Leishmaniose** **44**

4.2. **Facteurs de virulence de *Leishmania*** **47**

4.2.1. Métalloprotéase GP63 48

4.2.1.1. Structure 49

4.2.1.2. Expression de la GP63 et entrée dans le macrophage 50

4.2.1.3. Fonctions 53

4.2.2. Lipophosphoglycane (LPG) 54

4.3. **INTERACTION *LEISHMANIA*-MACROPHAGE** **55**

4.3.1. Internalisation de *Leishmania* dans le macrophage 55

4.3.2. Inhibition de la maturation du phagosome 56

4.3.3. Inhibition des réponses du macrophage 58

4.3.3.1. Suppression de la production des espèces réactives de l'oxygène de l'azote 58

4.3.3.2. Exclusion de la pompe à protons V-ATPase dans la maturation des phagosomes 60

4.3.3.3. Blocage de la présentation antigénique par les molécules de CMH de classe II (CMH II) 61

4.3.3.4. Régulation du système transcriptionnel et traductionnel de la cellule 61

4.3.3.5. Régulation de la production de cytokines 62

4.3.4. Inhibition des voies de signalisation de MAPKs et JAK/STAT 63

ARTICLE **66**

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES **108**

DISCUSSION **114**

CONCLUSION **121**

RÉFÉRENCES **123**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Expression des protéines Dok-1, Dok-2 et Dok-3 dans les cellules hématopoïétiques..... 11

Tableau 2. Protéines qui interagissent avec des tyrosines phosphorylées des protéines Dok via des domaines SH2 17

Tableau 3. Protéines qui interagissent avec le domaine PTB des protéines Dok..... 18

Tableau 4. Récepteurs impliqués dans la phosphorylation des protéines Dok 21

Tableau 5. Voies de signalisation affectées par l'absence des protéines Dok.. 22

LISTE DE FIGURES

Figure 1 : La lignée cellulaire des phagocytes mononucléaires et le control de son développement..... 6

Figure 2. Arbre phylogénétique des protéines Dok murines. L'arbre a été établi à partir de séquences complètes des protéines..... 10

Figure 3. Comparaison de la séquence d'acides aminés de Dok-1 chez l'humain et chez la souris..... 13

Figure 4. Représentation schématique de la famille des protéines Dok chez la souris..... 14

Figure 5. Modèle de la voie de signalisation du TCR..... 25

Figure 6.Voies de signalisation activées lors de la phagocytose..... 33

Figure 7. Modèle de la voie de signalisation menant à l'activation des récepteurs Fc..... 38

Figure 8. Maturation du phagosome..... 42

Figure 9. Cycle de vie de *Leishmania*..... 47

Figure 10. Structure 3D de la métalloprotéase GP63..... 50

Figure 11. Entrée de la métalloprotéase GP63 dans la cellule hôte..... 52

Figure 12. Inhibition de la NADPH oxydase et la fusion des lysosomes au phagosome par *Leishmania*..... 59

Figure 13: Influence de *Leishmania* dans plusieurs voies de signalisation chez le macrophage..... 65

Figure 14. Détection avec différents anticorps de Dok-1 lors de l'activation via le TLR4..... 109

Figure 15. Traitement in vitro avec la phosphatase lambda..... 110

Figure 16 : Reconnaissance de Dok-1 et différentes contructions GST-Dok-1 par différents anticorps..... 111

Figure 17. Recrutement de LAMP1 au phagosome dans des cellules sauvages et KO pour Dok-1 et Dok-2..... 113

Figure 18. Sites de clivage potentiels des protéines Dok par GP63..... 119

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique

AP-1: Activator protein 1

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: Acide désoxyribonucléique messager

BCR: B cell receptor

BMM :Bone marrow-derived macrophage

Ca: Calcium

Cas: CRISPR-associated

CD: Cluster of differentiation

Cdc42: Cell division control protein 42

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CP: Cysteine protease

CpG: Cytosine-phosphate-Guanine site

CR: Complement receptor

CSF-1 : Colony-stimulating factor 1

CTLD: C-Type Lectin-Like Domain

Dok: Downstream of tyrosine kinase

EEA1: *Early Endosome Antigen 1*

EGFR: Epidermal growth factor receptor

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

FcαR: Fragment crystallizable α receptor

FcγR: Fragment crystallizable γ receptor

FcδR: Fragment crystallizable δ receptor

FcεR: Fragment crystallizable ε receptor

FcμR: Fragment crystallizable μ receptor

GEF: Guanine nucleotide exchange factor

GILP: Glycoinositolphospholipide

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GPI: Glycosylphosphatidylinositol

Grb-2: Growth factor receptor-bound protein 2

HEK: Human Embryonic Kidney 293 cells

Hrs: Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate

IFN: Interferon

IgA: Immunoglobuline A

IgD: Immunoglobuline D

IgE: Immunoglobuline E

IgG: Immunoglobuline G

IgM: Immunoglobuline M

IL: Interleukine

iNOS: Cytokine-inducible Nitric oxide synthase

ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITIM: Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

JAK: Janus Kinase

JNK: c-Jun N-terminal kinase

kDa: Kilodalton

LAMP: Lysosome-associated membrane glycoprotein

LAT: Linker of Activated T cells

Lck: Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

LCM : L929 cell-conditioned medium

LPG: Lipophosphoglycan

LPS: Lipopolysaccharide

LTA: Lipoteichoic acid

M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor

MacMARCKS: Myristoylated alanine-rich C kinase substrate related protein

MALP-2: Macrophage-activating lipopeptide 2

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

MARCKS: Myristylated alanine-rich C kinase substrate

MARCO: Macrophage receptor with collagenous structure

MR: Mannose receptor

MRP: MARCKS-related protein

MSP: Major surface protease

mTOR: Mammalian target of rapamycin

MuSK: Muscle-Specific Kinase

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

Nck: non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein

NFAT: Nuclear factor of activated T-cells

NK: natural killer

NO: Nitric oxide

PAMP: Pathogen-associated molecular patterns

PG: Phosphoglycane

PH: Pleckstrin homology

PI(3,4,5)P3: Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate

PI(3,4)P2 : Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate

PI(4,5)P2: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PI(5)P: Phosphatidylinositol-5-phosphate

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase

PKC: Protein kinase C

PP2A: Protein phosphatase 2

PPG: Proteophosphoglycane

PSP: Promastigote surface protease

PTB: Phosphotyrosine-binding domain

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

PTK: Protein tyrosine kinase

PTP-PEST: Protein Tyrosine Phosphatase PEST

PTP1B: Protein-tyrosine phosphatase 1B

Rac: Ras-related C3 botulinum toxin substrate

RasGAP: Rat sarcoma GTPase activating protein

RasGTP: Rat sarcoma guanosine triphosphate

Rho: Ras homolog

ROS: Reactive oxygen species

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction

SH2: SRC Homology 2

SH3: SRC Homology 3

SHIP-1: SH2-containing Inositol 5'-Phosphatase 1

SHP-1: Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1

siRNA: Small interfering RNA

SNARE: SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) receptor

SOCS: Suppressor of cytokine signaling

SOS: Son of sevenless protein

SR-A: Scavenger receptors A

SR: Scavenger receptors

SRBC: Sheep red blood cell

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

Syk: Spleen tyrosine kinase

SytV: synaptotagmine V

TAB1: Tubulin antisense-binding protein 1

TCPTP: T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase

TCR: T cell receptor

TGF: Transforming growth factor

TLR: Toll-like receptor

TNF: Tumor necrosis factor

UTR: Untranslated region

V-ATPase: Vacuolar-type H^+-ATPase

WASP: Wiskott–Aldrich Syndrome Protein

WHO: World health organization

ZAP-70: Zeta-chain-associated protein kinase 70

INTRODUCTION

La famille des protéines Dok présente 7 membres (Dok-1 - Dok-7) qui partagent des similarités structurales. Chez les cellules hématopoïétiques, seulement Dok-1, Dok-2 et Dok-3 sont exprimées. Les cellules de la lignée myéloïde, dont les macrophages, expriment les trois protéines. Dok-1, la première des protéines Dok décrites, a été caractérisée comme une protéine de 62 kDa qui co-immunoprécipite avec rasGAP, qui est un important inhibiteur de Ras (Yamanashi and Baltimore 1997). La protéine Ras dans sa forme RasGTP est capable de déclencher la cascade de phosphorylation des MAPK menant à l'activation d'ERK1/2 (Roberts and Der 2007). Il a été par la suite démontré que tout comme Dok-1, Dok-2, une fois phosphorylé, est aussi capable de lier RasGAP et d'inhiber ainsi la voie des MAPK ERK1/2 (Di Cristofano, Carpino et al. 1998). Enfin, bien qu'il n'y a pas d'association de RasGAP à Dok-3, Dok-3 a aussi la capacité d'inhiber la voie Ras/ERK1/2 par un mécanisme qui fait appel à la séquestration du complexe activateur de Ras Grb2/SOS (Honma, Higuchi et al. 2006). L'inhibition de la voie Ras/ERK1/2 est donc une propriété commune des protéines Dok-1, Dok-2 et Dok-3.

Chez le macrophage, les protéines Dok ont des fonctions de régulation négative dans la prolifération et la survie en réponse à certaines cytokines telle que le M-CSF (Mashima, Honda et al. 2010). Elles sont également capables d'interagir avec la phosphatase SHP-1, molécule importante dans la régulation de plusieurs voies de signalisation (Berg, Siminovitch et al. 1999). Les protéines Dok sont aussi des régulateurs négatifs de la voie du TLR-4 où elles régulent l'activation d'ERK ce qui a un impact dans la production des cytokines telles que TNF, IL-10 et IL-1β (Shinohara, Inoue et al. 2005).

L'activation d'ERK1/2 est essentielle pour plusieurs réponses cellulaires chez le macrophage, entre autres pour la phagocytose. La phagocytose est une des fonctions les plus importantes des macrophages. Elle permet l'élimination des particules non désirables telles que des débris cellulaires et des pathogènes. Par contre, certains pathogènes parasitaires sont capables d'utiliser le phagosome pour leur réplication, c'est le cas de *Leishmania*. Il a été montré chez les macrophages que la phosphorylation d'ERK est nécessaire pour la phagocytose via les récepteurs Fc, de *Francisella,* un parasite des macrophages (Parsa, Butchar et al. 2008). Il a également été montré que l'infection par *Leishmania*

induit une phosphorylation d'ERK qui est directement reliée à la production d'IL-10, ce qui permet la persistance de l'infection (Belkaid, Hoffmann et al. 2001; Yang, Mosser et al. 2007).

Dans ce projet, nous avons voulu déterminer le rôle des protéines Dok lors de la phagocytose et dans la réponse anti-microbienne du macrophage. Dans nos expériences de phagocytose, nous avons utilisé des particules simples comme des billes de latex ou des globules rouges de mouton opsonisées avec des IgG et des pathogènes qui interagissent d'une façon beaucoup plus complexe avec le phagocyte en induisant plusieurs réponses effectrices chez le macrophage comme c'est le cas de *Leishmania*.

Pour ce faire, nous avons entrepris de répondre aux objectifs suivants :

I. Analyser l'impact de l'absence des protéines Dok-1 et Dok-2 dans le processus de la phagocytose en contexte d'infection avec *Leishmania major* ou non.

II. Déterminer la localisation des protéines Dok dans le macrophage au repos et pendant la phagocytose de particules ou lors de l'infection avec *Leishmania major.*

III. Déterminer si la réponse antimicrobienne du macrophage lors de l'infection avec *Leishmania major* est modulée par les protéines Dok.

Ce mémoire commencera par une revue de littérature concernant les sujets plus importants abordés dans ce projet de recherche soient le macrophage, les protéines Dok, le processus de la phagocytose et finalement l'interaction du parasite *Leishmania* avec le macrophage. Ensuite, l'article scientifique suivra et finalement une section, avec la discussion et la conclusion de cette recherche, sera présentée.

REVUE DE LITTÉRATURE

1. LES MACROPHAGES

Les macrophages, du grec *makros*, « grand », et *phagein*, « manger », ont été décrits pour la premiere fois en 1883 par Elie Metchnikoff, un biologiste ukrainien lauréat du Prix Nobel de physiologie ou médecine de 1908 grâce à ses travaux précisément sur ce type cellulaire. L'étude et la caractérisation des macrophages ont beaucoup progressé à partir du moment où l'anticorps F4/80, un anticorps spécifique aux macrophages murins, a été produit (Austyn and Gordon 1981). On sait aujourd'hui que les macrophages sont parmi les cellules hématopoïétiques les plus précoces à apparaitre dans l'embryon où elles jouent un rôle majeur dans l'organogenèse et le remodelage des tissus.

Le développement des macrophages a été bien étudié et caractérisé, les macrophages dérivent d'un précurseur commun aux granulocytes et aux monocytes (Figure 1). Les premières étapes de leur développement ont lieu dans le foie fœtal et plus tard dans la moelle osseuse. Le promonocyte est le précurseur commun aux monocytes du sang et la majorité des macrophages tissulaires (Gordon, Lawson et al. 1992). Des millions de promonocytes sont produits chaque jour dans la moelle osseuse. Les promonocytes se différencient en monocytes qui quittent la moelle osseuse pour entrer dans la circulation sanguine, où ils vont rester pendant 8 heures, pendant ce temps ils vont augmenter de taille et finalement ils vont se repartir dans tous les tissus de l'organisme. Selon les besoins de l'organisme, les monocytes vont sortir de la voie sanguine et pénétrer dans les tissus où ils vont se différencier en cellules dendritiques ou en macrophages tissulaires (Gordon and Taylor 2005), les macrophages vont parfois avoir des fonctions spécifiques au tissu où ils se trouvent. Par exemple, une cellule de Kupffer ne va pas avoir tout à fait les mêmes fonctions qu'une cellule de Langerhans.

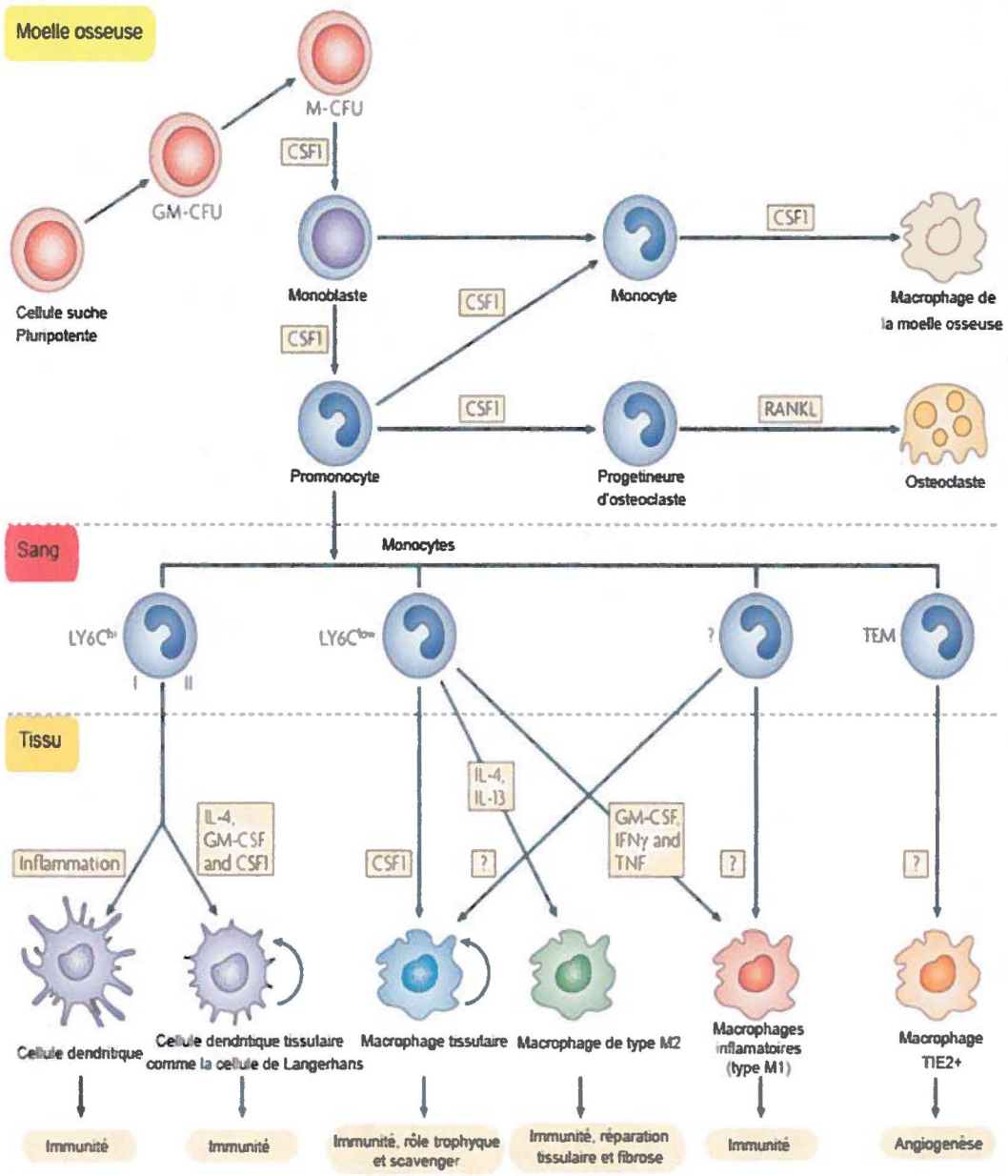


Figure 1 : La lignée cellulaire des phagocytes mononucléaires et le contrôle de son développement. Le développement des monocytes et des macrophages provient d'un précurseur commun. Chaque type de macrophage va pénétrer dans un tissu différent et réaliser des fonctions spécifiques. (modifié de (Pollard 2009))

1.1. **FONCTIONS**

Bien que les macrophages aient un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie des tissus grâce à leur capacité d'élimination des cellules sénescentes et de remodeler des tissus abîmés lors de l'inflammation, leur principal rôle est leurs fonctions dans la réponse immunitaire innée et adaptative afin d'assurer une surveillance de première ligne face à l'intrusion de micro-organismes pathogènes dans l'organisme. C'est pour cela que l'activation des macrophages et de ses fonctions microbicides peut être déclenchée par une variété de stimulus tels que des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMPs), dont le lipopolycaccharide (LPS) bactérien et l'exposition à plusieurs cytokines pro-inflammatoires, telles que les interférons (IFNs).

Les macrophages sont des cellules qui possédent des rôles très importants dans le maintien de l'homéostasie et dans la réponse immunitaire. Ils jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée, mais aussi ils contribuent à l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Pendant la réponse immunitaire, les macrophages peuvent jouer, à des moments différents, autant un rôle inflammatoire comme un rôle anti-inflammatoire.

Nous pouvons diviser les fonctions des macrophages en quatre groupes dépendamment du type de réponse :

- Les fonctions inflammatoires : Les macrophages activés secrètent un grand nombre de cytokines et chimiokines dont l'action peut se manifester de façon autocrine ou paracrine. Parmi ces molécules, nous pouvons remarquer la production d'IL-1, IL-8, IL-6, MIP-1α/β, TNF et des métabolites de l'acide arachadonique (Stout and Suttles 1997).
- Les fonctions comme cellules accessoires : Les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes qui expriment des molécules de costimulation, par exemple CD80, CD86 et CD48. En même temps, ce type cellulaire produit des cytokines de costimulation très importantes dont l'IL-1 et IIL-12 (Stout and Suttles 1997).

- Les fonctions anti-inflammatoires : Bien qu'ils possèdent des fonctions inflammatoires, les macrophages sont capables de produire des cytokines qui ont un effet anti-inflammatoire comme l'IL-1R, IL-10 et TGF-β (Stout and Suttles 1997).
- Les fonctions effectrices : Les macrophages agissent comme déclencheurs d'une réponse inflammatoire ou anti-inflamatoire en produisant des molécules qui vont interagir avec d'autres cellules du système immunitaire, par exemple les cellules T. Cependant les macrophages eux-mêmes sont capables d'avoir une réponse effectrice. Dans ce contexte, ils produisent des métalloprotéinases, les derivés réactifs de l'oxygène, l'oxyde nitrique (NO) et peuvent phagocyter (Stout and Suttles 1997). Toutes ces caractéristiques permettront aux macrophages de détruire les pathogènes avec lesquels ils rentrent en contact.

2. PROTÉINES DOK

La protéine Dok-1 (Downstream of tyrosine Kinase 1) a originellement été identifiée comme une protéine de 62kDa phosphorylée sur des résidus tyrosine chez des cellules transformées avec des oncoprotéines avec une activité PTK (Protein tyrosine kinase) plus grande que celle que l'on retrouve dans des cellules normales (Ellis, Moran et al. 1990). Cette protéine phosphorylée peut être également détectée dans des cellules normales stimulées via le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), lequel mène aussi à une activité PTK (Ellis, Moran et al. 1990). D'autres études postérieures ont montré que Dok-1 se phosphoryle rapidement lorsqu'une activité PTK est présente. Après phosphorylation, Dok-1 est associée avec p120 rasGAP (Ellis, Moran et al. 1990; DeClue, Vass et al. 1993), par exemple, lors de différentes stimulations comme lors de l'activation du récepteur de cellules B (BCR) ou lors de l'activation via le récepteur du M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor). Nous reviendrons plus en détail sur les kinases qui phosphorylent Dok-1 dans les cellules hématopoïétiques.

Jusqu'à présent, sept membres de la famille des protéines Dok ont été décrites, nommées Dok-1, Dok-2 (Dok-R, FRIP), Dok-3 (DokL), Dok-4 (IRS5), Dok-5 (IRS6), Dok-6 et Dok-7. Tel qu'illustré dans la figure 2, la comparaison de séquences de ces protéines chez la souris a permis de diviser cette famille en trois groupes phylogénétiques différents.

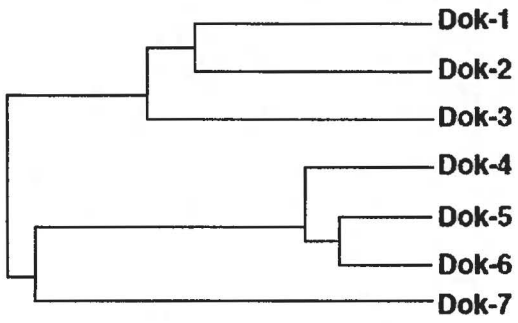


Figure 2. Arbre phylogénétique des protéines Dok murines. L'arbre a été établi à partir des séquences complètes des protéines (Mashima, Hishida et al. 2009).

L'expression des protéines Dok est assez variée. Nous pouvons diviser les protéines Dok en deux groupes selon leur expression. Les protéines Dok qui ont une expression plutôt dans les cellules hématopoïétiques, comme Dok-1, Dok-2 et Dok-3, et les protéines Dok qui ont une expression dans les cellules non hématopoïétiques comme Dok-4, Dok-5, Dok-6 et Dok-7.

Comme décrit précédemment, les protéines Dok-1, Dok-2 et Dok-3 sont exprimées de préférence dans les cellules hématopoïétiques, mais l'expression de chacune des protéines n'est pas similaire (Tableau 1). Dok-1 est exprimée dans les cellules B, T et dans les cellules de la lignée myéloïde tels que les macrophages et neutrophiles. De plus, nous pouvons retrouver l'expression d'ARNm de Dok-1 chez les thymocytes doubles négatifs ($CD4^-$ $CD8^-$) et les cellules pro-B ($B220^+CD43^+IgM^-$) (Yasuda, Shirakata et al. 2004; Yasuda, Bundo et al. 2007). De la même façon, Dok-2 est exprimée chez les cellules T et chez les cellules de la lignée myéloïde, mas elle n'est cependant pas exprimée chez les cellules B (Yasuda, Shirakata et al. 2004; Yasuda, Bundo et al. 2007) . Par contre, Dok-3 est exprimée chez les cellules B et la lignée myéloïde, mais pas chez les cellules T (Lemay, Davidson et al. 2000; Yasuda, Bundo et al. 2007).

Protéine	Cellule T	Cellule B	Lignée myéloïde
Dok-1	+	+	+
Dok-2	+	-	+
Dok-3	-	+	+

Tableau 1. Expression des protéines Dok-1, Dok-2 et Dok-3 dans les cellules hématopoïétiques.

L'expression de ces protéines, normalement exprimées dans les cellules immunitaires, a aussi été décrite dans des cellules non hématopoïétiques. Ceci démontre que ces protéines n'ont pas exclusivement des fonctions immunitaires (Carpino, Wisniewski et al. 1997; Yamanashi and Baltimore 1997; Smith, Wang et al. 2004; Hosooka, Noguchi et al. 2008). Par exemple, l'expression de Dok-1, Dok-2 et Dok-3 a démontré qu'elles jouent un rôle dans la suppression de tumeurs dans les poumons (Berger, Niki et al. 2010). L'induction de l'expression de Dok-1 a été décrite chez des souris nourries avec une diète enrichie en gras. Chez ces souris Dok-1 induit une hypertrophie des adipocytes (Hosooka, Noguchi et al. 2008).

L'expression de ces protéines est régulée par différentes voies de signalisation. Par exemple, il a été montré dans des mastocytes RBL-2H3, que Dok-1 est régulée à la hausse en réponse au dexaméthasone (Hiragun, Peng et al. 2005). Chez les cellules de la leucémie myéloïde NFS-60, l'expression de Dok-2 est augmentée après l'activation avec des cytokines telles que M-CSF, GM-CSF (granulocyte–macrophage colony-stimulating factor) et IL-3 (interleukine 3) (Suzu, Tanaka-Douzono et al. 2000). Par contre, l'expression de Dok-1 dans les BMM est régulée à la baisse en réponse au LPS (lipopolysaccharide) (Shinohara, Inoue et al. 2005).

Les protéines Dok-4, Dok-5, Dok-6 et Dok-7 tel que décrit auparavant sont exprimées dans des cellules non hématopoïétiques. La protéine Dok-5 se trouve

dans les cellules neuronales ainsi que dans le cœur. Dok-6 se trouve surtout dans les cellules neuronales. La protéine Dok-4 se retrouve dans le cerveau, le cœur, le muscle squelettique, les reins et les poumons (Grimm, Sachs et al. 2001; Crowder, Enomoto et al. 2004; Wen, Xia et al. 2009).

Même si l'expression de ces protéines est plus importante dans les cellules non hématopoïétiques, grâce à des techniques de RT-PCR (réaction en chaîne de la polymérase avec une retrotranscriptase), il a été possible de montrer l'expression de Dok-4 et Dok-5 dans des cellules T humaines (Favre, Gerard et al. 2003).

Le plus récent membre décrit de la famille des protéines Dok est Dok-7. Ce membre est exprimé dans les cellules du cœur et les muscles squelettiques (Okada, Inoue et al. 2006). L'analyse immunohistologique des muscles squelettiques a montré que Dok-7 se trouve uniquement dans la région postsynaptique des synapses neuromusculaires (Okada, Inoue et al. 2006).

2.1. Structure

Les protéines Dok, bien qu'elles ont été décrites chez différentes espèces de vertébrés comme l'humain, le chimpanzé, la souris, le rat, le chien, le poulet et le poisson zèbre (DeClue, Vass et al. 1993; Di Cristofano, Niki et al. 2001; Abramson, Rozenblum et al. 2003; Wotton, Weierud et al. 2008), conservent de façon assez stable leur séquence et leurs domaines à traves les différentes espèces (Figure 3).

De la même façon, tous les membres de la famille de protéines Dok possèdent une structure assez conservée (Figure 4). On peut remarquer un domaine PH (Plecktrin homology) et un domaine PTB (Phosphotyrosine binding) dans la partie amino-terminale. Elles montrent aussi dans la partie carboxy-terminale, une séquence riche en résidus tyrosine qui une fois phosphorylés peuvent être la cible des domaines SH2 d'autres protéines (Figure 4).

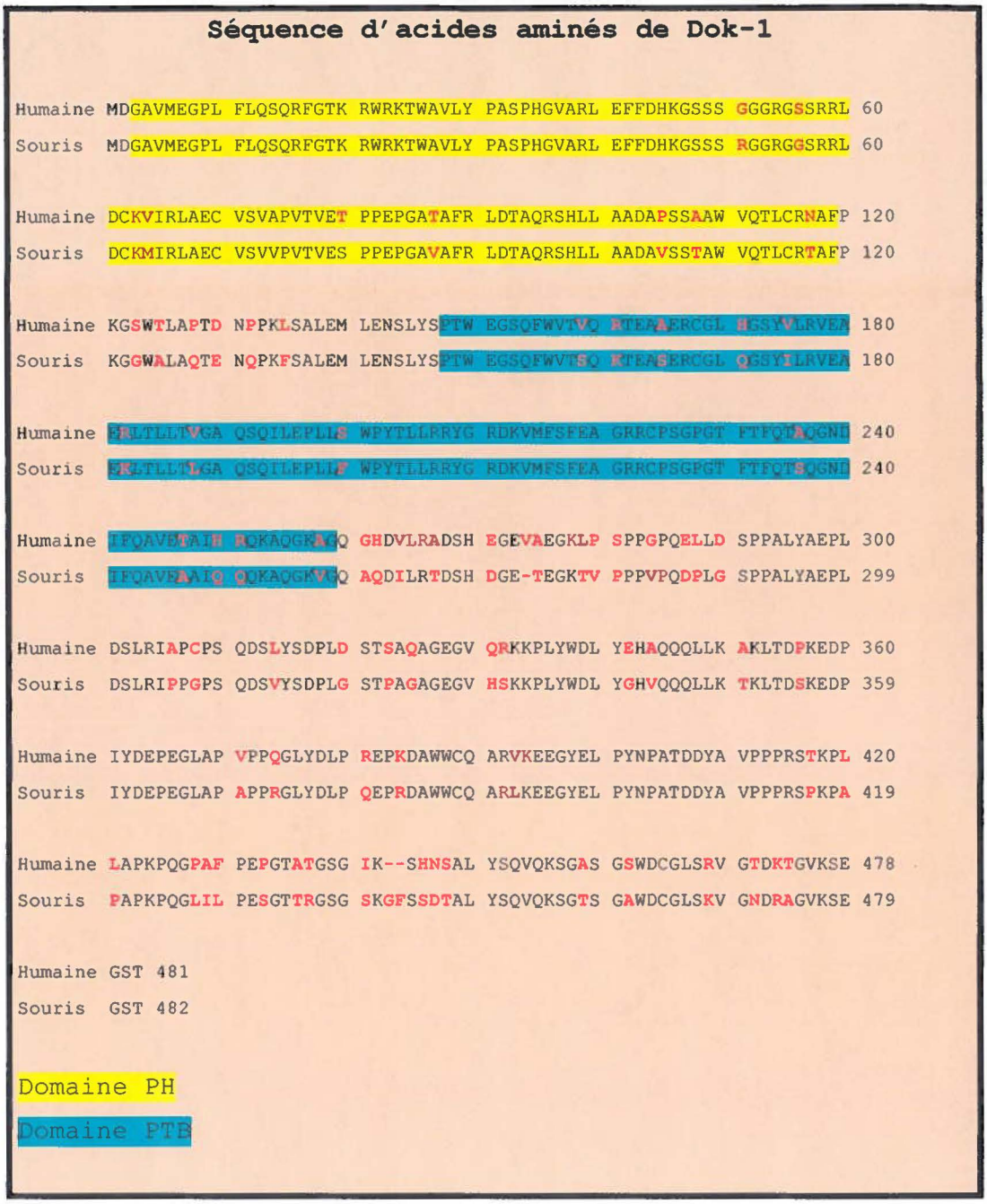


Figure 3. Comparaison de la séquence d'acides aminés de Dok-1 chez l'humain et chez la souris. Les différences dans la séquence sont marquées en rouge.

Les domaines PH sont des domaines avec une grandeur approximative de 120 acides aminés. Ces domaines confèrent aux protéines qui les possèdent la

capacité d'interagir avec des structures lipidiques, par exemple les membranes cellulaires (Rebecchi and Scarlata 1998; Lemmon and Ferguson 2000). Les domaines PTB sont des domaines de petite taille capables de reconnaître et d'interagir avec des tyrosines phosphorylées présentes dans des séquences NPXY chez d'autres protéines (Forman-Kay and Pawson 1999; Uhlik, Temple et al. 2005). Finalement, la famille des protéines Dok présente dans sa portion carboxy-terminale des tyrosines susceptibles d'être phosphorylées. Ces tyrosines phosphorylées peuvent ensuite être reconnues par des motifs SH2, par exemple les motifs YXXP qui sont reconnus par les domaines SH2 de la protéine p120 rasGAP (Campbell, Khosravi-Far et al. 1998).

Par l'intermédiaire de ces domaines, les protéines Dok sont capables d'interagir avec d'autres protéines et représentent donc un prototype de protéine adaptatrice. En effet, puisque ces protéines ne présentent pas de domaines catalytiques, leur activité biologique est plutôt due aux protéines capables d'interagir avec elles (Shinohara, Yasuda et al. 2004).

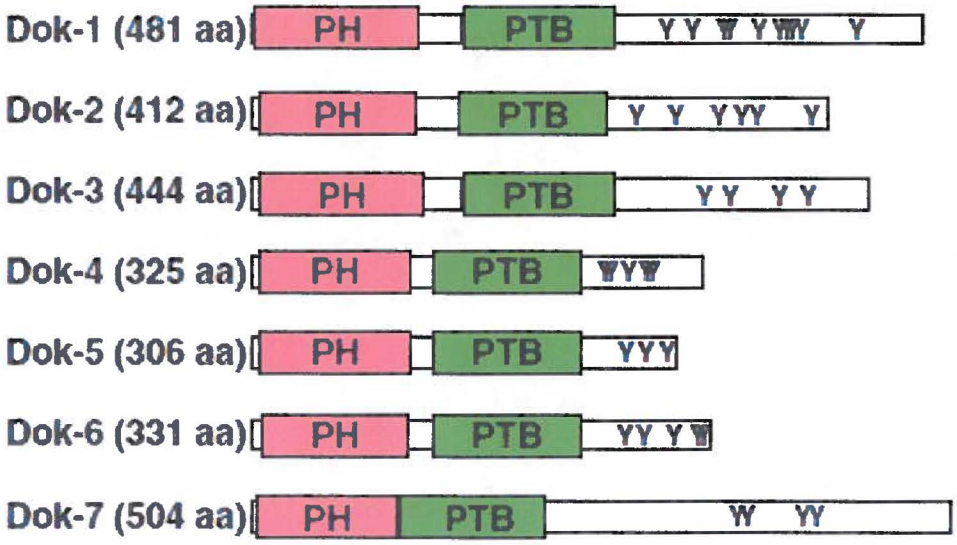


Figure 4. Représentation schématique de la famille des protéines Dok chez la souris. Les Y représentent des résidus tyrosines présents dans la région carboxy-terminale de la protéine (Mashima, Hishida et al. 2009).

Comme décrit auparavant, les analyses phylogénétiques des protéines Dok ont montré 3 groupes différents : Dok-1/2/3, Dok-4/5/6 et Dok-7 (Figure 2). Les membres de chacun des deux premiers groupes présentent des patrons d'expression similaires, d'où l'existence d'une certaine redondance dans les fonctions. Par exemple, les souris déficientes pour les protéines Dok-1 et Dok-2 présentent une maladie myeloproliferative que les souris déficientes pour Dok-1 ou Dok-2 ne développent pas (Niki, Di Cristofano et al. 2004).

2.1.1. Motifs ciblés par les domaines SH2

Un nombre important de molécules interagissent avec les protéines Dok via des domaines SH2 (Tableau 2), entre autres, Abl (van Dijk, van Den Akker et al. 2000; Master, Tran et al. 2003), Csk (Lemay, Davidson et al. 2000; van Dijk, van Den Akker et al. 2000; Robson, Davidson et al. 2004; Van Slyke, Coll et al. 2005; Honma, Higuchi et al. 2006; Zhao, Janas et al. 2006) ou SHIP-1 (Dunant, Wisniewski et al. 2000; van Dijk, van Den Akker et al. 2000; Latour, Gish et al. 2001; Ott, Tamir et al. 2002; Abramson, Rozenblum et al. 2003). Toutefois, l'interaction la plus étudiée jusqu'à présent est l'interaction de Dok-1 et Dok-2 avec p120 rasGAP, un inhibiteur de Ras (Campbell, Khosravi-Far et al. 1998).

Dans la voie de signalisation Ras-ERK, la protéine Ras peut se trouver sous deux formes : GDP-Ras qui est inactive ou GTP-Ras qui est active. Dans les cellules non activées, Ras va être liée au GDP. Lors de l'activation de certaines voies de signalisation Ras-GDP va être convertie en Ras-GTP par un facteur d'échange de nucléotides guanines (GEF), comme SOS ou ras-GRP. Cette réaction est réversible grâce aux protéines activatrices de l'activité intrinsèque GTPase de Ras (rasGAP) comme p120 rasGAP.

Dok-1 et Dok-2 sont capables, grâce à leurs motifs YXXP situés dans la partie carboxy-terminale, d'interagir avec rasGAP. Les tyrosines phosphorylées 295 et 361 dans le cas de Dok-1 murin (Songyang, Yamanashi et al. 2001) et les tyrosines phosphorylées 276 et 304 dans le cas de Dok-2 murin (Di Cristofano,

Carpino et al. 1998) de ces motifs vont être reconnues par les motifs SH2 de p120 rasGAP. Ainsi, Dok-1 et Dok-2 sont capables de recruter rasGAP à proximité de Ras. Cette interaction inhibe Ras et par la même, la voie de la MAPK ERK1/2 (Campbell, Khosravi-Far et al. 1998).

Bien que l'interaction des protéines Dok-1 et Dok-2 avec rasGAP soit la plus documentée, plusieurs autres interactions sont très importantes pour comprendre tous les rôles joués par cette famille de protéines. Par exemple, lors que Dok-1 n'est pas capable d'interagir avec p120 rasGAP, elle est toujours capable d'inhiber la voie de signalisation du TCR (Yasuda, Bundo et al. 2007) et l'activation d'ERK dans la voie de signalisation du récepteur PDGF (Zhao, Janas et al. 2006). Ces inhibitions indépendantes de p120 ras GAP ont été montrées grâce à deux mutants, un mutant de Dok-1 qui n'est pas capable de lier p120 rasGAP (Zhao, Janas et al. 2006) et un autre mutant dans lequel toute la partie COOH terminal est délétée (Yasuda, Bundo et al. 2007). Une des protéines qui aussi interagit avec Dok-1 est Nck, grâce à cette interaction Dok-1 est capable de réguler la migration cellulaire (Noguchi, Matozaki et al. 1999; Woodring, Meisenhelder et al. 2004). Un autre rôle des protéines Dok qui n'est pas relié à son interaction avec p120 rasGAP est le rôle de Dok-1 comme régulateur positif de la voie de signalisation de l'IL-4 chez les lymphocytes T et B (Inoue, Yasuda et al. 2007).

Dans le cas de Dok-3, les fonctions dérivées des interactions avec les motifs SH2 diffèrent de celles de Dok-1 et Dok-2. Par exemple, il a été décrit, lors de l'activation du BCR chez les lymphocytes B, que Dok-3 possède un rôle de régulation négative. Cette régulation ne module pas l'activité d'ERK, mais plutôt l'activation de JNK et la prolifération cellulaire ce qui suggère un rôle différent de celui de Dok-1 (Lemay, Davidson et al. 2000; Robson, Davidson et al. 2004; Ng, Xu et al. 2007). De plus, la surexpression de Dok-3 chez des cellules non hématopoïétiques inhibe la phosphorylation d'ERK. Les études qui ciblent cette régulation ont montré l'importance de l'interaction de Dok-3 avec Grb-2. Cette interaction empêche l'activation de Ras et elle inhibe la mobilisation de Ca^{2+} (Cong, Yuan et al. 1999; Honma, Higuchi et al. 2006; Stork, Neumann et al. 2007).

Protéine Dok	Protéines avec domaine SH2		
Dok-1	Abl	Hck	SHIP-1
	Cas	Lyn	SH2D1A
	Crk	Nck	Src
	CrkL	PI3K p85	Tec
	Csk	PLCc1	Vav
	Fgr	p120 RasGAP	Yes
Dok-2	Abl	CrkL	Nck
	Cas	Csk	p120 RasGAP
	Crk	Lyn	SHIP-1
Dok-3	Csk	Grb2	SHIP-1

Tableau 2. Protéines qui interagissent avec des tyrosines phosphorylées des protéines Dok via des domaines SH2 (Modifié de (Mashima, Hishida et al. 2009)

Tel qu'expliqué, les interactions des protéines Dok avec les motifs SH2 d'autres protéines peuvent réguler plusieurs voies de signalisation de façon très différente. Par contre, les interactions avec des protéines qui possèdent des motifs SH2, (Tableau 2) ne sont pas les seules à avoir lieu. Les séquences PxxP des protéines Dok peuvent être reconnues par des motifs SH3 d'autres protéines, on peut voir ce type de liaison par exemple dans l'interaction de c-Abl et Dok-2 (Cong, Yuan et al. 1999; Master, Tran et al. 2003).

2.1.2. Domaine PTB

Le domaine PTB est un domaine capable de reconnaître des tyrosines phosphorylées avec une séquence et une structure 3D très spécifiques. La structure tridimensionnelle de ce domaine est très importante pour lui conférer ses propriétés et sa capacité d'interaction. Plusieurs protéines structurelles et adaptatrices présentent des domaines PTB qui leur permettront de former des complexes (Forman-Kay and Pawson 1999; Uhlik, Temple et al. 2005). Plusieurs

protéines peuvent interagir avec le domaine PTB des protéines Dok (Tableau 3), entre autres Abl (Cong, Yuan et al. 1999), CD3ε (Yasuda, Bundo et al. 2007), SHIP-1 (Dunant, Wisniewski et al. 2000; Lemay, Davidson et al. 2000; Latour, Gish et al. 2001; Sattler, Verma et al. 2001; Robson, Davidson et al. 2004; Dong, Corre et al. 2006; Stork, Neumann et al. 2007).

Protéine Dok	Protéines qui interagissent avec le domaine PTB		
Dok-1	Abl	Dok-2	Ret
	CD3ε	EGF receptor	SHIP-1
	Dok-1	Integrin β chain	TCRζ
Dok-2	CD3ε	EGF receptor	TCRζ
	Dok-1	IL-4 receptor α chain	Tie2
	Dok-2	SHIP-1	
Dok-3	Abl	Dok-3	SHIP-1

Tableau 3. Protéines qui interagissent avec le domaine PTB des protéines Dok (Modifié de (Mashima, Hishida et al. 2009)

Des études de cristallographie ont été faites sur le domaine PTB de Dok-1. Elles ont démontré une structure en sandwich bêta avec 7 feuillets bêta antiparallèles et une hélice alpha à l'extrémité C-terminale (Shi, Ye et al. 2004).

Dans le domaine PTB de Dok-1, le site actif est une poche en forme de L formée par un des feuillets bêta (b5) et l'hélice alpha terminale (Shi, Ye et al. 2004). Comme décrit auparavant, la structure spatiale du phosphopeptide reconnu par un domaine PTB est très importante. Normalement, la phosphotyrosine doit montrer une boucle d'inversion qui fournit un point d'ancrage pour la poche du domaine PTB. Cette phosphotyrosine est précédée par une séquence de 3 acides aminés dont une asparagine et une proline pour former la séquence NPXpY (Uhlik, Temple et al. 2005; Smith, Hardy et al. 2006). Par contre, même si le domaine PTB de Dok-1 est capable de lier des peptides avec la séquence NPXpY(Dunant, Wisniewski et al. 2000; Latour, Gish et al. 2001; Sattler, Verma et al. 2001; Zhang, Yan et al. 2004; Yasuda, Bundo et al. 2007), des travaux *in*

vitro ont défini la séquence consensus d'attachement comme étant NXLpY (Songyang, Yamanashi et al. 2001).

Les protéines Dok-1 et Dok-2 peuvent aussi, une fois phosphorylées, former des homo-oligomères ou des hétéro-oligomères grâce à leur domaine PTB. Cette capacité d'oligomérisation est fondamentale pour que les protéines Dok puissent réaliser leurs fonctions (Songyang, Yamanashi et al. 2001; Boulay, Nemorin et al. 2005). Dok-3 peut aussi former des homo-oligomères, mais la signification de cette propriété par rapport à sa fonction n'a pas encore été élucidée (Stork, Neumann et al. 2007).

2.1.3. Domaine PH

Plusieurs protéines qui interagissent avec la famille des protéines Dok se retrouvent associées aux membranes cellulaires. Il est donc nécessaire que les protéines Dok soient capables d'interagir avec les membranes cellulaires afin d'être efficaces dans leurs fonctions.

Les domaines PH sont des domaines qui permettent aux protéines qui les possèdent d'interagir avec les phospholipides des membranes cellulaires. Cela permet aux protéines porteuses de présenter une distribution membranaire, de façon ponctuelle ou permanente (Rebecchi and Scarlata 1998; Lemmon and Ferguson 2000).

Le domaine PH est aussi un domaine essentiel pour que les protéines Dok puissent être activées par les protéines tyrosines kinases qui se retrouvent dans la région membranaire. La perte de ce domaine entraîne alors une perte de la localisation membranaire et de l'activation qui s'en suit (Noguchi, Matozaki et al. 1999; Stork, Neumann et al. 2007).

Le domaine PH de Dok-1 est capable d'interagir avec plusieurs molécules retrouvées dans les membranes cellulaires comme le PI(3,4)P2, PI(4,5)P2, et le PI(3,4,5)P3 (Zhao, Schmitz et al. 2001). Ce sont des phosphoinositides phosphorylés qui présentent des interactions avec beaucoup de domaines PH. La génération de ces phosphoinositides est dépendante de plusieurs kinases et

phosphatases, dont les PI3K, SHIP ou PTEN (Lemmon 2008). Lorsqu'on perd l'activité de ces molécules, la production des phosphoinositides est affectée et par conséquent, l'activité des protéines Dok aussi. Un exemple de l'importance de la fonction du domaine PH et la présence de ces phosphoinositides est la perte de l'activité régulatrice de Dok-1 sur ERK lors de l'activation du récepteur PDGF quand le domaine PH de Dok-1 ou l'activité PI3K sont compromises (Zhao, Schmitz et al. 2001).

De la même façon, il a été décrit que le PI(5)P peut interagir avec le domaine PH de Dok-1 et Dok-2 et réguler la phosphorylation des molécules adaptatrices chez les cellules T (Guittard, Gerard et al. 2009).

Toute cette information nous montre que l'activation des protéines Dok n'est pas seulement dépendante des PTK, mais aussi de sa distribution, laquelle est régulée par les kinases et phosphatases des phosphoinositides membranaires.

2.2. Fonctions des protéines Dok

Les fonctions des protéines Dok ne sont pas homogènes parmi tous les membres de cette famille. Les membres les plus proches de la famille ont des fonctions plus semblables. Si nous étudions la famille par rapport à l'homologie des membres (Figure 2), trois groupes peuvent être définis: Dok-1/2/3, Dok-4/5/6 et Dok-7. Les membres de chacun des groupes ne partagent pas seulement une distribution spécifique mais aussi des fonctions semblables.

De cette manière, Dok-1/2/3 possèdent des fonctions adaptatrices de régulation négative de certaines voies de signalisation chez les cellules hématopoïétiques. Par contre, Dok-4/5/6 agissent comme activateurs dans certaines voies de signalisation chez les cellules neuronales (Grimm, Sachs et al. 2001; Crowder, Enomoto et al. 2004; Shi, Yue et al. 2006; Uchida, Enomoto et al. 2006). De plus, elles peuvent avoir d'autres fonctions par exemple, Dok-4 est aussi un régulateur négatif chez les cellules T (Gerard, Ghiotto et al. 2009) et Dok-5 a un rôle dans la différenciation des cardiomyocytes (Wen, Xia et al. 2009). Dans le cas de Dok-7, il a été décrit qu'elle joue un rôle activateur des voies de signalisation dans les

cellules des muscles squelettiques. En effet, la phosphorylation de MuSK, un récepteur tyrosine kinase exprimé dans le muscle, va recruter et activer Dok-7 pendant la formation des synapses neuromusculaires (Hallock, Xu et al. 2010). Le mécanisme moléculaire par lequel Dok-7 régule ces voies de signalisation est différent de celui de Dok-4/5/6 (Okada, Inoue et al. 2006; Inoue, Setoguchi et al. 2009; Muller, Jepson et al. 2010).

2.2.1. Fonctions des protéines Dok dans le système immunitaire

Comme décrit auparavant, Dok-1/2/3 sont les protéines exprimées dans les cellules hématopoïétiques et donc dans le système immunitaire. Dans ces cellules, les protéines Dok agissent comme des protéines adaptatrices dans plusieurs voies de signalisation initiées par un grand nombre de récepteurs. La stimulation via ces récepteurs, induit la phosphorylation des protéines Dok sur des résidus tyrosine. La participation des protéines Dok suite à l'engagement de ces récepteurs est mise plus clairement en évidence dans des cellules déficientes dans l'expression des protéines Dok. (Tableaux 4 et 5)

Comme il sera décrit dans ce chapitre les fonctions des protéines Dok sont très variées. Ces fonctions varient d'un membre à un autre de la famille des protéines Dok, par contre, ces fonctions peuvent dans certains cas être redondantes comme c'est le cas de Dok-1 et Dok-2 dans l'activation des macrophages via le TLR4 (Shinohara, Inoue et al. 2005).

Protéine Dok	Récepteur		
Dok-1	BCR CD2 Récepteur CD200 CD28 CD84	CXCR4 FcεRI FcγRIIB Récepteur M-CSF MAFA	PD-1 Récepteur SCF SLAM TCR TLR4
Dok-2	CD2 Récepteur CD200 FcεRI	Récepteur IL-4 Récepteur M-CSF SLAM	TCR TLR4
Dok-3	BCR	FcγRI	

Tableau 4. Récepteurs impliqués dans la phosphorylation des protéines Dok (Modifié de (Mashima, Hishida et al. 2009)

Protéine Dok	Recepteurs		
Dok-1 -/-	BCR CXCR4 FcεRI	IL-3 IL-4 M-CSF	SCF TCR TLR4
Dok-2 -/-	IL-3 M-CSF	SCF TCR	TLR4
Dok-3-/-	BCR		
Dok-1-/- Dok2-/-	GM-CSF IL-3	M-CSF SCF	TCR TLR-4

Tableau 5. Voies de signalisation affectées par l'absence des protéines Dok. Récepteurs qui déclenchent l'activation des voies de signalisation affectées par la carence des protéines Dok (Modifié de (Mashima, Hishida et al. 2009).

2.2.1.1. Proteines Dok dans les lymphocytes B

La première des fonctions découvertes des protéines Dok, a été le rôle de Dok-1 dans les voies de signalisation du BCR (Yamanashi, Tamura et al. 2000). Chez les cellules B de la rate de souris déficientes pour la protéine Dok-1, lors de l'activation du BCR, une augmentation de la phosphorylation d'ERK est observée (Yamanashi, Tamura et al. 2000). En effet, lorsque le BCR et le FcγRIIB sont stimulés en même temps, Dok-1 est phosphoryleé, et cette phosphorylation est dépendante de SHIP. Une fois phosphorylée Dok-1 peut lier p120 rasGAP permettant ainsi l'inhibition de la voie de signalisation d'ERK (Tamir, Stolpa et al. 2000). Par contre, lors de l'activation seule du BCR, Dok-1 est phosphorylée et se lie au p120 rasGAP par un processus dépendant de la protéine tyrosine kinase Lyn mais indépendant de SHIP-1 (Tamir, Stolpa et al. 2000; Yamanashi, Tamura et al. 2000). Par contre, Dok-1 n'est pas la seule protéine Dok à avoir un rôle de régulation négative de la réponse des cellules B lors de l'activation du BCR. En effet, Dok-3 a aussi un rôle de régulation négative dans cette voie, ce qui montre une redondance des fonctions de la famille des protéines Dok (Ng, Xu et al. 2007).

Toutefois, les fonctions des protéines Dok ne sont pas toujours redondantes et l'absence de Dok-1 ou de Dok-3 produit souvent des effets différents. Par exemple, lorsque les cellules sont dépourvues de Dok-3, la réponse aux antigènes T-indépendants est augmentée (Ng, Xu et al. 2007). De la même façon, lors de la stimulation du BCR chez des souris déficientes pour la protéine Dok-3, la prolifération des cellules B et l'influx du Ca^{2+} sont augmentés (Ng, Xu et al. 2007). Ces effets ne se produisent pas lors de la perte de Dok-1 (Yamanashi, Tamura et al. 2000). Les différentes fonctions de Dok-1 et Dok-3 peuvent s'expliquer par les différences dans le mode d'action de Dok-1 et Dok-3. Par exemple, Dok-1 est capable de lier p120 rasGAP mais pas Dok-3. Au contraire, Dok-3 mais pas Dok-1 est capable d'interagir avec Grb2 pour réguler l'influx du Ca^{2+} chez les cellules B (Stork, Neumann et al. 2007; Neumann, Oellerich et al. 2011).

Par contre, l'interaction de Dok-1 et Dok-3 avec la même molécule peut aussi produire des effets différents. Par exemple, Dok-1 peut se lier à SHIP-1 pour inhiber l'activation d'ERK (Tamir, Stolpa et al. 2000), alors que la liaison de Dok-3 à SHIP-1 va inhiber l'activation de JNK (Robson, Davidson et al. 2004).

2.2.1.2. Proteines Dok dans les lymphocytes T

Chez les cellules T, Dok-1 et Dok-2 sont exprimées, mais pas Dok-3. Les protéines Dok sont rapidement phosphorylées lors de l'activation du TCR. Chez les souris déficientes pour les protéines Dok-1 et Dok-2, une augmentation de la production d'IgG en réponse aux antigènes T-dépendent a été décrite (Yasuda, Bundo et al. 2007). De plus, les cellules T CD4+ des souris déficientes pour les protéines Dok-1 ou Dok-2 présentent une prolifération et une production d'IL-2 augmentées lors de l'activation du TCR *in vitro*. Cet effet est cumulatif dans les cellules dépourvues de Dok-1 et Dok-2 (Yasuda, Bundo et al. 2007). Des résultats similaires ont été obtenus *in vitro* avec des cellules où l'expression des ARNm des protéines Dok-1 et Dok-2 a été bloquée par la méthode du siRNA (Dong, Corre et al. 2006).

Chez les cellules T, l'activation du complexe du TCR, composé par les chaînes alpha/bêta, la chaîne ζ et le CD3, mène à la phosphorylation de Fyn et Lck. Ces protéines vont phosphoryler les ITAMs du complexe TCR (Figure 5) qui à leur tour vont recruter et phosphoryler la protéine ZAP-70. La protéine ZAP-70 va déclencher la phosphorylation de LAT qui est très importante pour la poursuite de l'activation de la voie de signalisation du TCR (Zhang, Sommers et al. 1999; Smith-Garvin, Koretzky et al. 2009). Les cellules T CD4+ déficientes pour les protéines Dok-1 et Dok-2 présentent une suractivation de la voie du TCR. En effet, elles montrent une plus grande phosphorylation de ZAP-70, LAT et ERK, ce qui montre que les protéines Dok peuvent inhiber la phosphorylation de ZAP-70 lors de l'activation du TCR (Yasuda, Bundo et al. 2007). Cette inhibition a aussi été montrée par la technique du siRNA (Dong, Corre et al. 2006).

Les mécanismes moléculaires qui permettent cette inhibition ne sont pas encore clairs. Elle peut être due à une compétition de Dok-1 et Dok-2 avec ZAP-70 pour les sites d'attachement des ITAMs du TCRζ et CD3. Le site d'attachement des ITAMs serait reconnu par le PTB des protéines Dok et le domaine PH des protéines Dok localiserait ces protéines proche de la membrane, là où le TCR se trouve. En accord avec ce modèle le domaine PTB et PH mais pas la partie carboxy-terminale est essentiel pour l'inhibition par les proteines Dok de ZAP-70 (Yasuda, Shirakata et al. 2004).

D'autres voies de signalisation sont aussi régulées par les protéines Dok, par exemple la voie de signalisation du CD2 ou CD28 (Nemorin and Duplay 2000; Michel, Attal-Bonnefoy et al. 2001; Nemorin, Laporte et al. 2001; Boulay, Nemorin et al. 2005). Lors de l'activation du CD2 chez les cellules T, Dok-1 et Dok-2 inhibent l'activation d'ERK et NFAT. Pour cette inhibition, l'oligomérisation de Dok-1 et Dok-2 est très importante (Boulay, Nemorin et al. 2005). Aussi, lors de la stimulation via le récepteur SLAM, Dok-1 et Dok-2 sont phosphorylées sur des résidus tyrosine, mais les rôles de cette voie de signalisation ne sont pas encore bien définis (Latour, Gish et al. 2001; Latour, Roncagalli et al. 2003).

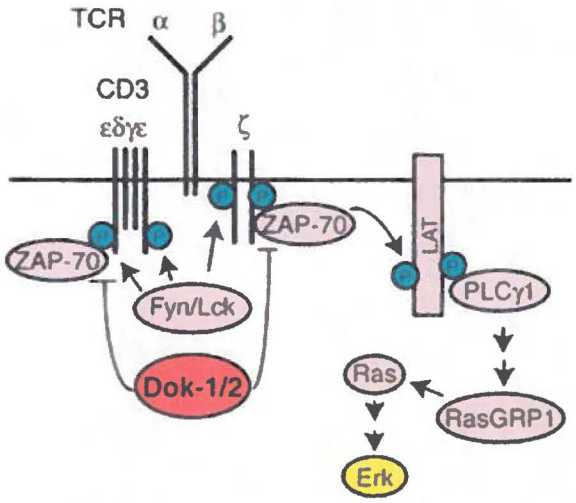


Figure 5. Modèle de la voie de signalisation du TCR. Dok-1 et Dok-2 compétitionnent avec ZAP-70 pour les ITAMs du récepteur (Mashima, Hishida et al. 2009).

2.2.2. Rôles dans le développement tymique

Dans le développement des cellules T, il a été montré que la surexpression de Dok-2 empêche le passage des cellules CD4-CD8- au stade CD4+CD8+ dans le thymus (Gugasyan, Quilici et al. 2002). Un rôle inhibiteur de Dok dans la maturation des cellules T est aussi démontré dans les souris déficientes en Dok-1 et Dok-2 dont la quantité de cellules CD4+CD8+ est augmentée par raport aux souris sauvages (Yasuda, Bundo et al. 2007).

2.2.2.1. Protéines Dok dans les cellules myéloïdes

Chez les cellules myéloïdes, Dok-1, Dok-2 et Dok-3 sont exprimées. Chez les souris déficientes pour les protéines Dok-1 et Dok-2, les cellules de la lignée myéloïde présentent des anomalies néoplasiques pendant l'hématopoïèse (Yasuda, Shirakata et al. 2004; Niu, Roy et al. 2006). Ces souris développent des maladies myéloprolifératives ressemblantes à la leucémie myélomonocytaire chronique et à la leucémie myéloïde chronique (Yasuda, Shirakata et al. 2004; Niu, Roy et al. 2006). Chez ces souris, il existe une hyperplasie des précurseurs

de la lignée myéloïde mais pas de la lignée lymphoïde autant dans la moelle que dans la rate. De la même façon, le nombre de neutrophiles et monocytes circulants est augmenté et ces souris développent des tumeurs d'origine myéloïde dans les tissus.

Les macrophages, comme les autres membres de la lignée myéloïde, expriment les protéines Dok-1/2/3. Plusieurs études ont été réalisées dans des macrophages déficients pour une ou plusieurs protéines Dok.

Des études réalisées sur des macrophages provenant de souris déficientes pour Dok-1 et Dok-2, ont montré une prolifération et une survie augmentées en réponse à plusieurs cytokines importantes pour l'hématopoïèse. Ces résultats indiquent un rôle de Dok-1 et Dok-2 comme régulateurs négatives dans les voies de signalisation des récepteurs de ces cytokines. Par exemple, lors de l'activation du récepteur M-CSF, l'activation d'ERK et Akt est augmentée chez les macrophages déficients pour Dok-1/2 en comparaison aux macrophages sauvages (Yasuda, Shirakata et al. 2004).

Dok-1, Dok-2 et Dok-3 régulent aussi les voies de signalisation d'autres récepteurs, par exemple le TLR4. Lors de l'activation du TLR4 par du LPS, les protéines Dok-1, Dok-2 et Dok-3 sont rapidement phosphorylées. L'activation d'ERK et la production de TNF et NO sont augmentées dans les cellules déficientes en Dok-1 et Dok-2 par rapport aux cellules sauvages (Shinohara, Inoue et al. 2005). Dans le sens inverse, la surexpression de Dok-1 et Dok-2 diminue l'activation d'ERK et la production de TNF (Shinohara, Inoue et al. 2005). De sa part, Dok-3 est capable de réguler de facon négative l'activation d'ERK et la production des cytokines telles que IL-10 ou IL-1β (Peng, O'Loughlin et al. 2012). Même si les mécanismes moléculaires ne sont pas clairs, il a été démontré que la phosphorylation sur les résidus tyrosine est essentielle pour que les protéines Dok puissent réguler la voie de signalisation du TLR4.

Il a été aussi montré chez les macrophages que Dok-1 est capable d'interagir avec la phosphatase SHP-1 (Berg, Siminovitch et al. 1999). SHP-1 est une phosphatase capable de réguler certaines voies de signalisation dans les cellules hématopoïétiques. Il a été prouvé que lors de l'activation du récepteur du CSF-1, Dok-1 interagit avec SHP-1 ce qui va permettre la déphosphorylation de Dok-1. Cette inactivation de Dok-1 corrèle avec l'augmentation de la survie chez les

macrophages sauvages comparés aux macrophages déficients pour SHP-1 qui montrent une hyperphosphorylation de Dok-1.

Les mastocytes sont des cellules que l'on trouve dans les tissus et qui sont importantes dans les réponses allergiques dépendantes des IgE. L'interaction entre les IgE et les FcεRI induit des réactions biochimiques semblables à celles qui se produisent dans les voies de signalisation du TCR ou BCR, par exemple l'activation de Lyn, le recrutement de Syk ou la phosphorylation de LAT (Gilfillan and Rivera 2009). Dans les mastocytes, Dok-1 et Dok-2 sont rapidement phosphorylés lors de l'activation des FcεRI et l'interaction de Dok-1 avec p120 rasGAP a été décrite (Abramson, Rozenblum et al. 2003). La surexpression de Dok-1 induit une inhibition d'ERK et de la production de TNF chez les mastocytes lors de l'activation des FcεRI (Abramson, Rozenblum et al. 2003). Il a été montré aussi que les mastocytes de souris déficientes en Dok-1 développent des réponses allergiques au traitement avec des IgE monomériques, ce que les mastocytes sauvages ne font pas. Cela confirme le rôle negatif de Dok-1 dans cette réponse (Kepley, Taghavi et al. 2004). De plus, l'importance de Dok-1 pour l'inhibition des FcεRI via les FcγRIIB a été montrée (Ott, Tamir et al. 2002; Kepley, Taghavi et al. 2004).

2.2.3. Protéines Dok et son rôle comme suppresseurs tumoraux

L'absence de certaines protéines Dok peut entraîner différentes maladies. Par exemple, Il a été démontré le rôle de Dok-1 comme suppreseur tumoral dans le cancer d'ovaire (Mercier, Bachvarova et al. 2011). Les souris déficientes pour les protéines Dok-1 et Dok-2 développent un maladie ressemblante du lupus rénal (Yasuda, Bundo et al. 2007), ainsi qu'une leucémie myéloproliferative (Carpino, Wisniewski et al. 1997; Niki, Di Cristofano et al. 2004). Dok-1, Dok-2 et Dok-3 agissent comme suppresseurs du cancer du poumon au même temps que la déficience en 1, 2 ou les trois protéines induit des tumeurs au poumon chez la souris (Berger, Niki et al. 2010). De plus, les souris déficientes pour les protéines

Dok-1, Dok-2 et Dok-3 développent un sarcome hystiocitique (Mashima, Honda et al. 2010).

Dans les maladies non tumorales avec un implication des protéines Dok, nous pouvons détecter la myasthénie développée dans des souris avec des mutations dans la protéine Dok-7 (Beeson, Higuchi et al. 2006).

3. LA PHAGOCYTOSE

Les cellules ont développé la propriété d'internaliser les substances ou les particules à l'intérieur de leur cytoplasme. Cette internalisation se fait grâce à des processus comme l'endocytose, la pinocytose ou la phagocytose. Contrairement à l'endocytose et à la pinocytose, la phagocytose est un mécanisme d'internalisation qui dépend de la polymérisation d'actine (Aderem and Underhill 1999).

La phagocytose a été décrite comme étant une fonction nutritionnelle chez différents organismes, comme l'amibe *Dictyostelium discoideum*, qui se nourrit de bactéries de cette façon. Ce sont les expériences de Metchnikoff, à la fin du XVII siècle, qui ont défini la fonction protectrice de la phagocytose (Tauber 2003).

La phagocytose peut se définir comme le processus dépendant d'actine par lequel une cellule internalise une grande particule (> 0.5 µm). Cette internalisation survient suite à l'interaction d'une particule avec un récepteur sur la surface cellulaire. Cette particule est internalisée à l'intérieur de la cellule dans un organelle membranaire appelé phagosome, dont il sera question plus loin. Ce phénomène se retrouve particulièrement chez les leucocytes des organismes supérieurs. La phagocytose, chez ces organismes, joue un rôle très important. Ces fonctions sont importantes entre autres dans la réponse immunitaire innée, dans la communication entre le système immunitaire inné et adaptatif, dans la mise en place des tissus pendant le développement et dans l'élimination des cellules mortes ou apoptotiques.

Dans ce mémoire, seulement les fonctions protectrices de la phagocytose seront décrites. Dans la phagocytose, l'ingestion d'un micro-organisme par un leucocyte permet d'abord l'isolation du micro-organisme à l'intérieur du phagosome. Par la suite, le phagosome, par un processus de maturation, devient un phagolysosome avec des propriétés microbicides qui permettent au macrophage de dégrader le micro-organisme. La suite du processus mène à la présentation antigénique des fragments protéiques du micro-organisme dégradé. Cette présentation antigénique se fait par le CMH de type I et de type II et elle déclenche l'activation du système immunitaire adaptatif (Larsson, Fonteneau et al. 2001).

Parmi les cellules qui peuvent phagocyter, nous pouvons différencier les phagocytes professionnels, qui sont des cellules avec une très grande capacité phagocytaire, comme les monocytes/macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques. Les autres cellules ont souvent une certaine capacité phagocytaire et il est possible de s'y référer en tant que phagocytes non professionnels. La différence primordiale entre un phagocyte professionnel et non professionnel est la présence d'un ensemble de récepteurs à la surface de la cellule qui va permettre d'augmenter la reconnaissance des particules et l'efficacité de l'internalisation (Aderem and Underhill 1999).

3.1. Formation du phagosome et internalisation

Comme décrit auparavant, les cellules ont développé différentes stratégies pour internaliser des particules à l'intérieur de leur cytoplasme soit la pinocytose, l'endocytose et la phagocytose.

La phagocytose est la forme d'internalisation utilisée par le système immunitaire dans la défense contre les micro-organismes. Une des caractéristiques qui la différencie des autres processus d'internalisation est la polymérisation d'actine et l'implication des récepteurs de surface.

La phagocytose est un processus très complexe. Cette complexité vient, en partie, de la variété des récepteurs qui sont capables de lier une particule pour déclencher leur internalisation, mais aussi du fait que la plupart des particules peuvent être reconnues par plusieurs récepteurs. Tous ces récepteurs vont aussi mener à l'activation des voies de signalisation très différentes. Une autre caractéristique des récepteurs est leur multifonctionnalité. Plusieurs récepteurs, impliqués dans l'internalisation des particules, ont aussi une fonction dans l'adhésion cellulaire comme c'est le cas du récepteur de complément 3 aussi nommé Mac-1. Pour certains récepteurs, l'implication dans l'adhésion facilite leur fonction dans la phagocytose, mais pour d'autres, cette double tâche peut mener à une compétition pour des protéines nécessaires aux deux processus comme la paxilline, taline, vinculine, α-actinine, protéine kinase Cα, MARCKS et MacMARCKS. Ceci a alors un effet inhibiteur sur l'un des deux processus

(Pommier, Inada et al. 1983; Wright, Craigmyle et al. 1983; Allen and Aderem 1995; Allen and Aderem 1996).

Le processus de la phagocytose commence par l'interaction des récepteurs à la surface de la cellule phagocytaire et la particule à l'extérieur de la cellule. Cette interaction déclenche la polymérisation d'actine dans le site de contact, qui forme une coupe phagocytaire et permet l'ingestion de la particule. La structure résultante est un phagosome entouré de filaments d'actine. Une fois internalisée, cette actine subira une dépolymérisation pour permettre la maturation du phagosome et son interaction avec le système d'endosomes et lysosomes de la cellule, pour devenir un phagolysosome. Ces organelles vont apporter des composantes membranaires ainsi que des enzymes dégradantes dont des protéases, lipases et nucléases qui feront du phagolysosome une organelle hautement microbicide. Finalement, la particule ou le micro-organisme phagocyté sera dégradé en fragments antigéniques qui seront utilisés pour la présentation antigénique aux lymphocytes T via le CMH I et II (Jutras and Desjardins 2005)

3.1.1. Récepteurs

Les cellules phagocytaires reconnaissent une variété très grande de micro-organismes différents grâce à leurs récepteurs. Ces récepteurs, aussi appelés PRRs (pattern-recognition receptors), ciblent souvent des motifs très conservés chez les micro-organismes. Ces motifs, qui ne sont pas présents chez les eucaryotes, sont connus comme PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) (Janeway 1992). La capacité cellulaire de reconnaître une grande diversité de micro-organismes avec un nombre limité de récepteurs est possible grâce à la stabilité évolutive et à la persistance de ces PAMPs. Parmi ces PAMPs nous retrouvons les mannanes de la paroi cellulaire des levures, le LPS de la paroi bactérienne, la flagelline des flagelles bactériennes, le LPG protozoaire, etc. Toutes ces variétés de motifs sont reconnues directement par des récepteurs ou par des opsonines (compléments et immunoglobulines) qui seront également reconnues par d'autres récepteurs. Parmi ces récepteurs, nous retrouvons les récepteurs de mannose (MR), les récepteurs scavenger, les récepteurs du complément et les récepteurs Fc (Ravetch 1997; Carroll 1998; Stahl and Ezekowitz 1998) (Figure 6).

3.1.1.1. Récepteurs Fc (FcRs)

Les récepteurs Fc reconnaissent la fraction Fc des immunoglobulines. Ces récepteurs peuvent être solubles ou membranaires. Il y a plusieurs sortes de récepteurs Fc qui lient chacun des isotypes d'immunoglobulines. De cette façon, les FcεR lient les IgE, les FcαR lient les IgA, les FcμR lient les IgM, les FcδR lient les IgD et les FcγR lient les IgG. Lors de la phagocytose, les récepteurs les plus étudiés sont les récepteurs Fcγ. Les récepteurs Fcγ se divisent en deux grands groupes, soit les récepteurs activateurs impliqués dans la phagocytose et les récepteurs inhibiteurs (Ravetch 1997; Carroll 1998; Ravetch and Clynes 1998). La différence la plus importante entre ces deux types de récepteurs est leur type de domaine intracellulaire. Chez les récepteurs activateurs, le domaine intracellulaire est connu comme ITAM et chez les inhibiteurs, comme ITIM. (Reth 1989) Ces ITAMs sont similaires à ceux trouvés dans les récepteurs des cellules B et T.

Les domaines ITAMs, lors de l'activation du récepteur Fc, sont phosphorylés par des kinases de la famille des Src (Fitzer-Attas, Lowry et al. 2000; Gresham, Dale et al. 2000). Les ITAMs activés servent de site d'ancrage et d'activation de Syk (Figure 7). Syk activée déclenche l'activation de plusieurs voies de signalisation, entre autres, celles qui mènent à la polymérisation d'actine et la phagocytose de la particule liée au récepteur Fc (Ghazizadeh, Bolen et al. 1994; Crowley, Costello et al. 1997; Kiefer, Brumell et al. 1998; Aderem and Underhill 1999). Les récepteurs Fcγ sont divisés en trois groupes : FcγRI, FcγRII et FcγRIII. Parmi ces FcγR, le FcγRI, le FcγRIIA, FcγRIIC et le FcγRIII sont considérés comme activateurs et le FcγRIIB, comme inhibiteur (Ravetch 1997). Une autre caractéristique importante des récepteurs Fcγ est l'affinité par leurs ligands. Le seul FcγR considéré comme ayant une haute affinité est le FcγRI. Les autres, soit le FcγRII et le FcγRIII sont des récepteurs de faible affinité (Bruhns, Iannascoli et al. 2009).

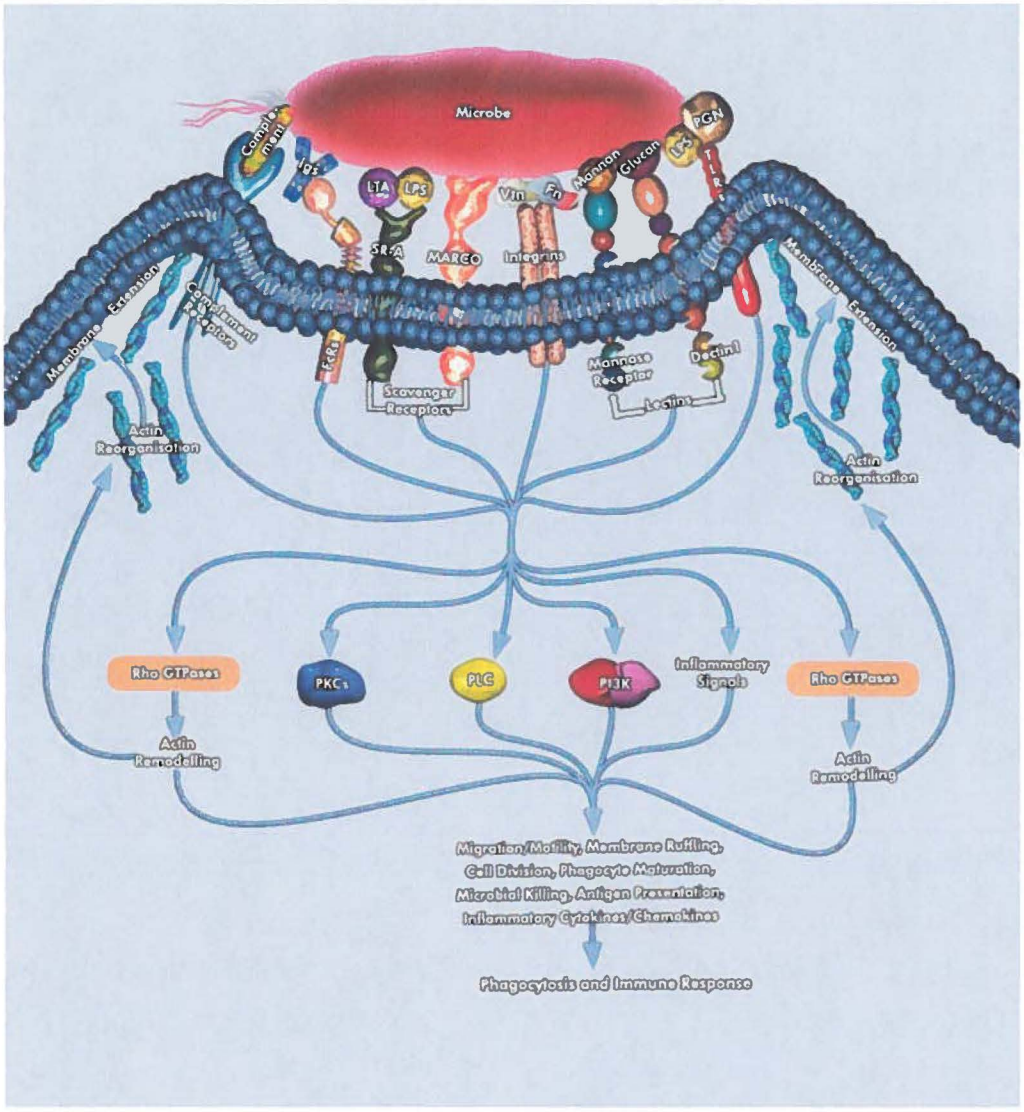


Figure 6. Voies de signalisation activées lors de la phagocytose.

Lors de l'activation des FcγR, une phosphorylation de Syk se produit. Cela déclenche l'activation de plusieurs voies de signalisation qui mènent, entre autres, à la phagocytose. Plusieurs molécules sont impliquées dans la transmission du signal et la réponse du phagocyte dont la PI3K, des GTPases et la PKC (Aderem and Underhill 1999; Marshall, Booth et al. 2001; Irschick, Haas et al. 2009).

La PI3K est une enzyme qui catalyse la phosphorylation du phosphatidylinositol (PI), PI(4)P, et PI(4,5)P . Cette enzyme est nécessaire pour la polymérisation de l'actine dans la coupe phagocytaire (Toker and Cantley 1997; Marshall, Booth et

al. 2001). De plus, la PI3K est aussi impliquée dans le processus de maturation du phagosome (Gillooly, Simonsen et al. 2001) et notamment dans la voie d'activation d'Akt .

Les GTPases les plus importantes dans la phagocytose sont celles de la famille Rho. Ces GTPases sont capables de réguler le cytosquelette d'actine de la cellule pendant la phagocytose, mais aussi dans d'autres situations. Par exemple, pendant l'étalement cellulaire Cdc42, Rac et Rho vont être impliquées dans la réorganisation de l'actine (Ridley and Hall 1992; Ridley, Paterson et al. 1992). Au niveau de la phagocytose via les récepteurs Fc, il a été montré que Rac1 et Cdc42 sont nécessaires pour l'internalisation des particules (Cox, Chang et al. 1997).

PKC ou Proteine kinase C, est une protéine très importante dans le remodelage du cytosquelette d'actine et ainsi dans la phagocytose (Zheleznyak and Brown 1992; Allen and Aderem 1995). Lors de l'activation des récepteurs Fc des macrophages, cette protéine est recrutée dans la coupe phagocytaire (Larsen, Ueyama et al. 2002). La présence de PKC au point de contact est cruciale pour que l'internalisation soit réussie.

3.1.1.2. Récepteurs du complément (CRs)

Le système du complément est composé de plusieurs protéines qui réagissent entre elles afin d'opsoniser les micro-organismes et de déclencher une réponse inflammatoire pour protéger l'hôte. Ces protéines se trouvent dans le sérum et sont capables d'opsoniser le micro-organisme pour déclencher sa phagocytose à travers les récepteurs de complément, dont ceux exprimés par les macrophages CR1, CR3 et CR4 (Sengelov 1995; Carroll 1998). Bien que la phagocytose, à travers l'action du C3b et C3bi, soit une fonction du système du complément très importante, elle n'est pas la seule. Le système du complément a aussi la fonction de recrutement des cellules inflammatoires grâce à C3a et C5a et de destruction directe par la formation des pores à la surface du micro-organisme, grâce à C5b, C6, C7, C8 et C9.

Le CR1 est une protéine de membrane avec un domaine extracellulaire « lectine-like ». Il est capable de lier le C3b, C4b et le C3bi. Ce récepteur est impliqué dans l'attachement des particules (Brown 1991; Stoute 2011). Le CR3 et CR4 font partie de la famille des intégrines. Ils sont formés par un hétéromère composé d'une chaine α (α_M pour CR3 et α_X pour CR4) et une chaine β (β_2 pour les deux) (Sengelov 1995). Dans le cas de CR3 et CR4, ils sont capables de lier de façon spécifique C3bi et ils ont des fonctions dans l'internalisation des particules. Les molécules du complément sont activées à la surface du micro-organisme par trois voies différentes : la voie classique, la voie des lectines liant le mannose et la voie alternative. Ces trois voies mènent à la production d'une protéase appelée C3 convertase qui transforme la molécule du complément C3 en sa forme active C3b, pour finalement devenir C3bi (Sim and Laich 2000). C3bi se lie donc aux CR1, CR3 et CR4. Les CR, contrairement aux récepteurs Fc, ont besoin d'autres stimuli pour réussir l'internalisation efficace. Ces stimuli peuvent être le LPS, PMA, les esters de phorbol, des cytokines, des facteurs de croissance, des chimiokines, etc. Ces stimuli permettent d'augmenter l'affinité des intégrines pour leur ligand (Wright and Silverstein 1982; Pommier, Inada et al. 1983; Wright, Craigmyle et al. 1983; Griffin and Mullinax 1985; Wright and Griffin 1985; Ross and Vetvicka 1993; Hughes and Pfaff 1998; Williams and Solomkin 1999; van Kooyk and Figdor 2000; Schmidt, Caron et al. 2001). Lors de l'augmentation de l'affinité, un regroupement des récepteurs a lieu, ce qui permet l'activation des molécules telles que RhoA et Arp2/3 pour commencer la polymérisation d'actine et la phagocytose (Caron and Hall 1998; Olazabal, Caron et al. 2002).

3.1.1.3. Récepteurs de mannose (MRs)

Les récepteurs de mannose sont des récepteurs qui ont des rôles importants, par exemple, dans l'élimination des molécules endogènes, dans la présentation antigénique ainsi que dans l'activation cellulaire (Martinez-Pomares 2012), mais aussi dans la phagocytose de particules (Gazi and Martinez-Pomares 2009). La structure des récepteurs de mannose est formée par la fraction extracellulaire dans laquelle se trouve un domaine riche en cystéines, qui est capable de

reconnaitre des résidus tels que le collagène (Martinez-Pomares, Wienke et al. 2006) et un domaine CTLD (C-type lectine domain) qui est capable de reconnaitre les résidus de mannose et fucose à la surface des micro-organismes ainsi que des allergènes (Stahl and Ezekowitz 1998; Martinez-Pomares 2012). À l'intérieur de la cellule, la fraction cytoplasmique est capable de déclencher les voies de signalisation qui mènent, entre autres, à la phagocytose ou à l'endocytose de la particule activatrice.

3.1.1.4. Récepteurs scavenger (SR)

Les récepteurs scavenger sont une grande famille de récepteurs de glycoprotéines transmembranaires qui ont des structures variables. Ils sont, entre autres, présents dans les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules endothéliales (Murphy, Tedbury et al. 2005).

Ils ont un rôle important comme PRR (Mukhopadhyay and Gordon 2004) et ils reconnaissent des molécules, dont le LPS, LTA, l'ADN bactérien avec des séquences CpG et le zymosan/β- glucane et d'autres protéines de surface dans les micro-organismes (Mukhopadhyay and Gordon 2004; Areschoug, Waldemarsson et al. 2008).

Parmi les fonctions des récepteurs scavenger, leur rôle comme récepteur dans la phagocytose indépendante des opsonines chez les macrophages et cellules dendritiques est remarquable (Mukhopadhyay and Gordon 2004; Areschoug, Waldemarsson et al. 2008). Leur importance comme co-récepteurs des TLRs dans la réponse proinflammatoire aux PAMPs a aussi été montrée (Hoebe, Georgel et al. 2005; Jeannin, Bottazzi et al. 2005).

Les récepteurs scavenger sont divisés en 8 différentes classes (A-H), selon leur structure (Murphy, Tedbury et al. 2005). Dans la classe A des récepteurs scavenger, il y a entre autres, le SR-A et le MARCO. Tous les deux présentent une structure trimérique avec un domaine cytoplasmique, un domaine transmembranaire, un domaine collagène et un domaine C-terminal riche en cystéine (SRCR). De plus, le SR-A présente un domaine en hélice α (Elomaa, Kangas et al. 1995; Murphy, Tedbury et al. 2005). Le SR-A est un récepteur

phagocytaire exprimé dans les macrophages et cellules dendritiques, capables de lier des molécules précédemment citées telles que LPS, LTA, l'ADN CpG bactérien et l'ARN à double brin (Dunne, Resnick et al. 1994; Zhu, Reich et al. 2001; Limmon, Arredouani et al. 2008). Ce récepteur est également capable de réduire la réponse pro-inflammatoire des macrophages ou des cellules dendritiques aux micro-organismes et ses produits (Becker, Cotena et al. 2006; Ozeki, Tsutsui et al. 2006; Hollifield, Bou Ghanem et al. 2007; Villwock, Schmitt et al. 2008). De son côté, le MARCO est un récepteur phagocytaire seulement exprimé dans certaines populations de macrophages, par exemple, les macrophages alvéolaires. De la même façon que SR-A, il est capable de reconnaître plusieurs protéines de surface bactériennes.

Dans la classe B des récepteurs scavenger, les récepteurs CD36 sont importants. Le CD36 est un récepteur exprimé dans les macrophages, plaquettes, adipocytes, cellules épithéliales et cellules endothéliales (Murphy, Tedbury et al. 2005). Même si la fonction primordiale de CD36 est la reconnaissance du LTA et MALP-2 comme corécepteur du TLR2 (Hoebe, Georgel et al. 2005), il a été montré que le CD36 exprimé dans les macrophages peut aussi agir comme récepteur phagocytaire, par exemple, lors de l'internalisation de *S. aureus* (Stuart, Deng et al. 2005) ou des érythrocytes parasités par *Plasmodium* (McGilvray, Serghides et al. 2000; Patel, Serghides et al. 2004).

Les autres groupes de récepteurs scavenger ont été moins caracterisés jusqu'à date. Plusieurs d'entre eux comme les classes D, E, F et G s'expriment dans les macrophages. Leurs fonctions sont variées et ils peuvent être impliqués dans la phagocytose comme dans le cas de la classe G (Shimaoka, Nakayama et al. 2003)

Bien que les mécanismes d'activation menant à la phagocytose ne sont pas encore bien caractérisés, la façon dont le cytosquelette est mobilisé autour du coupe phagocytaire et que certaines molécules (F-actine, taline, PKCα, MARCKS et myosine) sont recrutées lors de la phagocytose des particules de zymosan a bien été expliqué (Allen and Aderem 1996). Chaque récepteur impliqué dans la phagocytose active des voies de signalisation différentes,

menant à différents mécanismes d'internalisation. Par exemple, la phagocytose via les récepteurs Fc ou de complément recrute des molécules comme la vinculine et la paxilline dans la coupe phagocytaire, ce qui ne se produit pas dans le cas de la phagocytose via les récepteurs de mannose (Allen and Aderem 1996). De la même façon que les FcR et au contraire des CR, l'activation des récepteurs de mannose induit la production de molécules pro-inflammatoires comme IL-1β, IL-6, GM-CSF, TNF, et IL-12 (Griffin and Mullinax 1985; Stein and Gordon 1991; Garner, Rubanowice et al. 1994; Shibata, Metzger et al. 1997; Yamamoto, Klein et al. 1997)

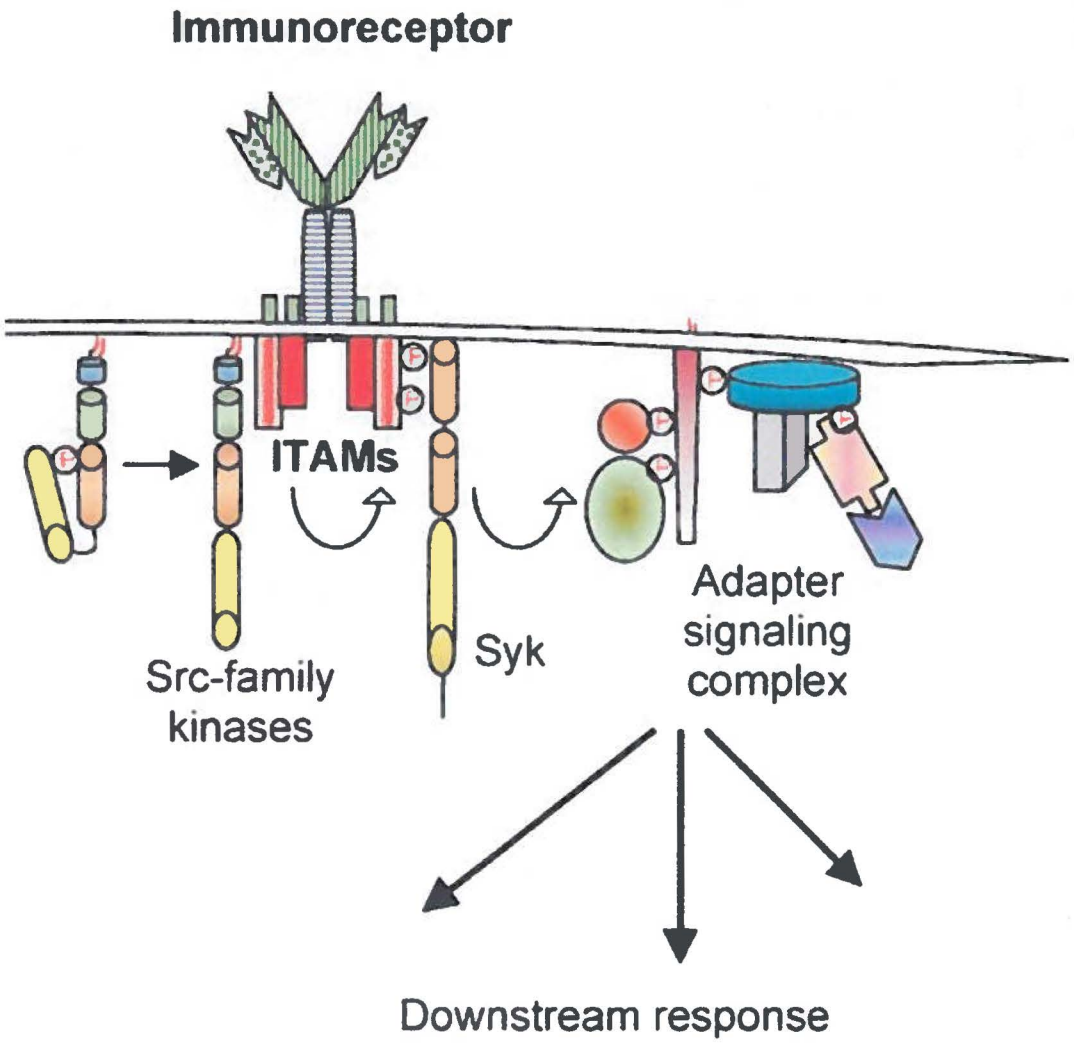


Figure 7. Modèle de la voie de signalisation menant à l'activation des récepteurs Fc. Lors de l'activation des récepteurs Fc les ITAMs seront

phosphorylés par une kinase de la famille Src. Cela permet le recrutement et l'activation de Syk qui déclenche les voies de signalisation menant, entre autres, à la phagocytose (Lowell 2004).

3.2. Maturation du phagosome

Une fois que la particule phagocytée est internalisée, le phagosome résultant passe par un processus de maturation qui finit avec la digestion de cette particule. Les peptides résultant de cette digestion sont disponibles pour la présentation antigénique à travers le CMH-II (Botelho and Grinstein 2011).

Pendant la maturation du phagosome, plusieurs organelles tels que les endosomes et les lysosomes entrent en contact avec le phagosome, par une méthode appelée « kiss and run », pour lui apporter des éléments membranaires et des enzymes telles que protéases, nucléases, lipases, etc (Desjardins 1995). À la fin de la maturation, les caractéristiques les plus remarquables du phagolysosome sont l'acidification du milieu, la présence des espèces réactives à l'oxygène et à l'azote, la présence des protéases actives et des peptides cationiques antimicrobiens.

Vu l'importance de l'interaction des vésicules dans la maturation du phagosome, il est logique que sa régulation soit dépendante des molécules qui régulent le trafic vésiculaire, comme par exemple, les GTPases Rab ou les SNARE. La vitesse de celle-ci peut varier dépendamment du type de récepteur utilisé, de la taille de la particule et de la nature de celle-ci (de Chastellier and Thilo 1997). Par exemple, il a été montré que la maturation du phagosome est plus rapide lorsqu'il contient des petites particules par rapport aux grandes (Wang and Goren 1987). La maturation du phagosome est aussi plus rapide quand elle est déclenchée via les récepteurs Fc et MR (de Chastellier and Thilo 1997). De la même façon, il a été montré que plusieurs micro-organismes sont capables d'interagir avec la machinerie de maturation du phagosome pour l'inhiber ou la modifier. Parmi ces micro-organismes nous pouvons remarquer *Mycobacterium spp.* (Vandal, Pierini et al. 2008), *Coxiella spp.* (Hackstadt and Williams 1981), *Rickettsia spp.* (Winkler 1990) et *Leishmania spp.* (Vinet, Fukuda et al. 2009).

Dans la maturation du phagosome, 3 étapes peuvent être identifiées (Figure 8) :

1. Phagosome précoce
2. Phagosome tardif
3. Phagolysosome

3.2.1. Phagosome précoce

Lors de la séparation du phagosome de la membrane plasmique, le $PI(4,5)P_2$ nécessaire pour l'assemblage de l'actine dans le coupe phagocytaire, est exclu de la membrane du phagosome (Botelho and Grinstein 2011). La charge négative de la surface diminue et la GTPase Rab5 est acquise par la fusion des endosomes. La présence de Rab5 à la surface du phagosome permet le recrutement des molécules comme la PI3K de classe III, Vps34. Cette PI3K fournit le PI3P nécessaire pour le recrutement des autres molécules, telles que nexines, p40phox (NADPH oxidase), Hrs et EEA1. Ces molécules vont faciliter les fusions membranaires avec les endosomes précoces, nécessaires pour la continuité de la maturation (Botelho and Grinstein 2011).

De plus, Rab5 est aussi responsable du recrutement de Mon1. Plus tard, cette molécule sera nécessaire pour le recrutement de Rab7 ce qui marquera la transition au phagosome tardif (Nordmann, Cabrera et al. 2010).

3.2.2. Phagosome tardif

La substitution de Rab5 par Rab7 marque la transition au phagosome tardif. D'autres molécules présentes dans la première étape du phagosome sont également perdues, par exemple, EEA1 et PI3P (Botelho and Grinstein 2011). L'interaction du phagosome avec les endosomes tardifs et lysosomes va fournir à la membrane du phagosome, des molécules telles que LAMP1 et la pompe à proton V-ATPase (Huynh, Eskelinen et al. 2007). Rab7 permet aussi le

recrutement des molécules nécessaires pour l'interaction avec les microtubules. Cela permet le rapprochement des phagosomes et des lysosomes et endosomes tardifs (Wang, Ming et al. 2011).

3.2.3. Phagolysosome

Dans la dernière étape, le phagolysosome complète l'acquisition de toutes ses caractéristiques microbicides. Le pH à l'intérieur du phagosome, qui était de 7.4 au moment de sa genèse, descend autour de 5 grâce à l'action de la V-ATPase et la NADPH oxydase. La présence des peptides cationiques permet la formation de pores dans les parois bactériennes. La concentration de plusieurs protéases augmente et elles s'activent. Parmi ces protéases, nous retrouvons des cathepsines, nucléases, lipases et glycosidases. Dans un environnement si hostile, la plupart de particules phagocytées sont dégradées. Cette dégradation produit des peptides qui sont chargés dans des molécules du CMH II pour la présentation antigénique.

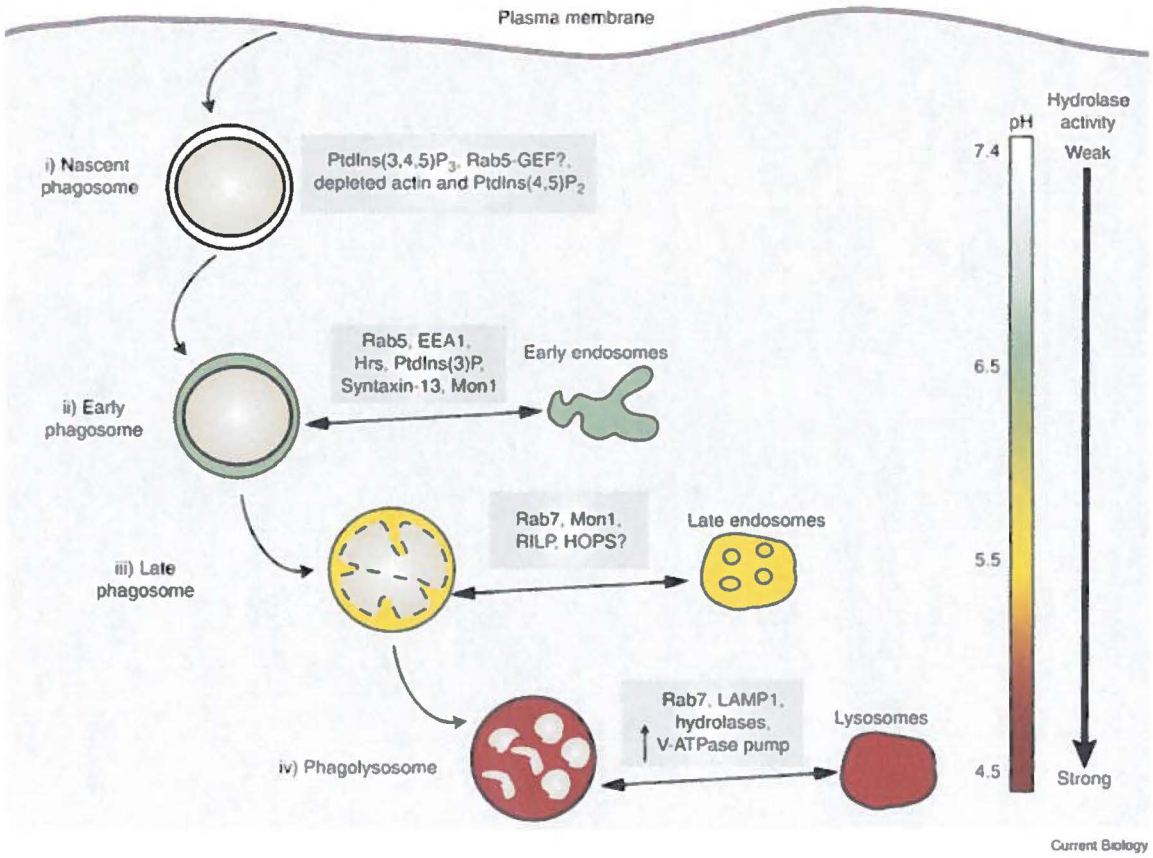


Figure 8. Maturation du phagosome. (Botelho and Grinstein 2011)

3.3. Signalisation et phagocytose

Comme décrit auparavant, les voies de signalisation déclenchées lors de la phagocytose sont très variées et elles impliquent plusieurs protéines et molécules. Parmi les voies de signalisation impliquées, nous voulons remarquer celles de la PKC, la PI3K te la PLC (Figure 6).

Une molecule aussi impliquée dans les voies de signalisation activées lors de la phagocytose est ERK. ERK est une protéine qui présente deux formes, ERK1 et ERK2, qui fait partie de la famille des MAP kinases. C'est une protéine qui se phosphoryle lors de l'activation de plusieurs récepteurs extracellulaires (Boulton and Cobb 1991; Boulton, Nye et al. 1991). De la même façon que la protéine ERK est impliquée dans l'activation du TLR4, elle est phosphorylée lors de la

phagocytose. L'activation d'ERK est nécessaire pour la phagocytose des bactéries Gram négatif tel que *Francisella* via les récepteurs Fc (Parsa, Butchar et al. 2008; Ferracini, Martins et al. 2010). Lors de la phagocytose de *Francisella*, les récepteurs Fc sont activés, menant à la phosphorylation de Syk. L'activation de Syk amène l'activation des ERKs dans la voie des MAPKs pour rendre possible la phagocytose de la bactérie. L'activation d'ERK en aval de Syk via les récepteurs Fc, produit aussi une réponse de prolifération (Luo, Pollard et al. 2010).

4. *LEISHMANIA*

Les parasites du genre *Leishmania* sont des parasites protozoaires de la famille *Trypanosomatidae* qui ont été décrits pour la première fois par William Boog Leishman (Leishman 1903). La morphologie de *Leishmania* est pareille à celle des autres membres de l'ordre des kinetoplastides. Ils possèdent un kinétoplaste qui est une organelle riche en ADN et une matrice de microtubules qui forme la plupart du cytosquelette. Ils possèdent aussi un flagelle unique et une poche flagellaire. Cette famille présente une trentaine d'espèces de *Leishmania* parmi lesquelles une vingtaine sont pathologiques chez l'humain. Ce parasite est l'agent étiologique des leishmanioses.

4.1. Leishmaniose

Les maladies infectieuses ou parasitaires sont la deuxième cause de mort la plus fréquente après les maladies cardiovasculaires et juste devant le cancer (WHO 2008). Parmi ces maladies, on trouve la leishmaniose. Les différents types de leishmanioses affectent 12 millions de personnes dans 88 pays à travers le monde dont 2 millions des nouvelles infections chaque année. De plus, 350 millions de personnes sont à risque d'être infectées (Desjeux 2004).

Ce parasite peut produire différentes types de leishmanioses, de la forme la moins sévère comme la leishmaniose cutanée à la plus dangereuse, la leishmaniose viscérale qui peut être mortelle. La leishmaniose cutanée se présente sous deux formes, localisée ou diffusée, selon la charge parasitaire. Les deux formes se traduisent par la présence d'ulcères cutanés de sévérité variable qui peuvent guérir de façon spontanée. La leishmaniose cutanée peut être produite par *L. mexicana* en Amérique et par *L. major, L. tropica* et *L.*

aethiopica dans le reste du monde. La leishmaniose mucocutanée est causée par *L. braziliensis braziliensis* et elle va produire des blessures dans les muqueuses oro-naso-pharyngiennes. Finalement, la leishmaniose la plus grave est la leishmaniose viscérale ou Kala-azar. Elle est produite par *L. donovani* en infectant les macrophages du foie, de la rate et de la moelle osseuse. Cette infection va produire de la fièvre, splénomégalie, hépatomégalie et anémie. La leishmaniose viscérale est une maladie chronique qui peut être guérie dans 90% des cas avec un traitement adéquat. Par contre, en absence de traitement elle cause une mortalité de 100% (CDC 2013).

Le cycle de vie de *Leishmania* est bien connu (Figure 9), le vecteur d'infection est la mouche de sable du genre *Lutzomyia* en Amérique ou *Phlebotomus* dans le reste du monde. *Leishmania* est un parasite avec un cycle de vie biphasique et deux hôtes différents : la mouche du sable et un mammifère dont l'humain, les canidés ou les rongeurs (CDC 2013).

Leishmania présente deux formes dans son cycle de vie : la forme promastigote qui présente un flagelle et qui vit dans le tube digestif de l'insecte hôte et la forme amastigote qui n'a pas de flagelle et qui parasite les macrophages de son hôte mammifère (CDC 2013).

Dans le cycle de vie de *Leishmania*, la piqûre de la femelle de la mouche de sable transmet les promastigotes de son tube digestif à l'hôte mammifère (Sacks 2001). Une fois dans le corps du nouvel hôte, les parasites résistent à l'action lytique du complément, mais ils sont phagocytés par les macrophages dès leur entrée ou après leur libération par des neutrophiles infectés qui avaient été recrutés au site de la piqûre du moustique (van Zandbergen, Klinger et al. 2004). Dans les 24 à 72 heures suivant l'infection d'un macrophage, les promastigotes de *Leishmania* se transforment en amastigotes et se multiplient dans une vacuole parasitophore qui présente les mêmes caractéristiques qu'un phagolysosome (pH 5.5, présence d'hydrolases, etc.) (Antoine, Prina et al. 1990; Lang, Hellio et al. 1994; Antoine, Prina et al. 1998). Cette transformation implique des changements importants dans les molécules de virulence à la surface de *Leishmania*. Dans le glycocalix du promastigote, on retrouve du glycolipide lipophosphoglycane (LPG), la métalloprotéase GP63, la phosphatase acide, du proteophosphoglycane (PPG) et des phospholipides glycosinilositols (GIPL)

(Mukhopadhyay and Mandal 2006). Plusieurs de ces molécules notamment le LPG et la GP63 varient leur expression dans la forme amastigote pour la diminuer de façon très importante (Medina-Acosta, Karess et al. 1989; McConville and Blackwell 1991; Pimenta, Saraiva et al. 1991; Turco and Sacks 1991; Schneider, Rosat et al. 1992). La prolifération des amastigotes cause une lyse des macrophages qui libére les amastigotes, leur pemettant ainsi de réinfecter d'autres macrophages et cellules phagocytiques. Cette infection produit les différents types de leishmanioses dépendamment de l'espèce de *Leishmania*. Lorsqu'un hôte mammifère infecté est piqué par une mouche de sable, le repas sanguin transmet le parasite à l'insecte. Dans l'intestin de l'insecte, les amastigotes se transforment en promastigotes procycliques, une forme non infectieuse de promastigotes, qui se divisent rapidement. Les promastigotes procycliques s'attachent à l'épithélium et restent dans l'intestin de la mouche grâce à l'interaction des lectines exprimées dans l'épithélium de la mouche de sable et le LPG de surface du promastigote (Matte, Mallégol et al. 2009). Plus tard, les promastigotes procycliques se transforment en promastigotes métacycliques, lesquels ne se divisent plus et sont infectieux. Ces promastigotes remontent dans le tractus digestif pour recommencer le cycle.

Comme nous allons le voir plus tard, pendant l'infection des macrophages, la survie de *Leishmania* dans le phagolysosome de l'hôte mammifère est possible parce que le parasite prend le contrôle de la maturation du phagolysosome et interagit avec plusieurs molécules cellulaires. Même si les macrophages sont les cellules principales pour l'infection de *Leishmania*, il a déjà été prouvé que ce parasite peut infecter d'autres types cellulaires tels que les neutrophiles (Gabriel, McMaster et al. 2010) et les fibroblastes (Bogdan, Donhauser et al. 2000).

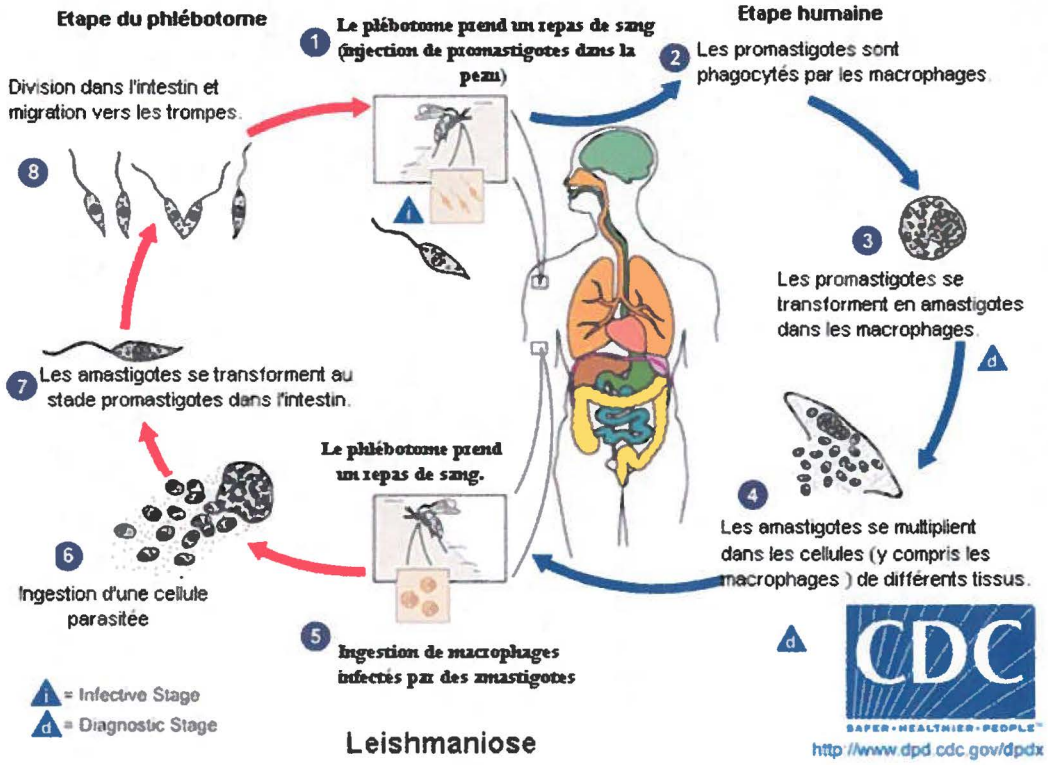


Figure 9. Cycle de vie de *Leishmania* (WHO 2008).

4.2. Facteurs de virulence de *Leishmania*

La virulence ou pathogénicité de *Leishmania* n'est pas toujours la même, il existe un spectre de virulence qui va des espèces non-pathogènes, comme *Leishmania tarentolae,* aux espèces très pathogènes comme, *L. donovani*. Ce degré de pathogénicité dépend aussi de la forme dans laquelle le parasite se trouve (promastigote ou amastigote). Le succès de *Leishmania* pour établir une infection dans les macrophages est déterminé par plusieurs facteurs de virulence (Chang and Dwyer 1976).

Parmi ces facteurs de virulence, on peut remarquer le LPG, le leishmanolysin ou métalloprotéase GP63, le glycosylphosphatidylinositol (GPI), le GIPL, le

phosphoglycane (PG), le proteophosphoglycane (PPG) et la cystéine protéase (CP) (Chang and McGwire 2002).

Comme décrit auparavant, la présence de certains facteurs de virulence peut varier énormément dépendamment de la phase du cycle de vie dans laquelle *Leishmania* se trouve. Par exemple, le facteur de virulence A2 est très exprimé dans la phase amastigote, mais son expression est réduite de façon très importante dans la phase promastigote (Charest and Matlashewski 1994). À l'opposé, le LPG, qui est la molécule de surface la plus abondante chez le promastigote, voit son expression diminuée drastiquement chez l'amastigote (Matlashewski 2001).

Les différents patrons d'expression des facteurs de virulence aident le parasite à survivre chez les différents hôtes. Nous présenterons en détail par la suite de ce paragraphe les deux facteurs de virulence les plus importants pour la survie du parasite, soit GP63 et LPG.

4.2.1. Métalloprotéase GP63

La métalloprotéase GP63 (glycoprotéine de 63 KDa), découverte dans les années 1980, a été nommée aussi MSP (major surface protéase), PSP (promastigote surface protéase) ou leishmanolysin. Il s'agit d'une métalloprotéase de 63 KDa présente chez *Leishmania spp.*, mais aussi dans d'autres trypanosomatides protozoaires. Elle appartient à la superfamille de peptidases M8.

La métalloprotéase GP63 est un des facteurs de virulence les plus importants de *Leishmania*. Elle est donc primordiale au succès de l'infection et à la survie du parasite. Un exemple illustrant l'importance de la GP63 pendant l'infection est la réduction drastique de la progression de la leishmaniose autant viscérale que cutanée lors de l'utilisation des inhibiteurs des PTPs (protéines tyrosine

phosphatase), enzymes qui seront activées par la GP63 pendant l'infection de *Leishmania* (Olivier, Romero-Gallo et al. 1998; Matte, Marquis et al. 2000).

4.2.1.1. Structure

La métalloprotéase GP63 est la protéine la plus abondante de la surface de *Leishmania*. Il y a $5x10^5$ molécules de la métalloprotéase dans chaque promastigote (Bouvier, Etges et al. 1985) et elle représente 1% de toutes les protéines du parasite (Bahr, Stierhof et al. 1993). Bien qu'approximativement 75% de la protéine se trouve à la surface du parasite (Weise, Stierhof et al. 2000), cette protéase se retrouve aussi à l'intérieur de *Leishmania* dans des microvésicules qui ressemblent aux exosomes des mammifères (Gomez and Olivier 2010). Dans les cas de la GP63 membranaire, elle est fixée avec une ancre GPI. Cette ancre n'est pas présente dans la protéine qui se trouve dans les microvésicules (Bordier, Etges et al. 1986; Gomez, Contreras et al. 2009). Les protéines contenues dans les microvésicules et celles ancrées à la membrane peuvent être relâchées à l'extérieur du parasite et, de cette façon, agir sur de substrats présents dans le milieu extérieur (McGwire, O'Connell et al. 2002; Yao, Leidal et al. 2002; Gomez, Contreras et al. 2009).

La plupart des métalloprotéases GP63 des différentes espèces de *Leishmania* présentent une homologie très grande (Bouvier, Etges et al. 1985; Chaudhuri, Chaudhuri et al. 1989; Miller, Reed et al. 1990). 24 gènes différents de la métalloprotéase GP63 ont été décrits et certaines espèces comme *L. chagasi, L. major L. donovani* et *L. mexicana* peuvent porter plusieurs gènes pour la métalloprotéase GP63 (Yao, Donelson et al. 2003; Gomez, Contreras et al. 2009). Ces différentes métalloprotéases GP63 peuvent différer dans la région carboxyl-terminale, dans les UTRs et parfois peuvent avoir des types d'expression différents qui peuvent, par exemple, être liés à un des stades du cycle de vie (Ramamoorthy, Donelson et al. 1992; Medina-Acosta, Karess et al. 1993; Voth, Kelly et al. 1998).

La structure de GP63 est composée d'une extrémité amino-terminale, une partie centrale et une extrémité carboxyl-terminale. L'extrémité amino-terminale est

conservée dans les 24 séquences de la métalloprotéase. Entre cette partie et la partie centrale, se trouve le domaine catalytique de la famille des protéases de la classe metzincin (Yao, Donelson et al. 2003). Cette famille de protéases est dépendante du zinc pour leur activité protéolytique. Cet atome de zinc est localisé dans la région catalytique (Figure 10). Finalement l'extrémité carboxyle-terminale présente une région qui peut montrer une ancre GPI. Cette ancre GPI permet la fixation du GP63 à l'extérieur de la membrane plasmique du parasite (Ilgoutz and McConville 2001).

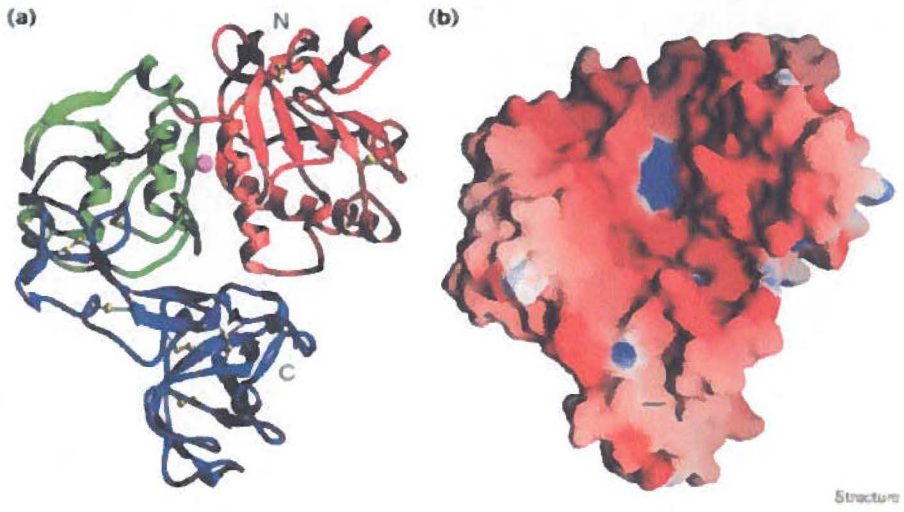


Figure 10. Structure 3D de la métalloprotéase GP63. A) En rouge est représentée l'extrémité amino-terminale, en bleu l'extrémité carboxyle-terminale, en vert la partie centrale, en jaune les ponts disulfure et en mauve l'atome de zinc du site actif. B) En rouge, on peut distinguer les régions ayant une charge négative et en bleu, celles possédant une charge positive (Schlagenhauf, Etges et al. 1998)

4.2.1.2. Expression de la GP63 et entrée dans le macrophage

Tel que mentionné auparavant, le rôle de la métalloprotéase GP63 comme facteur de virulence est très important. La relation entre la quantité de cette

protéine et la virulence du parasite est très claire (Kweider, Lemesre et al. 1987; Kweider, Lemesre et al. 1989). Pendant la transition de la phase de croissance logarithmique à la phase stationnaire, l'expression de la métalloprotéase GP63 augmente de 14-16 fois; ceci qui correspond à une augmentation de la virulence. Même si cette augmentation de l'expression générale est due à l'ensemble des métalloprotéases GP63, les profils d'expression de chaque métalloprotéase GP63 exprimée dans le parasite sont différents et ils changent de façon indépendante. (Yao, Leidal et al. 2002; Yao, Donelson et al. 2003).

Même si la relation entre la virulence de *Leishmania* et la métalloprotéase est bien connue, la voie d'entrée de la GP63 dans l'hôte n'est pas encore bien définie. Il a été décrit qu'une partie de la GP63 passe au travers des radeaux lipidiques pour entrer dans la cellule (Gomez, Contreras et al. 2009). Ces radeaux lipidiques sont des domaines membranaires dynamiques riches en cholestérol, sphingolipides et protéines ancrées par GPI. Ils sont aussi très importants pour l'internalisation de molécules au cytoplasme et comme plateformes d'association pour des molécules clés dans la signalisation moléculaire (Le Roy and Wrana 2005). Dans le cas des radeaux lipidiques, le mécanisme d'entrée n'est pas bien défini, mais plusieurs hypothèses ont été proposées. La première des possibilités est l'interaction avec les radeaux lipidiques grâce à son ancre GPI qui lui permettrait d'être transportée au cytoplasme par un mouvement de « flipping » (Figure 11A). La deuxième possibilité serait pour la GP63, avec une ancre GPI ou sans ancre, une entrée à travers une protéine de transport située dans la membrane de l'hôte (Figure 11A). La troisième option serait une endocytose qui commencerait dans les radeaux lipidiques et qui guiderait la GP63 à travers l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique pour finalement libérer la protéase au cytoplasme (Figure 11B). Enfin, la dernière possibilité serait la formation de microvésicules par *Leishmania* qui interagirait avec la membrane cellulaire pour porter la GP63 à l'intérieur du macrophage (Figure 11C) (Gomez and Olivier 2010).

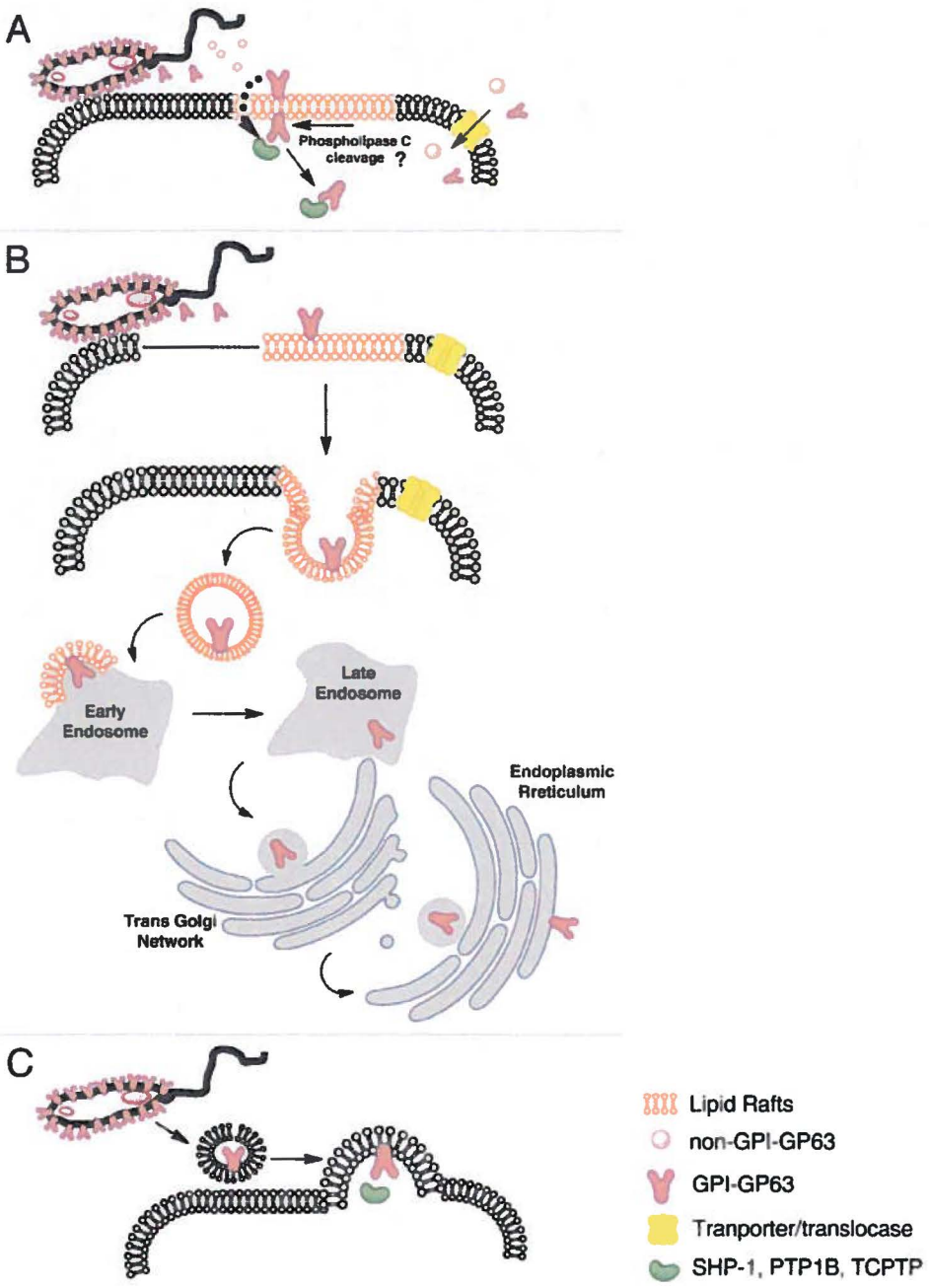


Figure 11. Entrée de la métalloprotéase GP63 dans la cellule hôte. Schémas des quatre mécanismes possibles par lesquels la métalloprotéase entre dans la cellule hôte. A) Entrée de la GPI-GP63 par les radeaux lipidiques avec un mouvement de « flipping » et entrée de la GP63 libre ou la GPI-GP63 à travers une protéine de transport. B) Entrée par endocytose inversée. C) Entrée par fusion de microvésicules avec la membrane cellulaire (Gomez and Olivier 2010).

4.2.1.3. Fonctions

Le rôle le plus important de cette protéine est précisément comme protéase capable de dégrader plusieurs substrats protéiques. La GP63 est une endopeptidase sans activité exopeptidase. Il existe une séquence spécifique d'acides aminés qui est spécialement vulnérable à l'activité protéase de la GP63 : P1↓P'1-P'2-P'3 où la flèche est le lieu de coupure, P1 correspond à un acide aminé polaire, P'1 à un acide aminé hydrophobe et P'2 et P'3 à un résidu basique (Gomez, Contreras et al. 2009). Par contre, même si cette séquence est souvent retrouvée dans les protéines que la GP63 est capable de couper, elle n'est pas la seule séquence susceptible d'être reconnue et dégradée par cette protéase (Bouvier, Schneider et al. 1990; BRENDA 2011).

Entre autres, la GP63 est capable de dégrader des protéines extracellulaires et intracellulaires telless que la caséine, azocaseine, gélatine, albumine, hémoglobine, fibrinogène, immunoglobulines, complément (C3b), collagène IV et fibronectine (Chaudhuri and Chang 1988; Bouvier, Schneider et al. 1990; McGwire, Chang et al. 2003), mais elle clive aussi des molécules très importantes dans la signalisation cellulaires comme TAB-1, SHP-1, PTP1B, TCPTP, PTP-PEST et p130cas (Gomez, Contreras et al. 2009; Halle, Gomez et al. 2009; Olivier, Atayde et al. 2012).

D'autres fonctions de la GP63 sont la prévention de la dégradation de *Leishmania* à l'intérieur des phagosomes (Chaudhuri, Chaudhuri et al. 1989), l'inhibition du chimiotactisme chez le macrophage (Ahmed, Wahbi et al. 1998), la diminution de la réponse cellulaire par le clivage du CD4 (Hey, Theander et al. 1994) et l'inhibition de la présentation antigénique par le CMH I (Garcia, Graham et al. 1997).

Même si les effets de la métalloprotéase GP63 ont été étudiés surtout dans la cellule hôte primaire de *Leishmania*, le macrophage, ils ont aussi été décrits dans d'autres types cellulaires. Il a été montré que la production d'IFNγ relâché par les cellules NK est affectée par GP63 ce qui influence le développement de la réponse Th1 lors de l'infection (Lieke, Nylen et al. 2008). Cela est un effet assez

surprenant de GP63, car l'infection de *Leishmania* dans les cellules NK n'a jamais été détectée. Cet effet pourrait être expliqué grâce à l'interaction de ces cellules avec la GP63 secrétée par le parasite de façon libre ou contenu dans des exosomes. Il a aussi été montré la capacité de *Leishmania* à infecter des fibroblastes (Bogdan, Donhauser et al. 2000) et l'importance de la GP63 dans leur inactivation (Halle, Gomez et al. 2009) ce qui donnerait à ces cellules un rôle important comme réservoir pour la persistance de l'infection.

4.2.2. Lipophosphoglycane (LPG)

Autre facteur de virulence de *Leishmania* très important sur lequel nous reviendrons plus tard est le LPG. Le LPG couvre la totalité du promastigote de toutes les espèces de *Leishmania* incluant le flagelle et il est aussi une des molécules les plus abondantes à la surface du parasite (McConville and Blackwell 1991; Turco and Descoteaux 1992). Même si la quantité de LPG à la surface est maximale dans la forme promastigote, elle est aussi présente mais d'une façon beaucoup moins abondante dans la forme amastigote (McConville and Blackwell 1991; Pimenta, Saraiva et al. 1991; Turco and Sacks 1991). Autant pour la forme promastigote qu'amastigote, le LPG est une molécule essentielle pour la survie du parasite (Novozhilova and Bovin 2010).

La structure du LPG se divise en quatre parties. De la membrane du parasite vers l'extérieur, les parties retrouvées sont : une ancre lipidique (1-*O*-alkyl-2-*lyso*-phosphatidyle (*myo*) inositol), un noyau glycane, une chaine formée par des unités répétées (Galβ1, 4Manα1-PO_4) et un couvercle oligosaccharide. Dépendamment de l'espèce et la forme cyclique de *Leishmania*, la chaîne répétée et le couvercle vont être un peu différents (McConville, Schnur et al. 1995).

4.3. INTERACTION *LEISHMANIA*-MACROPHAGE

Dans les prochaines sections nous décrirons les différentes fonctions de la GP63 et le LPG dans le macrophage lors de l'infection par *Leishmania*.

4.3.1. Internalisation de *Leishmania* dans le macrophage

Lors de l'entrée dans la cellule hôte et pendant l'infection comme telle, *Leishmania* est capable d'empêcher l'activation du macrophage pour permettre sa survie (Bogdan and Rollinghoff 1998; Lodge and Descoteaux 2005; Olivier, Gregory et al. 2005; Kima 2007). L'entrée de *Leishmania* dans le macrophage est régulée et influencée par différentes molécules dont le LPG et la GP63. Dans un premier temps, les promastigotes qui se trouvent dans le sang sont opsonisés par le complément, mais ils ne sont pas détruits grâce à la grande couche de LPG qui protège le parasite (Puentes, Da Silva et al. 1990). Autant que la métalloprotéase GP63 est importante pour l'attachement au macrophage, elle est aussi essentielle dans la protection du parasite contre le système du complément (Chang and Chang 1986; Russell and Wilhelm 1986; Wilson and Hardin 1988; Da Silva, Hall et al. 1989). Il a été montré comment GP63 est capable de se lier aux récepteurs du complément CR1 et CR3 en agissant comme une « opsonine » ce qui va permettre l'attachement à sa cellule hôte (Mosser and Edelson 1985; Da Silva, Hall et al. 1989) et l'induction de la phagocytose (Russell and Wilhelm 1986). De plus l'activité protéolytique de GP63 chez les promastigotes va transformer rapidement la molécule du complément C3b dans sa forme inactive C3bi (Brittingham, Morrison et al. 1995) pour éviter la lyse du parasite par le système du complément.

Les récepteurs de complement CR1 et CR3 (Mac-1) étant importants pour la reconnaissance de *Leishmania*, d'autres recepteurs sont également impliqués, par exemple les récepteurs de mannose-fucose (MFR), TLR2, TLR9, récepteur de fribronectine et récepteurs de glycoconjugués (Mosser and Edelson 1987; Mosser and Rosenthal 1993; Martinez-Salazar, Berzunza-Cruz et al. 2008).

Une autre cible importante de *Leishmania* afin qu'elle puisse réussir son infection est la machinerie de contrôle du cytosquelette d'actine. Comme dans le cas d'autres parasites intracellulaires (Rottner, Lommel et al. 2004; Stevens, Galyov et al. 2006), *Leishmania* va prendre le contrôle du cytosquelette d'actine grâce à l'activation LPG-dépendante de molécules comme Cdc42 (Morehead, Coppens et al. 2002), mais aussi à l'activation de PTP-PEST et à la dégradation de p130cas par la métalloprotéase GP63 (Halle, Gomez et al. 2009).

Dans tous les cas, l'internalisation de *Leishmania* va se faire de façon silencieuse, sans déclencher les voies d'activation du macrophage comme les voies de MAPK ou du facteur nucléaire κB (Mosser and Edelson 1987; Prive and Descoteaux 2000). Une fois dans le macrophage, *Leishmania* va bloquer le mécanisme de défense du macrophage contre les micro-organismes et va empêcher la cellule de s'activer par d'autres stimulus externes comme l'IFN-γ et le LPS (Descoteaux and Matlashewski 1989; Descoteaux, Turco et al. 1991; Ghosh, Bhattacharyya et al. 2001; Ghosh, Bhattacharyya et al. 2002; Dey, Majumder et al. 2007).

4.3.2. Inhibition de la maturation du phagosome

Lors de l'initiation de la phagocytose des promastigotes par le macrophage, le réarrangement du cytosquelette d'actine ainsi que les GTPases de la famille Rho comme RhoA, Cdc42 et Rac vont avoir des rôles importants pour la formation et maturation du phagosome (Chimini and Chavrier 2000; Prive and Descoteaux 2000; Etienne-Manneville and Hall 2002; Lodge and Descoteaux 2005) .

Une fois qu'une particule est internalisée par phagocytose et que la couche d'actine autour du phagosome est dépolymérisée, celui-ci va pouvoir interagir avec le système endosomal (Aderem and Underhill 1999). Dans le cas de l'infection par *Leishmania*, lors de la phagocytose du parasite, l'interaction du phagosome avec les endosomes précoces et tardifs est inhibée par le LPG (Miao, Stafford et al. 1995; Desjardins and Descoteaux 1997; Dermine,

Scianimanico et al. 2000; Holm, Tejle et al. 2001; Lodge and Descoteaux 2005; Lodge and Descoteaux 2005; Lippuner, Paape et al. 2009) comme le démontre le retardement dans l'acquisition des marqueurs de maturation tels que Rab5, Rab7 ou LAMP-1 (Desjardins, Nzala et al. 1997; Scianimanico, Desrosiers et al. 1999; Lippuner, Paape et al. 2009). En même temps, l'insertion du LPG dans les radeaux lipidiques du phagosome va altérer leur intégrité (Tolson, Turco et al. 1990; Chakraborty, Banerjee et al. 2005; Dermine, Goyette et al. 2005; Winberg, Holm et al. 2009).

Le LPG va aussi empêcher le recrutement du phagosome et des molécules importantes pour la dépolymérisation de l'actine comme le PKC-α (Holm, Tejle et al. 2001; Holm, Tejle et al. 2003) dont il va aussi inhiber l'activité (McNeely, Rosen et al. 1989; Descoteaux, Matlashewski et al. 1992; Giorgione, Turco et al. 1996). De plus, il va prévenir le recrutement de la synaptotagmine V, une protéine importante pour la fusion membranaire (Vinet, Fukuda et al. 2009). Ceci va prolonger l'association des molécules telles que Cdc42, Arp2/3, WASP, α-actinine, Nck et Myosine II à la membrane phagosomale ce qui va retarder la dépolymérisation de l'actine autour du phagosome (Lodge and Descoteaux 2005).

Même si le LPG joue un rôle important dans l'inhibition de la maturation du phagosome et dans la virulence de *Leishmania*, certaines espèces de *Leishmania* peuvent proliférer dans le macrophage en absence du LPG comme le *L. mexicana* (Ilg, Demar et al. 2001). Il y a aussi des espèces de *Leishmania* comme par exemple *L. amazonensis* où le phagosome va présenter tous les marqueurs de maturation habituels malgré la présence du LPG (Courret, Frehel et al. 2002).

4.3.3. Inhibition des réponses du macrophage

4.3.3.1. Suppression de la production des espèces réactives de l'oxygène de l'azote

Après l'activation des neutrophiles suite à une infection, le phénomène connu comme « burst oxydatif» va se produire. Celui-ci va être important pour l'élimination efficace des micro-organismes. Ce phénomène consiste en la réduction de l'oxygène et la production des anions superoxydes ou espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cette réaction va être médiée pas la NADPH oxydase. L'importance de cette enzyme dans la défense contre les pathogènes est mise en évidence chez les individus qui ne la possèdent pas. Chez ces individus, une hypersensibilité aux infections microbiennes a été démontrée (Shatwell and Segal 1996).

Leishmania doit donc être capable d'inhiber l'action de la NADPH oxydase pour réussir l'infection du macrophage (Figure 12). La NADPH oxydase est formée de plusieurs sous-unités, entre autres l'hétérotrimère p47/p67/p40^{phox}. Pour que l'enzyme soit fonctionnelle, cet hétérotrimère doit être assemblé et transloqué dans la membrane du phagosome dans un processus dépendent de la PKC (Olivier, Brownsey et al. 1992; Brown, Stewart et al. 2003). *Leishmania* et plus spécifiquement le LPG est capable d'interférer dans l'assemblage de la NADPH oxydase à la membrane du phagosome (Lodge and Descoteaux 2006; Lodge, Diallo et al. 2006). Plus précisément, le LPG est capable d'exclure les sous-unités p67^{phox} et p47^{phox} des phagosomes qui contiennent des parasites (Lodge, Diallo et al. 2006). Une caractéristique importante de cette inhibition est sa spécificité. Cette spécificité est observable lors de la cophagocytose de *Leishmania* et des globules rouges de mouton opsonisés. Lors de cette cophagocytose, les phagosomes contenant les globules rouges conservent toutes les sous-unités et l'activité NADPH oxydase intacte (Lodge, Diallo et al. 2006) tandis que les phagosomes contenant les parasites présentent une inhibition de la NADPH oxydase.

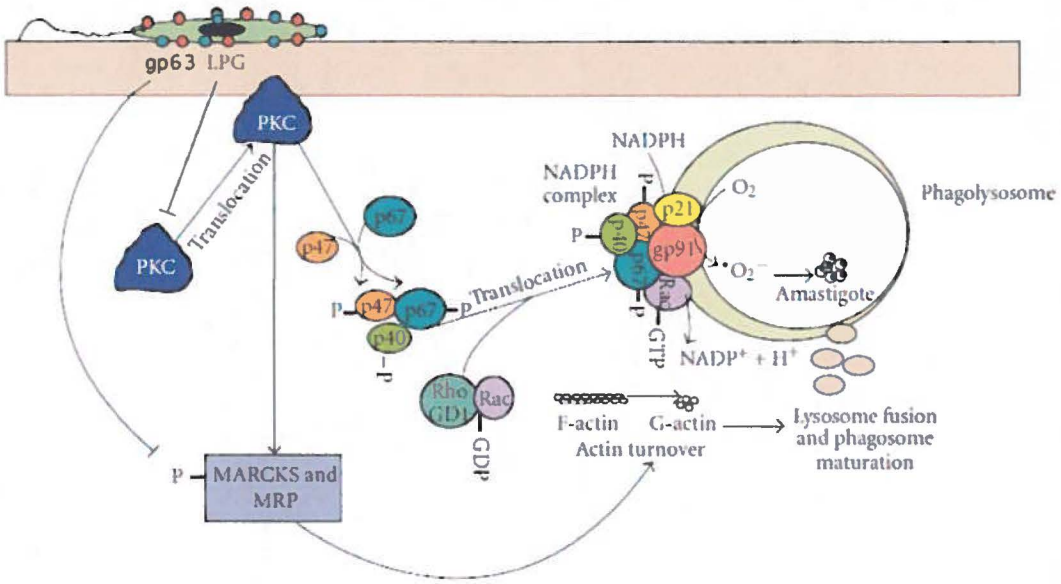


Figure 12. Inhibition de la NADPH oxydase et la fusion des lysosomes au phagosome par *Leishmania*. Le LPG de *Leishmania* est capable d'inhiber l'activation et la translocation de PKC ce qui empêche la formation de l'hétérotrimère p47/p67/p40^{phox}. Cette inhibition empêche l'activation de la NADPH oxydase à la membrane phagosomale. De plus, l'inhibition de PKC va être importante pour la suppression de la dépolymérisation de l'actine autour du phagosome. Le résultat global de cette inhibition de PKC va être l'obtention d'un environnement moins sévère qui permettra une meilleure survie du parasite. Pour sa part, la métalloprotéase GP63 va dégrader MARKS et MRP ce qui empêche la maturation du phagosome (Modifié de (Bhardwaj, Srivastava et al. 2010)).

L'oxyde nitrique (NO) est très importante dans l'élimination de plusieurs micro-organismes, entre autres *Leishmania* (Green, Crawford et al. 1990; Green, Meltzer et al. 1990; Liew, Millott et al. 1990; Liew, Li et al. 1991; Assreuy, Cunha et al. 1994; Wei, Charles et al. 1995; Diefenbach, Schindler et al. 1998; Murray and Nathan 1999; Mukbel, Patten et al. 2007). C'est pour cette raison que plusieurs espèces de *Leishmania* comme *L. donovani, L. amazonensis, L. mexicana* et *L. chagasi* inhibent l'activité iNOS et ainsi assurent leur survie

(Gantt, Goldman et al. 2001; Melby, Tabares et al. 2001; Balestieri, Queiroz et al. 2002; Qadoumi, Becker et al. 2002). Cette inhibition est médiée par la métalloprotéase GP63, cette protéase va activer plusieurs phosphatases comme par exemple SHP-1, PTP1B et TCPTP qui vont inhiber la production de NO (Gomez, Contreras et al. 2009).

De la même façon, la production de ROS est également abolie dans les infections produites par *L. donovani, L. major* et *L. pifanoi* (Buchmuller-Rouiller and Mauel 1987; Olivier, Baimbridge et al. 1992; Olivier, Brownsey et al. 1992; Pham, Mouriz et al. 2005).

4.3.3.2. Exclusion de la pompe à protons V-ATPase dans la maturation des phagosomes

Après la formation du phagosome, celui-ci va interagir avec d'autres compartiments cellulaires comme les endosomes et lysosomes pour finalement devenir un phagolysosome. Dans les dernières étapes de cette maturation, l'intérieur du phagolysosome s'acidifie grâce à la pompe à protons V-ATPase (Beyenbach and Wieczorek 2006) Cela s'additionne à l'effet des hydrolases apportées par les lysosomes menant à un environnent qui dégrade la plupart des particules phagocytées. C'est pour cela que plusieurs parasites intracellulaires ont ciblé cette pompe pour survivre à l'intérieur de ces cellules (Santic, Asare et al. 2008).

Dans le cas de *Leishmania*, il a été décrit que *L. donovani* est capable d'empêcher l'acquisition de la V-ATPase (Vinet, Fukuda et al. 2009). L'exclusion de la V-ATPase est un procès qui est dépendant du LPG à la surface de *Leishmania*. Le LPG va être capable d'affecter le recrutement de la synaptotagmine V (SytV) qui est une molécule importante dans le contrôle de la fusion membranaire lors des premiers stades de la phagocytose et dans la maturation du phagosome (Vinet, Fukuda et al. 2008). L'absence de SytV dans les phagosomes où se trouve *Leishmania,* va empêcher l'acquisition de la pompe à protons v-ATPase ce qui va permettre de conserver un pH moins acide et donc

moins microbicide (Vinet, Fukuda et al. 2009). Par contre, même si l'exclusion de SytV empêche l'acquisition des molécules comme la cathepsine D ou la v-ATPase, l'acquisition d'autres molécules comme EEA1, LAMP1 et cathepsine B n'est pas affectée.

4.3.3.3. Blocage de la présentation antigénique par les molécules de CMH de classe II (CMH II)

Il a été démontré que les macrophages infectés avec *Leishmania* ont une capacité diminuée d'activer les cellules T CD4+ (Prina, Jouanne et al. 1993; Kima, Soong et al. 1996; Courret, Prina et al. 1999; Meier, Svensson et al. 2003). La raison de ce phénomène est le dérèglement de la présentation antigénique par les cellules infectées par *Leishmania* (Kima, Soong et al. 1996; Prina, Lang et al. 1996; Courret, Prina et al. 1999; Gregory and Olivier 2005). Chaque espèce de *Leishmania* bloque la présentation antigénique d'une façon différente. Par exemple, les promastigotes de *L. major* bloquent le chargement des antigènes dans les molécules de CMH II (Fruth, Solioz et al. 1993) et les amastigotes de *L. amazonensis* et *L. mexicana* dégradent les molécules de CMH II (De Souza Leao, Lang et al. 1995; Antoine, Lang et al. 1999). Dans le cas de *L. donovani*, autant l'amastigote que le promastigote empêchent l'expression du CD80, une molécule de costimulation impliquée dans l'activation des cellules T (Kaye, Rogers et al. 1994; Saha, Das et al. 1995). Par ailleurs, le promastigote de cette espèce est capable de perturber la structure des radeaux lipidiques qui sont importants pour la présentation du CMH II dans la membrane plasmique (Chakraborty, Banerjee et al. 2005; Rodgers and Smith 2005).

4.3.3.4. Régulation du système transcriptionnel et traductionnel de la cellule

Il a été démontré que GP63 a une grande influence dans le système transcriptionnel de la cellule. Lors de l'infection, GP63 est responsable du clivage de plusieurs facteurs de transcription comme la sous-unité NF-kB p65 ^{relA} (Gregory, Godbout et al. 2008; Olivier, Atayde et al. 2012), ce qui inhibe la production de l'IL-12 et NO, et la sous-unité c-Jun qui fait partie du facteur de transcription AP-1 (Contreras, Gomez et al. 2010; Olivier, Atayde et al. 2012) responsable aussi entre autres de la production de NO. De plus, la GP63 est responsable de la dégradation de mTOR (Jaramillo, Gomez et al. 2011). Cette dégradation inhibe la traduction des ARN messagers par une déphosphorylation de 4E-BP1 ce qui va empêcher la production de IFNα/β.

4.3.3.5. Régulation de la production de cytokines

Leishmania infecte les macrophages d'une façon silencieuse afin de ne pas être éliminé. Tel qu'expliqué dans la section 4.3.3.4, l'infection par *Leishmania* a un impact important sur le système traductionnel de la cellule ce qui affecte la production des cytokines. Il a été prouvé que *Leishmania* est capable de réguler la production de cytokines de la cellule parasitée à son avantage. De cette façon, *Leishmania* prévient la production des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF, l'IL-12 et l'IL-1β (Reiner 1987; Descoteaux and Matlashewski 1989; Reiner, Ng et al. 1990; Carrera, Gazzinelli et al. 1996; Hatzigeorgiou, Geng et al. 1996; Belkaid, Butcher et al. 1998; Weinheber, Wolfram et al. 1998; Piedrafita, Proudfoot et al. 1999; Ponte-Sucre, Heise et al. 2001). Dans le même sens, il induit la production et la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, l'IL-4 et le TGF-β (Chatelain, Varkila et al. 1992; Kopf, Brombacher et al. 1996; Bogdan and Rollinghoff 1998; Rodrigues, Santana da Silva et al. 1998; Kane and Mosser 2001). Cette régulation de la production de cytokines lors de l'infection permettra l'établissement du parasite dans les macrophages.

4.3.4. Inhibition des voies de signalisation de MAPKs et JAK/STAT

Plusieurs voies de signalisation sont altérées par *Leishmania* dans le macrophage. Ces altérations vont mener dans certains cas à l'induction ou l'inhibition de la sécrétion de plusieurs cytokines, l'inhibition de la production de NO, etcetera. *Leishmania* peut contrôler les voies de signalisation du macrophage infecté en agissant au niveau transcriptionnel (chapitre 4.3.3.4), mais aussi elle peut agir plus tôt dans ces voies.

Une des voies affectées par l'infection de *Leishmania* est la voie des MAPK (Figure 13). L'activation d'ERK, JNK et p38 va être déclenchée lors de l'activation cellulaire par des facteurs de croissance et mitogéniques, un choc osmotique, du stress, le TNF, l'IL-1β ou le LPS (Raingeaud, Gupta et al. 1995; Paul, Wilson et al. 1997; Ono and Han 2000). L'infection par *Leishmania* a des conséquences importantes dans l'activation des MAPKs. Le LPG et la métalloprotéase GP63 présentes chez *Leishmania* sont responsables de l'inactivation d'ERK, p38 et JNK de la même façon que de la dégradation d'IκB-α ce qui va mener a l'inhibition de la production du iNOS et IL-12 (Prive and Descoteaux 2000; Halle, Gomez et al. 2009). Il a été aussi décrit une dégradation par GP63 de TAB-1, un modulateur de p38 dans la voie de MAPKs, ce qui empêche l'activation de cette voie chez les fibroblastes (Halle, Gomez et al. 2009). Une autre molécule inactivée par la protéolyse de GP63 est la protéine p130cas (Halle, Gomez et al. 2009), un substrat de PTP-PEST qui va être important dans le contrôle du cytosquelette et responsable de l'activation de JNK et ERK1/2 (Kyaw, Yoshizumi et al. 2004; Stuart, Bell et al. 2007).

Une autre voie de signalisation où la présence de *Leishmania* a un impact important est la réponse à l'IFN-γ (Figure 13). Le bon fonctionnement de la voie de signalisation activée par l'IFN-γ est très important pour que le macrophage puisse éliminer le parasite (Murray, Masur et al. 1982; Belosevic, Finbloom et al. 1989). Lors de l'infection par *Leishmania*, le parasite peut affecter cette voie de signalisation de différentes façons, par exemple, au niveau de la transduction du signal, de la transcription et de la synthèse des protéines (Rodriguez, Chang et al. 2004; Dogra, Warburton et al. 2007). De cette façon, il peut inhiber l'expression de protéines et complexes protéiques très importants pour la

défense cellulaire comme l'IFNγRαβ, le CMH II et iNOS (Reiner, Ng et al. 1987; Reiner, Ng et al. 1988; Nandan, Lo et al. 1999; Ray, Gam et al. 2000; De Almeida, Cardoso et al. 2003; Bhardwaj, Rosas et al. 2005).

Dans la voie de signalisation de l'IFN-γ, l'un des systèmes protéiques qui a une importance capitale pour la transmission du signal est le système JAK/STAT (Igarashi, Garotta et al. 1994; Sakatsume, Igarashi et al. 1995). Il a été démontré que ce système est inhibé de plusieurs façons par *Leishmania*. Le parasite est capable d'inhiber l'expression des protéines JAK1 et JAK2 (Bhardwaj, Rosas et al. 2005) et de dégrader ou inhiber la translocation de STAT1 (Forget, Gregory et al. 2005; Matte and Descoteaux 2010).

De plus, *Leishmania* empêche la phosphorylation de plusieures proteines tels que JAK1, JAK2, STAT1 (Blanchette, Racette et al. 1999; Nandan, Lo et al. 1999; Xin, Li et al. 2008), nécessaires pour la transmission du signal. Cette inhibition est médiée par des phosphatases qui sont activées par la métalloprotéase GP63 de *Leishmania* (Blanchette, Racette et al. 1999; Forget, Siminovitch et al. 2001; Gomez and Olivier 2010). Parmi ces phosphatases clivées/activées, on retrouve SHP-1 (Gomez, Contreras et al. 2009), qui est responsable de la régulation de MAPKs, IRAK-1, et JAK/STAT (Blanchette, Racette et al. 1999; Forget, Gregory et al. 2006; Abu-Dayyeh, Shio et al. 2008). Les phosphatases PTP1B et TCPTP vont être de la même façon clivées/activées (Gomez, Contreras et al. 2009). Ces phosphatases, comme SHP-1, vont être importantes dans la régulation de MAPKs et JAK/STAT (Myers, Andersen et al. 2001; Simoncic, Lee-Loy et al. 2002; van Vliet, Bukczynska et al. 2005). De par l'implication de ces phosphatases dans la régulation de plusieurs voies de signalisation qui vont mener à l'inhibition de la production de NO, l'importance de l'activation de ces phosphatases pour l'établissement de l'infection n'est pas en doute. Par exemple, lors de l'infection de souris déficientes pour PTP1B, un délai dans l'établissement et la progression de l'infection est observé en plus d'une charge parasitaire moins importante dans les premières étapes de la maladie (Gomez, Contreras et al. 2009) .

Bien que GP63 soit responsable du clivage/activation de SHP-1, TCPTP et PTP1B, la distribution des phosphatases ne semble pas être modifiée à l'exception de celle de SHP-1 (Gomez, Contreras et al. 2009).

D'autres implications de *Leishmania* dans la signalisation cellulaire du macrophage sont par exemple l'induction du régulateur négatif de la voie de l'interféron, SOCS3 (Bertholet, Dickensheets et al. 2003; de Veer, Curtis et al. 2003) ou la modulation de MyD88 et IRAK-1 dans l'activation des voies TLR (Abu-Dayyeh, Shio et al. 2008; Bhardwaj, Srivastava et al. 2010). Également l'infection par *Leishmania* va induire une augmentation des céramides intracellulaires (Ghosh, Bhattacharyya et al. 2001), cette augmentation va mener à l'activation de la phosphatase PP2A (Hannun and Obeid 1995; Hannun 1996; Mathias, Pena et al. 1998) ce qui va inhiber PKC et AKT (Hannun and Obeid 1995; Hannun 1996; Saba, Obeid et al. 1996; Mathias, Pena et al. 1998; Abu-Dayyeh, Shio et al. 2008).

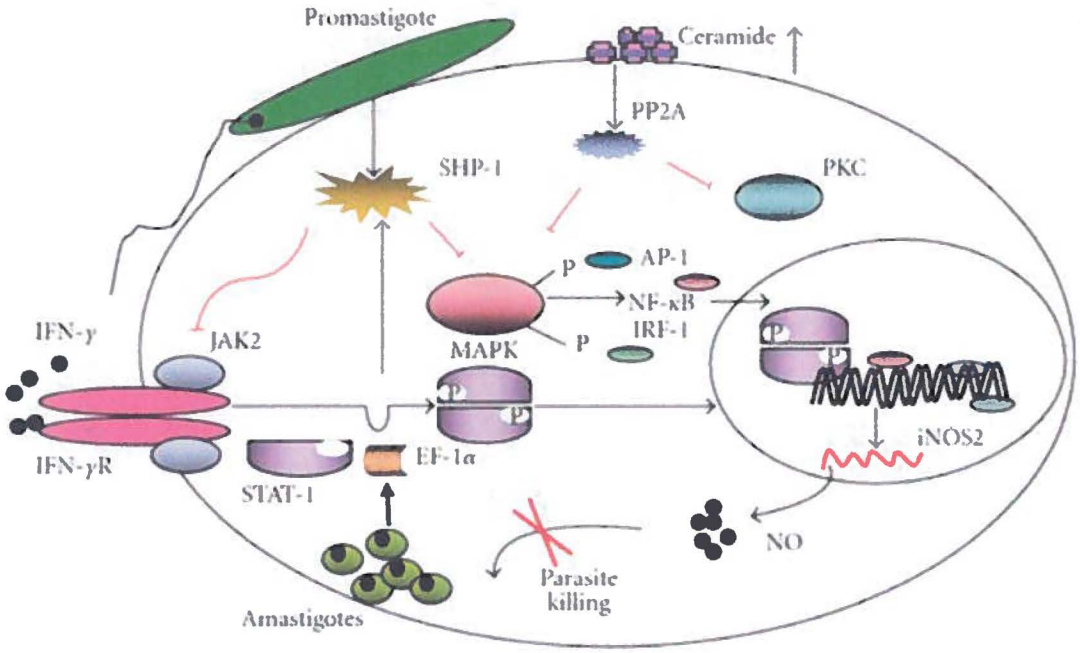


Figure 13. Influence de *Leishmania* dans plusieurs voies de signalisation chez le macrophage. *Leishmania* inhibe la phosphorylation de plusieurs protéines comme les membres de la famille MAPK: ERK1/2, p38, et JNK. De la même façon, la voie de l'interféron est fortement affectée par cette infection. Ces dérèglements empêchent le macrophage de développer une réponse microbicide optimale permettent ainsi à *Leishmania* de se développer (Bhardwaj, Srivastava et al. 2010).

ARTICLE

Participation des auteurs

Héctor Álvarez de Celis, premier auteur de l'article intitulé « **Dok proteins are recruited to the phagosome and cleaved by the protease GP63 after *Leishmania major* infection** » a effectué toutes les expériences ayant mené aux résultats rapportés dans l'article à l'exception de la figure 3c et il a participé à la rédaction du manuscrit.

Carolina Plazas Gomez, étudiante au doctorat dans le laboratoire du Dr Albert Descoteaux avec lequel nous avons entrepris une collaboration, a realisé l'expérience qui a mené au résultat montré dans la figure 3c de l'article.

Le Dr Albert Descoteaux a participé à la correction du manuscrit.

La Dr Pascale Duplay a supervisé le projet et a participé à la rédaction et correction du manuscrit.

Dok proteins are recruited to the phagosome and cleaved by the protease GP63 during *Leishmania major* infection

Hector Alvarez De Celis, Carolina P. Gomez, Albert Descoteaux and Pascale Duplay#

Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC H7V 1B7 Canada

To whom correspondence should be addressed: Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada

Tel : (450) 687 5010; Fax : (450) 686 5301 E-mail: pascale.duplay@iaf.inrs.ca

Running title: Dok recruitment to phagosomes and cleavage by GP63

Abstract

Three adaptor molecules of the Dok family, Dok-1, Dok-2 and Dok-3 are expressed in macrophages and are involved in the negative regulation of signaling in response to lipopolysaccharide (LPS) and various cytokines and growth factors. We investigated the role and the fate of those Dok proteins during FcR-dependent phagocytosis and following infection with *Leishmania major* promastigotes in macrophages. The protozoan parasite *L. major* causes cutaneous leishmaniasis and is renowned for its capacity to alter host-cell signaling and function. Dok-1/Dok-2-/- bone marrow-derived macrophages (BMM) displayed normal phagocytosis of IgG-coated beads and entry of *L. major* promastigotes. Moreover, activation of ERK1/2 and Akt induced upon internalization of the parasites or after stimulation via FcR was independent of Dok-1 and Dok-2. We next showed that Dok proteins were recruited to phagosomes containing latex beads and that Dok remained associated to phagosomes during the maturation process. By contrast, Dok-1 was absent from phagosomes containing *Leishmania* promastigotes. However, in the absence of the *Leishmania* pathogenecity-associated metalloprotease GP63, Dok-1 was recruited to phagosomes containing *L. major* promastigotes. Further biochemical analysis revealed that similar to Dok-1, Dok-2 and Dok-3 were substrates of GP63. Moreover, we showed that production of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor (TNF) by gamma-interferon (IFN-γ)-primed *Dok-1/Dok-2-/-* macrophages upon infection with wild type (WT) or *Δgp63 L. major* promastigotes was reduced compared to WT macrophages. These results suggest that Dok

proteins may be important regulators of macrophage responses to *Leishmania* infection.

Introduction

Phagocytosis is initiated through the activation of one or more receptors expressed on the surface of macrophages following the binding of ligands exposed on the particle surface. This process involves a complex series of events, initiated by receptor clustering, which causes the activation of multiple intracellular signaling cascades. These events lead to membrane and cytoskeletal rearrangements and to the internalization of the particle into an intracellular compartment, the phagosome (Underhill and Goodridge 2012). Among the signaling pathways involved in the control of phagocytosis, the FcγR-mediated pathway is the best studied (reviewed in Garcia-Garcia and Rosales 2002). Although the initial activation events in FcγR signaling are well understood, how tyrosine kinase-mediated events couple to downstream pathways involved in phagocytosis remains to be fully elucidated.

Dok are adaptor proteins involved in signaling downstream of tyrosine kinases. The Dok family members contain a pleckstrin homology (PH) domain, a phosphotyrosine binding (PTB) domain, and a COOH-terminal region containing multiple tyrosine phosphorylation sites and PXXP motifs which serve as potential docking sites for SH2- and SH3-domain containing proteins, respectively, (reviewed in Mashima, Hishida et al. 2009). Dok-1, Dok-2, and Dok-3, the three members of Dok family proteins expressed in myeloid cells, are involved in the negative regulation of the responses downstream a variety of receptors. The current model for Dok-mediated inhibition of signaling proposes that upon tyrosine phosphorylation elicited by receptor stimulation, Dok proteins are recruited to the plasma membrane in a PH domain-dependent manner, where

they recruit inhibitory effector molecules (Zhao, Schmitz et al. 2001). Dok-1 and Dok-2, the two family members with highest homology, exhibit functional redundancy, whereas Dok-3 presents structural and functional differences with Dok-1 and Dok-2 isoforms (Mashima, Hishida et al. 2009). Dok-1, Dok-2, and Dok-3 seem to cooperatively regulate several macrophage responses. Indeed, Dok-3 has been reported to play a non redundant role compared to Dok-1 and Dok-2 in the suppression of macrophage proliferation and in the inhibition of LPS-induced responses (Niki, Di Cristofano et al. 2004; Yasuda, Shirakata et al. 2004; Shinohara, Inoue et al. 2005; Mashima, Honda et al. 2010; Peng, O'Loughlin et al. 2012). Moreover, the three Dok proteins are involved, although by different mechanisms, in the inhibition of the Ras/MAPK signaling pathway (Carpino, Wisniewski et al. 1997; Di Cristofano, Carpino et al. 1998; Di Cristofano, Niki et al. 2001; Honma, Higuchi et al. 2006).

One of the most important event for phagocytic ingestion and phagosomal maturation involves actin remodeling (May and Machesky 2001). Both Dok-1 and Dok-2 have docking sites for signaling molecules that have been implicated in the regulation of the actin-cytoskeletal reorganization such as Nck, Crk-L and Cas (Martelli, Boomer et al. 2001; Wick, Dong et al. 2001; Gugasyan, Quilici et al. 2002; Abramson, Rozenblum et al. 2003). Hence, Dok proteins might participate in the actin assembly process triggered by FcγR crosslinking during phagocytosis in macrophages. Consistent with the involvement of Dok in phagocytosis, Dok-3 has been shown to undergo rapid tyrosine phosphorylation in response to engagement of FcγRI (Lemay, Davidson et al. 2000) and we recently found that Dok-1 is recruited to the phagosome (Gomez, Tiemi Shio et al. 2012).

The protozoan parasite *Leishmania* is the causative agent of a leishmaniases, a sprectrum of human pathologies ranging from self-healing cutaneous lesions to fatal visceral infections when left untreated. *Leishmania* exists under two distinct developmental forms. Promastigotes are inoculated into the mammalian host by infected sand flies and are phagocytosed by macrophages. There, promastigotes differentiate into amastigotes that replicate inside phagolysosomes. However, promastigotes must first avoid being killed by the antimicrobial activities of macrophages. One mechanism used by promastigotes to evade the microbicidal consequences of phagocytosis is the inhibition of phagosolysosome biogenesis (Desjardins and Descoteaux 1997; Moradin and Descoteaux 2012). In addition, *Leishmania*-infected macrophages are characterized by an impaired responsiveness to various activating signals (Reiner, Ng et al. 1987; Reiner, Ng et al. 1988; Descoteaux and Matlashewski 1989; Descoteaux, Matlashewski et al. 1992; Nandan and Reiner 1995; Blanchette, Racette et al. 1999; Abu-Dayyeh, Hassani et al. 2010; Matte and Descoteaux 2010). Work by Olivier and colleagues revealed that the glycosylphosphatidylinositol-anchored metalloprotease GP63 plays a key role in the ability of promastigotes to alter the host cell signal transduction machinery by cleaving various signaling molecules (Isnard, Shio et al. 2012).

In this study, we investigated whether Dok proteins are downstream mediators of the FcγR-mediated responses in BMM. Moreover, we characterized the involvement of Dok in the phagocytosis of *L. major* promastigotes and in the host response to the parasite infection.

Materials and methods

Parasites

WT and GP63-deficient (*Δgp63*) *Leishmania major* (Seidman clone A2) (Joshi, Kelly et al. 2002) were kindly provided by Dr W. R. McMaster. Promastigotes were grown at 26°C in M199 medium supplemented with 20% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 μM hypoxanthine, 40 mM HEPES, 5 μM hemin, 3 μM biopterin, 1 μM biotin and antibiotics (*Leishmania* medium). For infections, promastigotes were used in the late stationary phase of growth as described (Vinet, Fukuda et al. 2009).

Mice

129/Sv *Dok-1*$^{-/-}$ *Dok-2*$^{-/-}$ mice were previously described (Niki, Di Cristofano et al. 2004). 129/Sv mice were obtained from the Jackson Laboratories. Three to 4-wk-old mice were used in this study. All mice were maintained in our pathogen-free animal facilities (Institut Armand-Frappier, Laval, Canada).

Antibodies and reagents

Antibodies directed against the C-terminal region and PTB domain of murine Dok-1 were produced in rabbits using a gluthatione S-transferase (GST) fusion protein encompassing aa 252–482 and aa 138-296 of murine Dok-1 respectively. Anti-Dok-1 antibodies were adsorbed on GST-sepharose 4B beads and anti-Dok-1 antibodies were immunoaffinity purified on GST/Dok-1 fusion protein coupled to sepharose beads as described (Beattie, Volsen et al. 1997). Anti-Dok3 antibodies (kindly provided by A. Veillette) have been described (Lemay, Davidson et al. 2000). Anti- ERK1/2, anti-phosphoERK1/2 (Thr202/Tyr204), anti-Akt, anti-

phophoAkt and anti-Dok-2 Tyr351 were from Cell Signaling Technology. Anti-β actin antibodies were from Sigma-Aldrich. The anti-lipophosphoglycan monoclonal antibody (CA7AE) was from Cedarlane. For cytometry analysis, the following antibodies were used: anti-F4/80 Fluorescein isothiocyanate (FITC) (AbD Serotec), anti-CD44 PE (ebioscience); anti-Gr1 Biotin (ebioscience), anti-Mac-1 FITC , anti-CD80 PE (ebioscience), 2.4G2 FITC and streptavidin-PercP (BD Bioscience).

BMM preparation

BMM were obtained by extracting the femurs and tibias from 3- to 4-wk-old female mice as described previously (Vinet, Fukuda et al. 2009). Briefly, cells were grown at 37°C for 24 h in 5% CO_2 in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with l-glutamine supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 10 mM HEPES (pH 7.4), and antibiotics in the presence of 15% (v/v) L929 cell-conditioned medium as a source of colony-stimulating factor-1. Non adherent cells are transferred to new plates for 7 days. For 18 h prior to activation, macrophages were made quiescent by culturing them in the absence of L929 cell-conditioned medium.

Flow cytometry

Cells were washed twice with fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (phosphate-buffered saline (PBS) + 1% FBS + 0.01% NaN_3) and stained with the antibodies. Viable cells were acquired on a FACSCalibur cytometer (Becton

Dickinson) and FACS analysis was performed using CellQuest software or FCS Express software (De Novo software).

Confocal Microscopy and immunofluorescence

To synchronize phagocytosis assays, macrophages were incubated with particles (beads or parasites) at a particle-to-cell ratio of 15:1 for 10 min at 4°C and 10 min at 37°C. Excess particles were removed by several thorough washes with DMEM and phagocytosis was triggered by transferring the cells to 37°C for the indicated time points before processing for microscopy. Macrophages were fixed, permeabilized using 0.1% Triton X-100, and non-specific surface. FcγR binding were blocked using 1% bovine serum albumin (BSA), 2% goat serum, 6% milk, and 50% FBS. For immunostaining, cells were labelled with the appropriate combinations of antibodies and secondary antibodies (anti-rabbit Alexa Fluor 488 or anti-mouse Alexa Fluor 568 conjugates, Molecular Probes). DRAQ5 (Biostatus) was used to visualize cells nuclei. All coverslips were mounted on slides with Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates). Detailed analysis of protein presence and localization on the phagosome was performed using an oil immersion Nikon Plan Apo 100 (N.A. 1.4) objective mounted on a Nikon Eclipse E800 microscope equipped with a Bio-Rad Radiance 2000 confocal Imaging system (Bio-Rad, Zeiss). Images were obtained using appropriate filters with a Kalman filter of at least 3.

Phagosome preparation and isolation

Phagosomes were isolated from immortalized BMM (LM-1) as previously described (Gomez, Tiemi Shio et al. 2012). Briefly, Adherent macrophages were incubated with magnetic beads 3 μm (Spherotech) at 37°C for 1, 2 or 4 h. Cells were lysed and phagosomes were isolated using magnets.

Phagocytosis assays

Red fluorescent polystyrene beads (3.0 μm, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) were incubated in 10 μg/ml BSA in PBS overnight at 4°C. The beads were then washed 2 times in PBS and resuspended in PBS. Rabbit anti-BSA antibodies (Sigma-Aldrich), were added to a final dilution of 5 μg/ml and incubated for 1 h at room temperature. The beads were then washed 2 times in DMEM and used immediately. Macrophages were plated in 6-cm dishes at $2x10^6$ cells/well. Media was changed to serum-free media prior to adding the beads. Opsonized beads (15 beads/macrophage) were added to macrophages and incubated at 37°C in 5% CO_2 for the indicated time points. Cells were washed with ice-cold PBS and were detached with trysin/ EDTA 5 min at 37°C. Harvested cells were washed 2 times with FACS buffer and analyzed by flow cytometry.

L. major promastigotes were opsonized with mouse serum depleted of C5. IFN-γ primed BMM were incubated with promastigotes at ratio of 15:1 for the indicated time points at 37°C. Excess parasites were removed with ice-cold PBS. Cells were stained with Wright-Giemsa (*HEMA 3*, Fisher Scientific Co) and processed for microscopy to quantify parasite internalization. Results are based on at least 100 cells chosen by blinded scoring in triplicates.

Nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor (TNF) measurements

Adherent BMM (3 x 10^5 /well in 24 wells plate) were stimulated with IFN-γ 100 U/ml for 18 h. Cells were washed twice and infected with *L. major* promastigotes at a parasite to macrophage ratio of 15 : 1. Supernatants were harvested after 24 h of culture. TNF production was evaluated **using a mouse *TNF ELISA* kit** (ebiosciences). Levels of NO were measured as the nitrite concentration by mixing equal volumes of culture supernatants (100 µl) and Griess reagent (Green, Meltzer et al. 1990). Nitrite concentrations were determined by comparing the absorbance values of the test samples with a standard curve generated by serial dilution of 200 µM sodium nitrite.

Cell stimulation and Western blot analysis

BMM grown on 6-cm dishes were washed twice with DMEM and incubated at 37°C for 2 h. Cells were incubated at 4°C with 2.4 G2 antibodies at 10 µg/ml for 10 min. Cells were washed and after addition of goat anti-rat IgG antibodies, cells were incubated at 37°C. Alternatively, cells were incubated with IgG-opsonized sheep red blood cells (SRBC) (IgG-SRBC) that were prepared as described (Breton and Descoteaux 2000). For *Leishmania* infection, IFN-γ primed BMM were infected with parasites at a particle-to cell ratio of 15:1. After the indicated time at 37°C, cells were washed twice with ice-cold DMEM and lyzed with 1% Nonidet P-40 containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, and 1 mM EGTA in the presence of inhibitors of proteases and phosphatases (10

μg/ml leupeptin and aprotinin, 1 mM Pefabloc-sc, 50 mM NaF, 10 mM $Na_4P_2O_7$, 1 mM Na_3VO_4). Immunoblotting was performed, as described previously (Nemorin and Duplay 2000). For λ protein phosphatase treatment (New England Biolabs), cell extracts were prepared without phosphatase inhibitors and 800 unit of phosphatase was added to 1 μg of extract for 1h at 30°C in presence of MnCl2.

Statistical Analysis

An unpaired T-Test was performed using GraphPad software to asses whether the differences between control and infected groups were significant or not. P values < 0.05 were considered significant.

Results

Dok-1 and Dok-2 do not modulate FcγR-mediated phagocytosis or *Leishmania* internalization

Dok-1 and Dok-2 control several responses of macrophages through the negative regulation of ERK1/2 (Mashima, Hishida et al. 2009). Given that activation of ERK1/2 is essential for FcγR-mediated phagocytosis, we hypothesized that Dok-1 and Dok-2 may negatively regulate this process. To examine whether FcγR-mediated phagocytosis is influenced by Dok-1 and Dok-2, we studied the capacity of Dok-1/Dok-2-deficient BMM to internalize IgG-coated latex beads. Phagocytosis was evaluated using fluorescent latex beads and flow cytometry (Fig. 1A-B). The proportions of phagocytic cells containing one, two or more beads, were identical for WT and *Dok-1/Dok-2*$^{-/-}$ BMM at each time point tested (Fig. 1A-B). It is important to note that, in the absence of Dok-1 and Dok-2, macrophages from BM developed normally under the influence of L929 cell-conditioned media since similar numbers of BMM were recovered from WT and Dok-1/Dok-2-deficient mice and the cell surface expression of CD11b, CD32/16, CD44, F4/80 and CD80 were identical (Fig. S1). Together these results indicate that Dok-1 and Dok-2 do not modulate the phagocytic capacity of macrophages initiated through FcγR. In agreement with this hypothesis, we found that ERK1/2 and Akt activation induced by FcγR ligation with antibodies directed against CD32/16 (2.4G2) or with IgG-opsonized sheep erythrocytes were similar in BMM from WT and *Dok-1/Dok-2*$^{-/-}$ mice (Fig. 1C-D). We next asked whether phagocytosis mediated through other receptors than FcγR may be controlled by Dok-1 and Dok-2. To this end, we used *Leishmania major* promastigotes that had

been opsonized with normal mouse serum to infect IFN-γ-primed BMM from WT and *Dok1/Dok2*$^{-/-}$ mice. In these conditions, the predominant receptors that mediate the entry of *Leishmania* promastigotes are the mannose receptor and the complement receptor CR1 and CR3 (reviewed in Ueno and Wilson 2012). No differences in the number of internalized parasites was observed in WT and *Dok1/Dok2*$^{-/-}$ BMM (Fig. 2A). Entry of *L. major* promastigotes in IFNγ-primed BMM induced the activation of Akt and ERK1/2 (Fig. 2B). However, activation of ERK1/2 and Akt induced following the entry of the parasites was not modulated by Dok-1 and Dok-2 proteins (Fig. 2B). These results indicate that Dok-1 and Dok-2 are not required for the internalization of *L. major* promastigotes in BMM. Collectively, our data show that Dok-1 and Dok-2 are dispensable for the uptake of particles by macrophages.

Dok proteins are recruited to the phagosomes

We previously identified Dok-1 as a component of the latex beads-containing phagosomes in a macrophage cell line (Gomez, Tiemi Shio et al. 2012). In order to investigate whether the other members of the Dok family also associate with phagosomes, we performed confocal microscopy and cellular fractionation to localize Dok-1, Dok-2, and Dok-3 during the phagocytosis of latex beads in BMM. As shown in Figure 3A, Dok-1 is distributed throughout the cytoplasm, and in few areas near the plasma membrane. Only background staining was visible in Dok-1/Dok-2-deficient BMM, used as a negative control for the anti-Dok-1 antibody (Fig. 3A). Similar to Dok-1, Dok-3 had a diffuse cytoplasmic localization in the cytoplasm (Fig. 3B). After 10 min of phagocytosis of latex beads, Dok-1 was enriched in the phagosomal membrane (Fig. 3A). Similarly, Dok-3 rapidly

translocated and concentrated around phagosomes (Fig. 3B). The maximal association occurred after 30 min where 60 % and 70 % of the phagosomes were positive for Dok-1 and Dok-3 respectively (data not shown and Fig. 3A-B). Dok proteins remained stably associated with latex-beads phagosomes for at least 3 h (Fig. 3A-B). The antibodies against Dok-2 that were available did not allow the specific detection of Dok-2 by confocal microscopy. To further analyze the association of Dok proteins to the phagosome, we purified phagosomal extracts at different time points after initiation of phagocytosis and performed Western blot analysis with anti-Dok-1, Dok-2, and Dok-3 antibodies. As shown in Figure 3C, Dok-1, Dok-2 and Dok-3 followed a similar kinetic of recruitment to the latex beads-containing phagosomes. Of note, only the slow-migrating band of Dok-3, likely corresponding to the phosphorylated form, was associated with the phagosomal fraction. Altogether, these data demonstrate that the 3 members of the Dok family expressed in macrophages, Dok-1, Dok-2, and Dok-3, are recruited early to phagosomes and remain present throughout the maturation process.

Dok proteins are cleaved by the metalloprotease GP63 during *Leishmania major* infection

One mechanism used by *Leishmania* promastigote to evade the microbicidal function of phagocytosis is to inhibit phagolysosome biogenesis by remodeling the phagosomal compartments (Moradin and Descoteaux 2012). We therefore analyzed whether Dok proteins are recruited to the phagosome during *Leishmania* infection and are targets of *Leishmania* evasion strategy. Surprisingly, following *Leishmania* infection Dok-1 was barely detectable by confocal

microscopy (Fig. 4A). The decrease of Dok-1 expression levels occured as early as 10 min following *Leishmania* infection. GP63, an abundant surface metalloprotease of *Leishmania*, has been shown to cleave several molecules involved in the regulation of various signaling pathways of the macrophage (Gomez, Contreras et al. 2009; Halle, Gomez et al. 2009; Olivier, Atayde et al. 2012). To determine whether Dok-1 was degraded by GP63, we infected BMM with *Δgp63 L. major* promastigotes. The levels of Dok-1 expression remained stable upon infection with *Δgp63 Leishmania*. Moreover, as shown for latex beads-containing phagosomes, Dok-1 was recruited to phagosomes containing *Δgp63 L. major* at 10 min following infection and remained associated to the phagosome for up to 1 h following infection (Fig. 4B). This result indicates that absence of Dok-1 from phagosomes containing *L. major* promastigotes is caused by its degradation by GP63. To analyze whether Dok-2 and Dok-3 are also substrates of GP63, we performed Western blot analysis following infection with WT or *Δgp63 L. major* promastigotes. As shown in Figure 4C-D, the bulk of Dok-1 and Dok-2 was cleaved by when GP63 was present after 15 min of infection. A Dok-1 cleavage product of 40 kDa, that was detected by antibodies directed against the PTB domain of Dok-1, accumulated as infection progressed. It should be noted that the C-terminal end of Dok-1 encompassing amino-acids residues 252-482 was almost completely degraded following *Leishmania* infection since Dok-1 was only faintly detected by confocal microscopy using antibodies directed against this C-terminal region of Dok-1. Infection by *Δgp63* promastigotes caused a clear retardation in the electrophoretic mobility of Dok-3 (Fig. 4E). The mobility shift was likely due to serine/threonine phosphorylation and tyrosine phosphorylation since it was abolished by *treatment with lambda protein*

phosphatase, a Ser/Thr and Tyr phosphatase and only partially with Tyr or Thr/Ser protein phosphatase (data not shown and Fig. 4E). After phosphatase treatment, it is clear that Dok-3 is cleaved during infection with WT but not with *Δgp63 L. major*. These results demonstrate that Dok-1, Dok-2, and Dok-3 are cleaved in a GP63-dependent manner during *Leishmania* infection.

Previous studies revealed that Dok-1 and Dok-2 negatively regulate TNF and NO release in LPS-treated macrophages (Shinohara, Inoue et al. 2005). To investigate whether GP63-dependent cleavage of Dok has an impact on macrophage responses to *Leishmania*, we compared NO and TNF production by control and *Dok-1/Dok-2*$^{-/-}$ IFN-γ-primed BMM upon infection with WT or *Δgp63 L. major* promastigotes. As previously reported NO and TNF production in response to LPS was increased in Dok-1/Dok-2-deficient BMM (Fig. 5A). Surprisingly, Dok-1 and Dok-2 positively regulated TNF and NO production induced by *Leishmania* infection (Fig. 5A-B). However, Dok-mediated upregulation of NO and TNF responses in response to *Leishmania* infection was independent of GP63 (Fig. 5A-B).

Discussion

Dok-1, Dok-2 and Dok-3, the three Dok proteins expressed in myeloid cells, are essential for myeloid homeostasis and are key modulators of cytokines and LPS responses through negative regulation of ERK1/2 signaling (Shinohara, Inoue et al. 2005). In this study, we analyzed the involvement of Dok proteins in the regulation of phagocytosis in BMM. Surprisingly, Dok-1 and Dok-2 do not modulate the activation of ERK1/2 induced by FcγR signaling or by *Leishmania* entry in macrophages. Moreover, phagocytosis of IgG-coated beads in *Dok1/Dok2*$^{-/-}$ BMM was completely normal. This finding is consistent with the intact FcγR signaling observed in *Dok1/Dok2*$^{-/-}$ cells. A potential explanation for this finding is that Dok-3 or another molecule in macrophages functionally compensates for the lack of Dok-1/Dok-2.

Our observation that the three Dok proteins localize to nascent phagosomes formed around latex beads suggests that Dok are involved in the signaling pathway(s) leading to particule internalization. Phosphorylation of Dok-3 following FcγR engagement is in agreement with this hypothesis (Lemay, Davidson et al. 2000). Moreover, infection with *Δgp63 Leishmania* promastigotes, also leads to the recruitment of Dok proteins to the phagosome indicating that the signals that target Dok to the membrane might be delivered by various phagocytic receptors including the mannose receptor and the complement receptor CR1 and CR3. Dok-1 and Dok-2 PH domains bind *in vitro* to mono phosphoinositide species, mainly phosphatidylinositol 5-phosphate (PI5P) and 4-phosphate and to polyphosphoinositide species including phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate,

3,4-diphosphate and 4,5-diphosphate albeit with less affinity (Zhao, Schmitz et al. 2001; Guittard, Gerard et al. 2009). These phospholipids are present in the membrane at different time points during phagosomal maturation and might provide anchoring sites for Dok proteins at the phagosome (Yeung and Grinstein 2007). Interestingly, PI5P which binds to Dok PH domain with the highest affinity is potentially generated at the late phagosome maturation stage (Yeung and Grinstein 2007).

Tyrosine kinases present at the phagosomal membrane such as Abl and Fyn (Trost, English et al. 2009) might phosphorylate Dok proteins, creating binding sites for SH2-containing proteins. Dok binding partners that are recruited to the nascent phagosome might be involved in different aspects of the phagocytotic process, such as cytoskeletal remodeling, fission, or phagosomal maturation. In particular, SHIP recruitment to the phagosome might be, at least in part, mediated by Dok proteins since the three Dok-1, Dok-2 and Dok-3 have been shown to bind SHIP-1 after FcR signaling (Ott, Tamir et al. 2002; Kepley, Taghavi et al. 2004; Robson, Davidson et al. 2004). Therefore we propose that membrane localization of Dok proteins following phagocytosis allows the docking of signaling molecules at the phagosome. Additional work will be required to determine which binding partners play a role in Dok-mediated signaling at the phagosome and the consequence of this interaction on phagosome function.

The three Dok proteins are *in vivo* targets of the GP63 protease. GP63 is a virulence factor (Joshi, Kelly et al. 2002) that cleaves several host molecules to modulate macrophage responses to infection. These include signaling molecules,

transcription factors, and components of the macrophage translation machinery (Corradin, Ransijn et al. 1999; Gomez, Contreras et al. 2009; Halle, Gomez et al. 2009; Contreras, Gomez et al. 2010; Jaramillo, Gomez et al. 2011). The mechanism by which GP63 accesses and cleaves host cell substrates remains to be elucidated. The observation that GP63 is present in exosomes released by *Leishmania* suggests a potential mechanism for the transport of this protease from the phagosome to the host cell cytoplasm (Silverman, Clos et al. 2010). This scenario is in agreement with the ability of this protease to degrade host molecules outside the parasitophorous vacuoles. Indeed, previous studies indicated that GP63 exits the phagosome and colocalizes with macrophage membrane microdomains (Gomez, Contreras et al. 2009) thereby giving access to various host cell substrates. In the case of Dok proteins, their recruitment to membranes through their PH domain may facilitate their cleavage by GP63.

The determination of the potential cleavage sites (Bouvier, Schneider et al. 1990) and the size of the cleavage products detected with domain-specific antibodies, led us to predict the most likely positions of the *in vivo* Dok cleavage by GP63 following *Leishmania* infection (Fig. S2). GP63 cleavage should leave an intact PH and PTB domains for Dok1 and Dok2 and therefore should not affect their membrane localization. We cannot predict what will be the effect of GP63 cleavage on the membrane localization of Dok-3 since the two potential cleavage sites will have an opposite effect on the PH domain. The deletion of most of the C-terminal part of Dok-1 and Dok-2 after GP63-dependent cleavage will likely prevent the recruitement of Dok-binding partners to the phagosomal membrane.

The association of Dok proteins with phagosomes suggests that these molecules may participate in phagolysosome biogenesis or phagosome function, possibly through the modulation of phosphotyrosine signaling (Boulais, Trost et al. 2010). Elucidating the impact of Dok proteins on the biology of phagosomes is clearly an important issue that will deserve further investigation. Indeed, such knowledge is expected to contribute to our understanding of the impact of Dok cleavage by GP63 on the nature of the intracellular compartment in which *Leishmania* parasites establish infection. It is also possible that Dok proteins participate in phagosome signaling that is linked to the detection of pathogens and the activation of appropriate innate immune responses (Kagan 2012). For instance, toll-like receptors recruited to phagosomes signal the presence of pathogen-derived molecules. Dok-1, Dok-2 and Dok-3, which were previously shown to act downstream of TLR4 (Shinohara, Inoue et al. 2005), could be part of the platforms of regulators that assemble on phagosomes and that are linked to innate immune sensors present on those organelles (Kagan 2012). Our finding that Dok-1 and Dok-2 proteins modulate TNF and NO production induced by *Leishmania* infection is consistent with this potential role, and highlights the contribution of Dok signaling in the response to *Leishmania*. Intriguingly, Dok-1 and Dok-2 appear to act positively on these responses which contrasts with their negative regulatory role in most macrophage responses studied so far (Mashima, Hishida et al. 2009). However, this effect is independent of GP63 raising the possibility that Dok-1/Dok-2 portions deleted by GP63 are not necessary for the regulation of TNF and NO responses.

In conclusion, the finding that Dok proteins are recruited to phagosomes points

towards a novel role for this family of signaling molecules in the biology of phagosomes. The targeting of Dok proteins by an intracellular pathogen such as *Leishmania* may thus be relevant in this context. To address this issue, future studies will be aimed to determine the role of Dok proteins during experimental leishmaniasis.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research to AD and PD. HADC and CPG were partly supported by studentships from the Fondation Armand-Frappier.

We thank Dr W. R. McMaster for the WT and Δ*gp63 L. major*; Dr André Veillette for the antibodies against Dok-3; M. Desrosiers for expert assistance with confocal microscopy and flow cytometry; Dr M. Jaramillo and G. Arango Duque for critical comments.

Figures

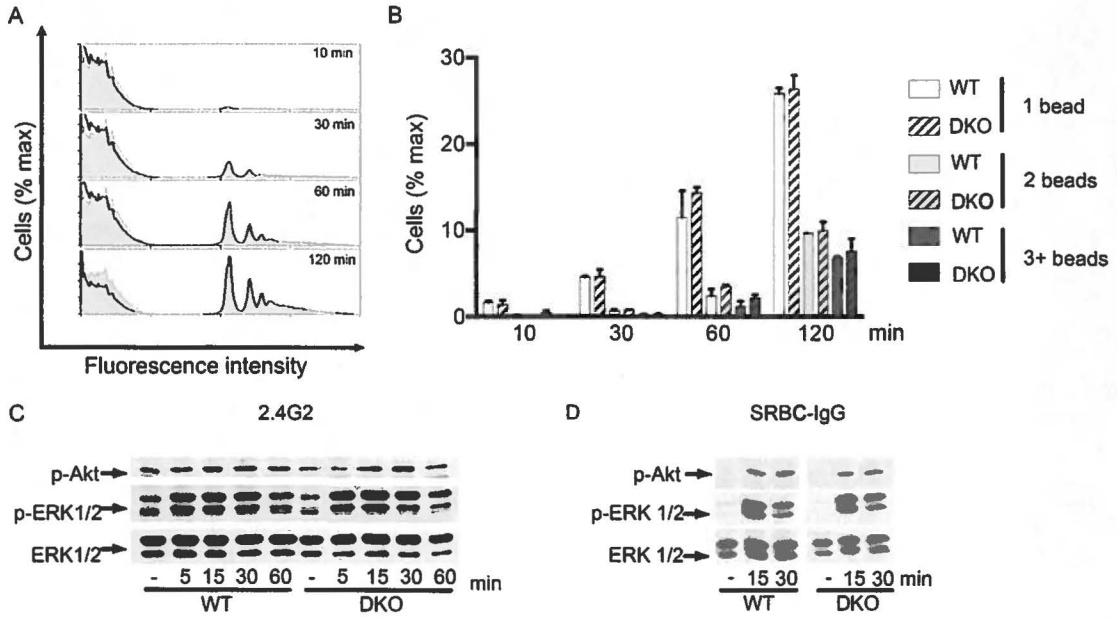


Figure 1: Dok-1 and Dok-2 are not essential for FcγR-mediated phagocytosis

(A) Representative histograms of BMM from WT (empty histogram) and *Dok-1/Dok-2* $^{-/-}$ (filled histograms) mice following ingestion of IgG-coated fluorescent latex beads at the indicated time points.

(B) Quantification of phagocytic capacity. Values are means ±SE from 3 separate experiments. Data shown include the percentage of cells ingesting one, two and three and more beads (% phagocytic cells).

(C-D) BMM from WT and *Dok1/Dok2* $^{-/-}$ (DKO) mice were stimulated with 2.4G2 (C) or with IgG-opsonized SRBC (D) for the indicated time points or left unstimulated (-). Total cell extracts were immunoblotted with anti-phospho-Akt, anti-phospho-ERK1/2 and anti-ERK1/2 antibodies as indicated. Data are representative of at least three experiments.

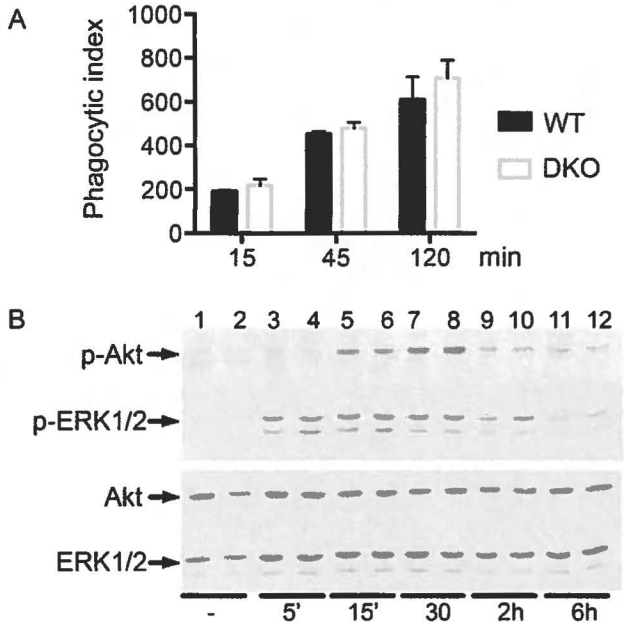


Figure 2: Dok-1 and Dok-2 do not control uptake of *L. major* promastigotes

(A) Adherent WT and *Dok-1/Dok-2*$^{-/-}$ (DKO) BMM were incubated with WT *L. major* promastigotes at a parasite-to-cell ratio of 15:1, for the indicated time points. Phagocytic index was determined by counting the number of parasites per 100 macrophages.

(B) BMM from WT (lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11) and *Dok/Dok2*$^{-/-}$ (lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12) mice were infected as in (A). Total cell extracts were used to perform Western blot assay by using antibodies against phospho-Akt and phospho-ERK. Anti-Akt and anti-ERK antibodies were used as loading controls.

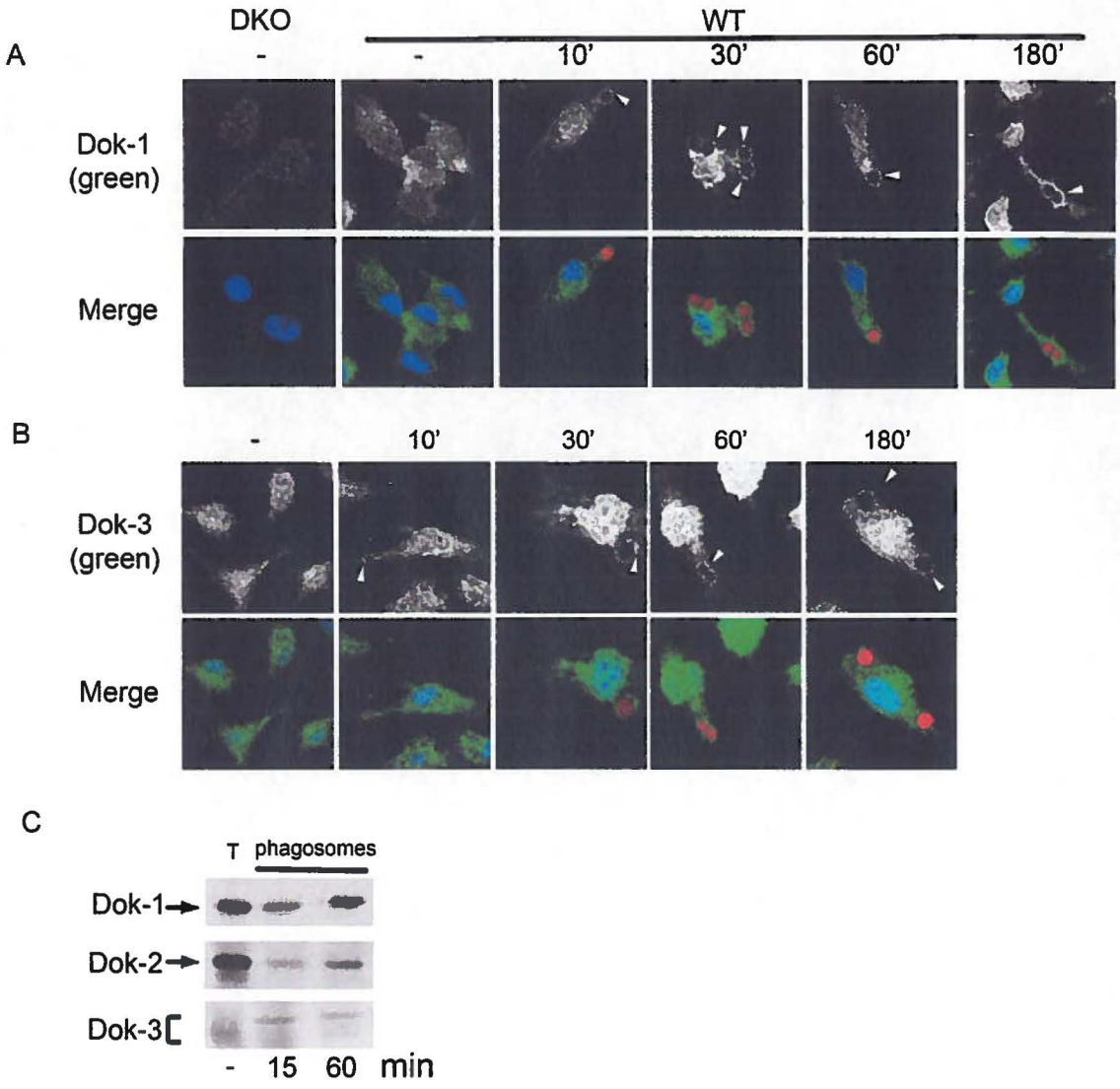


Figure 3: Dok proteins are recruited to phagosomes

(A-B) BMM were left unstimulated (-) or allowed to internalize latex beads (red) for different time points at a beads-to-cell ratio of 15:1. Cells were fixed and stained with DNA marker DRAQ5 (blue) and with anti-Dok-1 C-terminus (A) and anti-Dok-3 (B) antibodies (green) for immunofluorescence confocal microscopy. *Dok-1/Dok-2*$^{-/-}$ (DKO) BMM were used as negative control for staining. The recruitment of Dok-1 and Dok-3 to phagosomes is shown by arrowheads.

(C) Dok-1, Dok2 and Dok-3 proteins are present in phagosomes lysates from LM-1 macrophages. Total cell lysates (10^5 cells equivalent) (T) or phagosomes extracts (1.5×10^6 cells equivalent) were analyzed by Western blot with anti-Dok-1 C-terminal, anti-Dok-2 and anti Dok-3 antibodies as indicated.

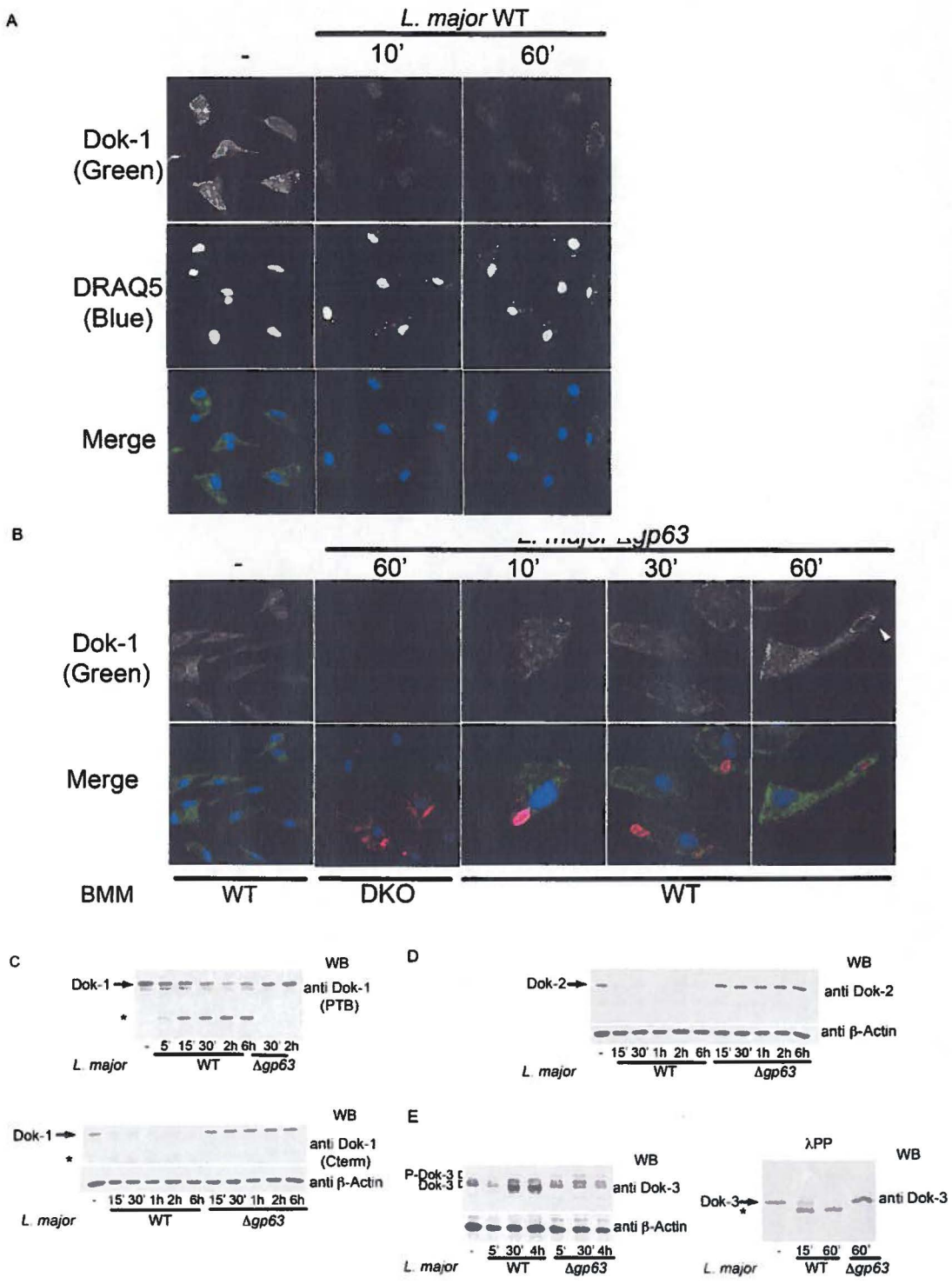


Figure 4: Dok-1, Dok-2 and Dok-3 proteins are cleaved in the presence of GP63

(A) Adherent WT BMM were incubated with WT *L. major* promastigotes at a parasite-to-cell ratio of 15:1, for the indicated time points. Immunostaining with

anti-Dok-1 antibodies (green) and DNA marker DRAQ5 (blue) was performed in non-infected (-) and WT *L. major*-infected BMM.

(B) Adherent WT or *Dok-1/Dok-2*$^{-/-}$ (DKO) BMM were incubated with *L. major Δgp63* promastigotes at a parasite-to-cell ratio of 15:1, for the indicated time points. Immunostaining with anti-Dok-1 antibodies (green), anti-lipophosphoglycan antibodies (pink) and DNA marker DRAQ5 (blue) was performed in non- infected (-) and *Δgp63 L. major*-infected BMM.

(C-E) BMM from WT mice were incubated as decribed in (A) with WT and *Δgp63 L. major* promastigotes as indicated. Total cell extracts were used to perform Western blot analysis using antibodies against Dok-1 (C), Dok-2 (D), Dok-3 (E) and β-Actin (C-E) as a loading control. (C) Dok-1 C-terminal (C-Ter, bottom panel) and Dok-1 PTB (PTB, top panel) antibodies are used as indicated. (E) Right panel, cell extracts were treated with λ protein phosphatase (λPP) before loading. * indicates the GP63-cleaved product of Dok-1(C) and Dok-3 (E).

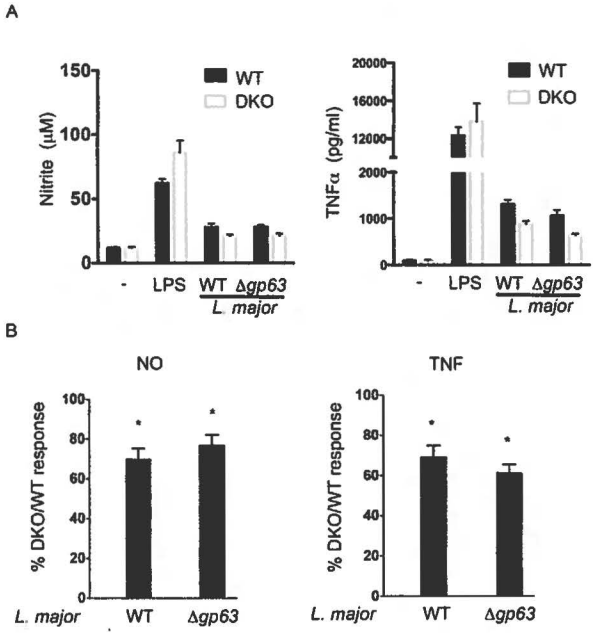


Figure 5: NO and TNF secretion is decreased in *L. major*-infected *Dok-1/Dok-2*$^{-/-}$ BMMs

(A-B) IFN-γ-primed BMM from WT or *Dok-1/Dok-2*$^{-/-}$ (DKO) mice were left unstimulated (-) and incubated with either 100 ng/ml LPS or WT and *Δgp63 L. major* promastigotes in a parasite-to-cell ratio of 15:1. Supernatants of stimulated BMM were evaluated for IFN-γ and nitrite production after 24 h. (A) The experiment shown is representative of 3 independent experiments performed in triplicates. (B) Graphs represent the average of 3 independent experiments and are expressed as percentage of the *Dok-1/Dok-2*$^{-/-}$ BMM responses compared to WT BMM responses to eliminate variability between experiments. Statistical significance was determined with an unpaired Student's *t* test.* indicates $p < 0.05$

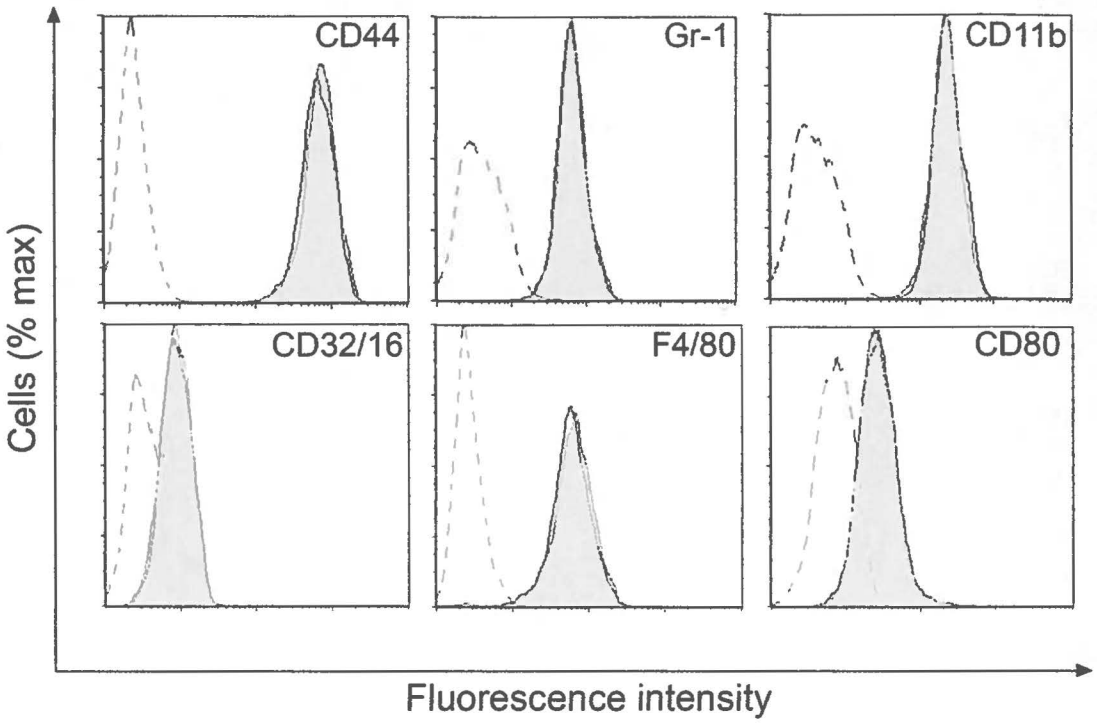


Figure S1: Normal differentiation of *Dok-1/Dok-2*$^{-/-}$ BMM

Cell surface marker expression of BMM from WT (empty histogram) and *Dok-1/Dok-2*$^{-/-}$ (filled histograms) mice are shown. Dotted line represents the isotype control.

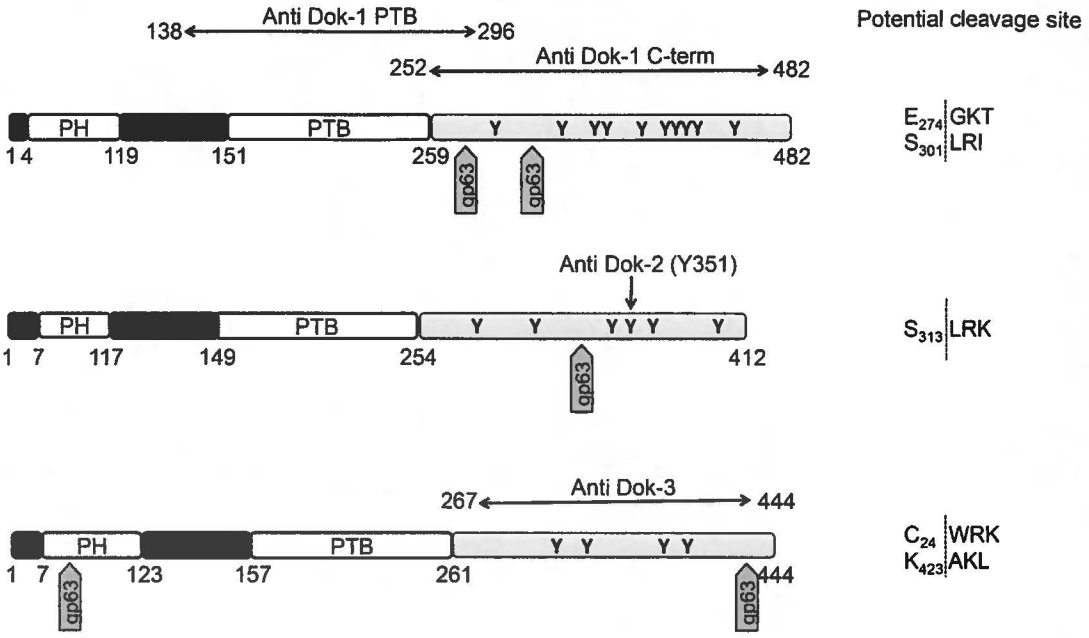


Figure S2: Potential GP63 cleavage sites in Dok-1, Dok-2 and Dok-3

Schematic representation of mouse Dok proteins is illustrated. Y corresponds to tyrosine residue in the C-terminal region that represent, once phosphorylated, binding site for SH2-containing proteins. The positions of the potential GP63 cleavage sites are indicated by an arrow and the corresponding sequence is indicated on the right part of the figure. Although GP63 does not recognize a specific sequence of amino acid residues, the motif recognized preferentially by GP63 is : P1 ↓ P1'- P2'- P3' where P indicates the position of the residue in the substrate. Polar residues at P1 site, hydrophobic residues at the P1' site and basic amino acid residues at the P2' site were generally found. The P3' site has a preference for basic but can accommodate any class of residues. This analysis is also based on the size of the cleavage product and its binding to antibodies with known specificity. Polyclonal antibodies that are directed against the PTB domain of Dok-1 recognized a degradation product smaller than the intact form. In contrast, antibodies recognizing the C-terminus detected only faintly the same cleavage product. Anti-Dok-2 antibodies are directed against tyrosine residue Y351 and do not recognized the cleavage product. Anti-Dok-3 recognized a degradation product smaller than the intact form

References

1. **Abramson, J., G. Rozenblum, and I. Pecht.** 2003. Dok protein family members are involved in signaling mediated by the type 1 Fcepsilon receptor. Eur. J. Immunol. **33**:85-91.

2. **Abu-Dayyeh, I., K. Hassani, E. R. Westra, J. C. Mottram, and M. Olivier.** 2010. Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions. Infect. Immun. **78**:2438-2445.

3. **Beattie, R. E., S. G. Volsen, D. Smith, A. L. McCormack, S. E. Gillard, J. P. Burnett, S. B. Ellis, A. Gillespie, M. M. Harpold, and W. Smith.** 1997. Preparation and purification of antibodies specific to human neuronal voltage-dependent calcium channel subunits. Brain Res. Brain Res. Protoc. **1**:307-319.

4. **Blanchette, J., N. Racette, R. Faure, K. A. Siminovitch, and M. Olivier.** 1999. *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. Eur. J. Immunol. **29**:3737-3744.

5. **Boulais, J., M. Trost, C. R. Landry, R. Dieckmann, E. D. Levy, T. Soldati, S. W. Michnick, P. Thibault, and M. Desjardins.** 2010. Molecular characterization of the evolution of phagosomes. Mol. Syst. Biol. **6**:423.

6. **Bouvier, J., P. Schneider, R. Etges, and C. Bordier.** 1990. Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*. Biochemistry (Mosc.) **29**:10113-10119.

7. **Breton, A., and A. Descoteaux.** 2000. Protein kinase C-alpha participates in FcgammaR-mediated phagocytosis in macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. **276:**472-476.

8. **Carpino, N., D. Wisniewski, A. Strife, D. Marshak, R. Kobayashi, B. Stillman, and B. Clarkson.** 1997. p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. Cell **88:**197-204.

9. **Contreras, I., M. A. Gomez, O. Nguyen, M. T. Shio, R. W. McMaster, and M. Olivier.** 2010. *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. PLoS Pathog. **6:**e1001148.

10. **Corradin, S., A. Ransijn, G. Corradin, M. A. Roggero, A. A. Schmitz, P. Schneider, J. Mauel, and G. Vergeres.** 1999. MARCKS-related protein (MRP) is a substrate for the *Leishmania major* surface protease leishmanolysin (gp63). J. Biol. Chem. **274:**25411-25418.

11. **Descoteaux, A., and G. Matlashewski.** 1989. c-fos and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages. Mol. Cell. Biol. **9:**5223-5227.

12. **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:**3008-3015.

13. **Desjardins, M., and A. Descoteaux.** 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. J. Exp. Med. **185:**2061-2068.

14. **Di Cristofano, A., N. Carpino, N. Dunant, G. Friedland, R. Kobayashi, A. Strife, D. Wisniewski, B. Clarkson, P. P. Pandolfi, and M. D. Resh.** 1998. Molecular cloning and characterization of p56dok-2 defines a new family of RasGAP-binding proteins. J. Biol. Chem. **273:**4827-4830.

15. **Di Cristofano, A., M. Niki, M. Zhao, F. G. Karnell, B. Clarkson, W. S. Pear, L. Van Aelst, and P. P. Pandolfi.** 2001. p62(dok), a negative regulator of Ras and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity, opposes leukemogenesis by p210(bcr-abl). J. Exp. Med. **194:**275-284.

16. **Garcia-Garcia, E., and C. Rosales.** 2002. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. J. Leukoc. Biol. **72:**1092-1108.

17. **Gomez, C. P., M. Tiemi Shio, P. Duplay, M. Olivier, and A. Descoteaux.** 2012. The protein tyrosine phosphatase SHP-1 regulates phagolysosome biogenesis. J. Immunol. **189:**2203-2210.

18. **Gomez, M. A., I. Contreras, M. Halle, M. L. Tremblay, R. W. McMaster, and M. Olivier.** 2009. *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. Sci Signal **2:**ra58.

19. **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:**278-283.

20. **Gugasyan, R., C. Quilici, S. T. I, D. Grail, A. M. Verhagen, A. Roberts, T. Kitamura, A. R. Dunn, and P. Lock.** 2002. Dok-related protein negatively regulates T cell development via its RasGTPase-activating protein and Nck docking sites. J. Cell Biol. **158:**115-125.

21. **Guittard, G., A. Gerard, S. Dupuis-Coronas, H. Tronchere, E. Mortier, C. Favre, D. Olive, P. Zimmermann, B. Payrastre, and J. A. Nunes.** 2009. Cutting edge: Dok-1 and Dok-2 adaptor molecules are regulated by phosphatidylinositol 5-phosphate production in T cells. J. Immunol. **182:**3974-3978.

22. **Halle, M., M. A. Gomez, M. Stuible, H. Shimizu, W. R. McMaster, M. Olivier, and M. L. Tremblay.** 2009. The *Leishmania* surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation. J. Biol. Chem. **284:**6893-6908.

23. **Honma, M., O. Higuchi, M. Shirakata, T. Yasuda, H. Shibuya, S. Iemura, T. Natsume, and Y. Yamanashi.** 2006. Dok-3 sequesters Grb2 and inhibits the Ras-Erk pathway downstream of protein-tyrosine kinases. Genes Cells **11:**143-151.

24. **Isnard, A., M. T. Shio, and M. Olivier.** 2012. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. Front Cell Infect Microbiol **2:**72.

25. **Jaramillo, M., M. A. Gomez, O. Larsson, M. T. Shio, I. Topisirovic, I. Contreras, R. Luxenburg, A. Rosenfeld, R. Colina, R. W. McMaster, M. Olivier, M. Costa-Mattioli, and N. Sonenberg.** 2011. *Leishmania* repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. Cell Host Microbe **9:**331-341.

26. **Joshi, P. B., B. L. Kelly, S. Kamhawi, D. L. Sacks, and W. R. McMaster.** 2002. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. Mol. Biochem. Parasitol. **120:**33-40.

27. **Kagan, J. C.** 2012. Signaling organelles of the innate immune system. Cell **151:**1168-1178.

28. **Kepley, C. L., S. Taghavi, G. Mackay, D. Zhu, P. A. Morel, K. Zhang, J. J. Ryan, L. S. Satin, M. Zhang, P. P. Pandolfi, and A. Saxon.** 2004. Co-aggregation of FcgammaRII with FcepsilonRI on human mast cells inhibits antigen-induced secretion and involves SHIP-Grb2-Dok complexes. J. Biol. Chem. **279:**35139-35149.

29. **Lemay, S., D. Davidson, S. Latour, and A. Veillette.** 2000. Dok-3, a novel adapter molecule involved in the negative regulation of immunoreceptor signaling. Mol. Cell. Biol. **20:**2743-2754.

30. **Martelli, M. P., J. Boomer, M. Bu, and B. E. Bierer.** 2001. T cell regulation of p62(dok) (Dok1) association with Crk-L. J. Biol. Chem. **276:**45654-45661.

31. **Mashima, R., Y. Hishida, T. Tezuka, and Y. Yamanashi.** 2009. The roles of Dok family adapters in immunoreceptor signaling. Immunol. Rev. **232:**273-285.

32. **Mashima, R., K. Honda, Y. Yang, Y. Morita, A. Inoue, S. Arimura, H. Nishina, H. Ema, H. Nakauchi, B. Seed, H. Oda, and Y. Yamanashi.** 2010. Mice lacking Dok-1, Dok-2, and Dok-3 succumb to aggressive histiocytic sarcoma. Lab. Invest. **90:**1357-1364.

33. **Matte, C., and A. Descoteaux.** 2010. *Leishmania donovani* amastigotes impair gamma interferon-induced STAT1alpha nuclear translocation by blocking the interaction between STAT1alpha and importin-alpha5. Infect. Immun. **78:**3736-3743.

34. **May, R. C., and L. M. Machesky.** 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. J. Cell Sci. **114:**1061-1077.

35. **Moradin, N., and A. Descoteaux.** 2012. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. Front Cell Infect Microbiol **2:**121.

36. **Nandan, D., and N. E. Reiner.** 1995. 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. **63:**4495-4500.

37. **Nemorin, J. G., and P. Duplay.** 2000. Evidence that Lick-mediated phosphorylation of p56dok and p62dok may play a role in CD2 signaling. J. Biol. Chem. **275:**14590-14597.

38. **Niki, M., A. Di Cristofano, M. Zhao, H. Honda, H. Hirai, L. Van Aelst, C. Cordon-Cardo, and P. P. Pandolfi.** 2004. Role of Dok-1 and Dok-2 in leukemia suppression. J. Exp. Med. **200:**1689-1695.

39. **Olivier, M., V. D. Atayde, A. Isnard, K. Hassani, and M. T. Shio.** 2012. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. Microbes Infect. **14:**1377-1389.

40. **Ott, V. L., I. Tamir, M. Niki, P. P. Pandolfi, and J. C. Cambier.** 2002. Downstream of kinase, p62(dok), is a mediator of Fc gamma IIB inhibition of Fc epsilon RI signaling. J. Immunol. **168:**4430-4439.

41. **Peng, Q., J. L. O'Loughlin, and M. B. Humphrey.** 2012. DOK3 negatively regulates LPS responses and endotoxin tolerance. PLoS ONE **7:**e39967.

42. **Reiner, N. E., W. Ng, T. Ma, and W. R. McMaster.** 1988. Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **85:**4330-4334.

43. **Reiner, N. E., W. Ng, and W. R. McMaster.** 1987. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses

macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. J. Immunol. **138:**1926-1932.

44. **Robson, J. D., D. Davidson, and A. Veillette.** 2004. Inhibition of the Jun N-terminal protein kinase pathway by SHIP-1, a lipid phosphatase that interacts with the adaptor molecule Dok-3. Mol. Cell. Biol. **24:**2332-2343.

45. **Shinohara, H., A. Inoue, N. Toyama-Sorimachi, Y. Nagai, T. Yasuda, H. Suzuki, R. Horai, Y. Iwakura, T. Yamamoto, H. Karasuyama, K. Miyake, and Y. Yamanashi.** 2005. Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of lipopolysaccharide-induced signaling. J. Exp. Med. **201:**333-339.

46. **Silverman, J. M., J. Clos, C. C. de'Oliveira, O. Shirvani, Y. Fang, C. Wang, L. J. Foster, and N. E. Reiner.** 2010. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from Leishmania and communication with macrophages. J. Cell Sci. **123:**842-852.

47. **Trost, M., L. English, S. Lemieux, M. Courcelles, M. Desjardins, and P. Thibault.** 2009. The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages. Immunity **30:**143-154.

48. **Ueno, N., and M. E. Wilson.** 2012. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. Trends Parasitol. **28:**335-344.

49. **Underhill, D. M., and H. S. Goodridge.** 2012. Information processing during phagocytosis. Nat. Rev. Immunol. **12:**492-502.

50. **Vinet, A. F., M. Fukuda, S. J. Turco, and A. Descoteaux.** 2009. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. PLoS Pathog. **5:**e1000628.

51. **Wick, M. J., L. Q. Dong, D. Hu, P. Langlais, and F. Liu.** 2001. Insulin receptor-mediated p62dok tyrosine phosphorylation at residues 362 and 398 plays distinct roles for binding GTPase-activating protein and Nck and is essential for inhibiting insulin-stimulated activation of Ras and Akt. J. Biol. Chem. **276:**42843-42850.

52. **Yasuda, T., M. Shirakata, A. Iwama, A. Ishii, Y. Ebihara, M. Osawa, K. Honda, H. Shinohara, K. Sudo, K. Tsuji, H. Nakauchi, Y. Iwakura, H. Hirai, H. Oda, T. Yamamoto, and Y. Yamanashi.** 2004. Role of Dok-1 and Dok-2 in myeloid homeostasis and suppression of leukemia. J. Exp. Med. **200:**1681-1687.

53. **Yeung, T., and S. Grinstein.** 2007. Lipid signaling and the modulation of surface charge during phagocytosis. Immunol. Rev. **219:**17-36.

54. **Zhao, M., A. A. Schmitz, Y. Qin, A. Di Cristofano, P. P. Pandolfi, and L. Van Aelst.** 2001. Phosphoinositide 3-kinase-dependent membrane recruitment of p62(dok) is essential for its negative effect on mitogen-activated protein (MAP) kinase activation. J. Exp. Med. **194:**265-274.

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

1. Dok-1 dans la voie d'activation du TLR4

L'activation via le TLR4 n'induit pas une dégradation de Dok-1

Le groupe du Dr Yamanashi a étudié le rôle des protéines Dok lors de l'activation des macrophages avec du LPS. Dans cette étude, la protéine Dok-1 est dégradée chez les macrophages après 30 minutes de stimulation avec du LPS alors que la protéine Dok-2 ne l'est pas. (Shinohara, Inoue et al. 2005). En voulant reproduire ces résultats, nous avons fait l'observation surprenante qu'il n'y avait pas de dégradation de Dok-1 suite à une stimulation au LPS des macrophages, mais plutôt une phosphorylation de la protéine qui entraînait une perte de l'affinité de l'anticorps pour son épitope (Figure 14). En effet, l'utilisation de plusieurs anticorps, dont l'anticorps développé dans notre laboratoire contre la partie C-terminale de Dok-1 (anticorps polyclonal qui cible les acides aminés 252-482), nous a permis de montrer que la protéine Dok-1 est stable jusqu'à 75 min. après la stimulation au LPS. Par contre, l'anticorps A3 utilisé par le groupe du Dr Yamanashi (anticorps monoclonal reconnaissant un épitope entre les acides aminés 1-276) n'est pas capable de reconnaître la protéine modifiée.

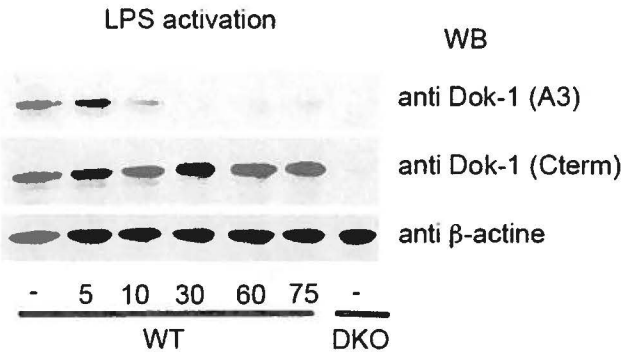


Figure 14. Détection avec différents anticorps de Dok-1 lors de l'activation via le TLR4. Des macrophages primaires dérivées de la moelle osseuse de type sauvage et déficient pour Dok-1 et Dok-2 ont été incubés en absence (-) ou en présence de 100 ng /ml de LPS pendent 5, 10, 30 60 et 75 min. Les extraits cellulaires ont été utilisés pour un immunobuvardage de type western dans lequel les anticorps A3 et C-term ont été utilisés pour la détection de Dok-1. L'anticorps anti β-actine a été utilisé comme contrôle de chargement.

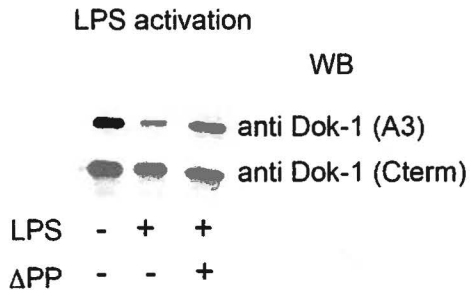
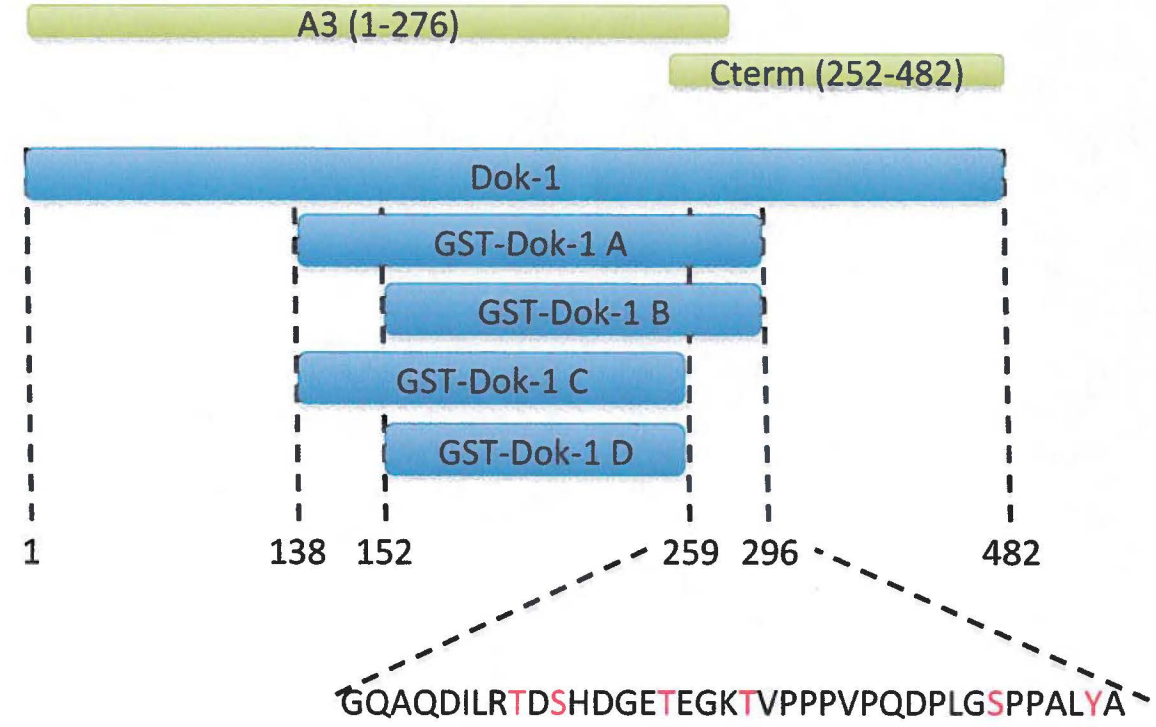


Figure 15. Traitement in vitro avec la phosphatase lambda. Des macrophages de la ligne cellulaire RAW 264.7 ont été incubés en absence (-) ou en présence (+) de 100 ng /ml de LPS pendant 30 min.. Les extraits cellulaires ont été traités (+) ou pas (-) avec la phosphatase lambda pendant 1 heure avant d'être utilisés pour l'immunobuvardage de type western. Les anticorps A3 et C-term ont été utilisés pour la détection de Dok-1.

Nous avons par la suite cherché à déterminer la position ainsi que la nature de la modification de Dok-1 suite à un traitement au LPS. La déphosphorylation *in vitro* montre que la modification post-traductionnelle sur Dok-1 est possiblement une phosphorylation sur un ou plusieurs résidus tyrosine, sérine ou thréonine puisqu'un traitement avec la phosphatase lambda restaure la réactivité de l'anticorps A3 (Figure 15). De plus, la production de différentes constructions GST/Dok-1 a permis de localiser l'épitope, reconnu par l'anticorps A3, qui est modifié lors de l'activation des macrophages avec le LPS. Nous avons utilisé comme construction GST de départ, une construction déjà disponible dans le laboratoire (GST-Dok-1 A) et ensuite nous avons éliminé des fragments au début et à la fin de cette séquence pour localiser l'épitope reconnu par l'anticorps A3. Nous proposons que lors de l'activation des macrophages avec le LPS, la protéine Dok-1 subit une ou plusieurs phosphorylations dans la région qui va des acides aminés 259 à 296 (Figure 16).

A



B

	Anti Dok-1 A3	Anti Dok-1 Cterm
Dok-1	✔	✔
Dok-1 (activation LPS)	✖	✔
GST/Dok-1 A	✔	✔
GST/Dok-1 B	✔	✔
GST/Dok-1 C	✖	✔
GST/Dok-1 D	✖	✔

Figure 16. Reconnaissance de Dok-1 et différentes constructions GST-Dok-1 par différents anticorps. (A) Schéma montrant les différentes protéines et constructions GST. Il est montré en détail la séquence d'acides aminés du résidu 259 au 296. Les constructions utilisées pour développer les anticorps A3 et C-term sont montrées en vert (B) Reconnaissance par les différents anticorps des différentes protéines ou constructions GST.

2. Protéines Dok et la maturation phagosomal

Dok-1 et Dok-2 ne régulent pas la cinétique d'acquisition de LAMP1 au phagosome

Lors de la phagocytose de billes de latex, le marqueur de maturation phagosomale, LAMP1, est recruté au phagosome (Huynh, Eskelinen et al. 2007). Ce recrutement est nécessaire pour une maturation phagosomale efficace. Les résultats obtenus montrent (article soumis) que les protéines Dok sont recrutées à la membrane phagosomale. Par contre, la cinétique et la capacité phagocytique ne semblent pas être affectées par l'absence des protéines Dok-1 et Dok-2. Nous avons voulu regarder si les protéines Dok influencaient la maturation du phagosome. Nous avons donc comparé l'acquisition de LAMP1 lors de la phagocytose de billes de latex par des BMM de type sauvage et déficients pour Dok-1 et Dok-2. Comme montré dans la figure 17, le recrutement de LAMP1 au phagosome est effectué de façon semblable dans les deux types cellulaires aux différents temps de phagocytose. Cette etude est très préliminaire et d'autres étapes importantes dans la biogénèse du phagosome devront être étudiées avant de conclure que les protéines Dok ne sont pas impliquées dans la maturation du phagosome.

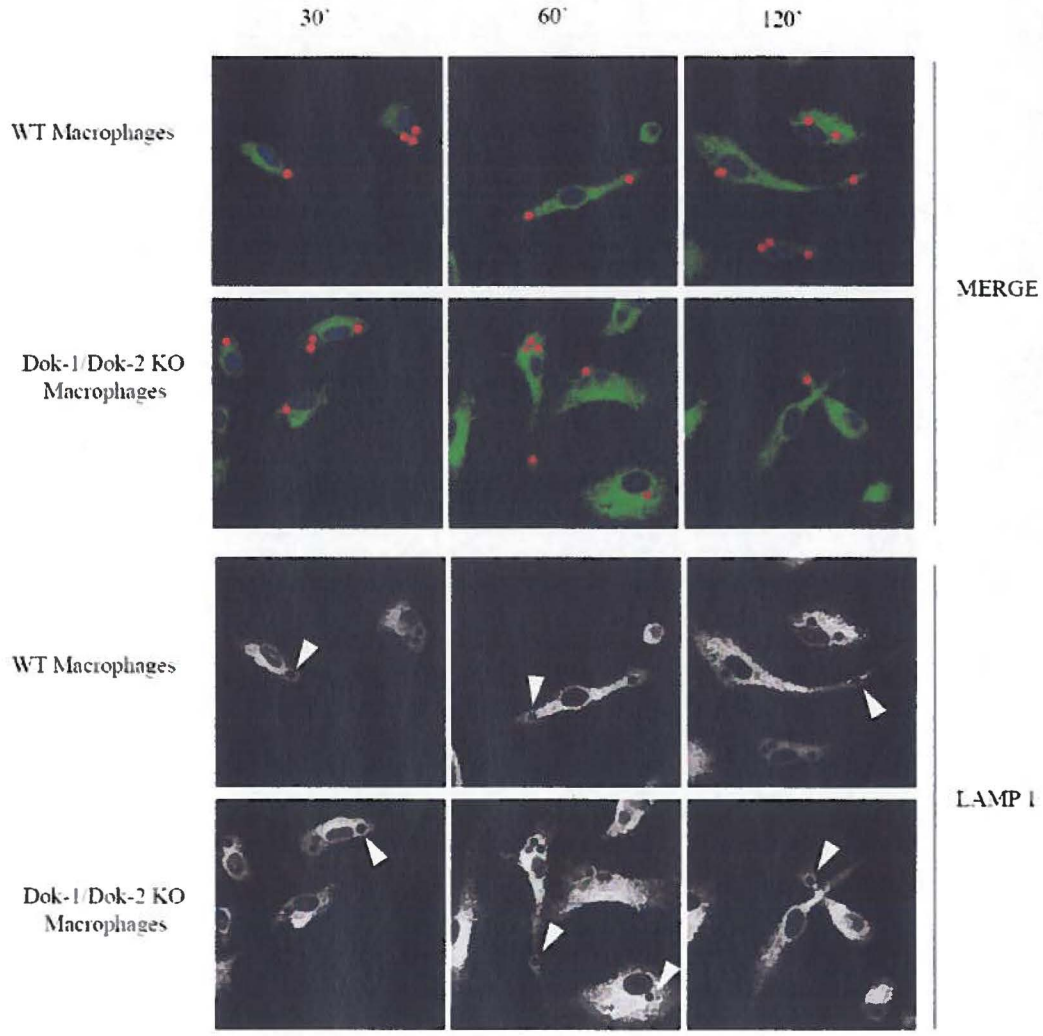


Figure 17. Recrutement de LAMP1 au phagosome dans des cellules sauvages et KO pour Dok-1 et Dok-2. Des BMM de type sauvage et déficient pour Dok-1 et Dok-2 ont été attachées à des lamelles de microscopie et incubées avec des billes de latex fluorescentes (rouge) de 3 µm. Nous avons effectué une phagocytose synchronisée pendant 30, 60 et 120 min. Des anticorps anti LAMP1 et anti rat Alexa 488 (vert) ont été utilisés pour la détection de LAMP1. Les pointes de flèches montrent le recrutement de la protein LAMP1 aux phagosomes.

DISCUSSION

La phagocytose est une des fonctions les plus importantes des macrophages. Elle élimine des pathogènes, des cellules mortes et d'autres particules non désirables. L'internalisation des particules phagocytées et la dégradation qui s'en suit permettent la production de fragments peptidiques qui peuvent être utilisés pour la présentation antigénique. Les protéines Dok (Dok-1, Dok-2 et Dok-3) sont des protéines adaptatrices présentes dans les macrophages. Elles sont impliquées dans la régulation de plusieurs processus cellulaires comme dans la prolifération et la différenciation cellulaire, où les protéines Dok régulent l'activation d'ERK, une MAPK mais aussi le réarrangement de l'actine et la motilité cellulaire (Master, Tran et al. 2003; Han, Kosako et al. 2007). Les fonctions régulatrices des protéines Dok dans la prolifération, la réponse à differents facteurs de croissance, cytokines et au LPS et la différentiation des macrophages ont déjà été étudiées par différents groupes (Berg, Siminovitch et al. 1999; Mashima, Honda et al. 2010). Par contre, les fonctions de Dok dans la régulation de la phagocytose n'avaient jamais été étudiées auparavant. Au cours de ce projet de maîtrise, nous avons étudié l'implication des protéines Dok dans le processus de la phagocytose.

Nous avons montré que chez des macrophages non activés, Dok-1 et Dok-3 sont localisées dans le cytoplasme. Ces résultats concordent avec ceux montrés pour Dok-3 chez les macrophages par le groupe du Dr. Humphrey (Peng, O'Loughlin et al. 2012). Lors de la phagocytose de particules, la majorité de ces protéines Dok sont encore localisées dans le cytoplasme, toutefois nous avons aussi observé leur recrutement dans les membranes phagosomales. Cette interaction a lieu dans les premiers moments de la maturation phagosomale (10 min.) et elle persiste jusqu'à 120 min. après la phagocytose. Ne possédant pas les outils nécessaires pour localiser Dok-2 par microsopie confocale, des analyses par immunobuvardage de type Western ont été réalisées et ont démontré la présence de Dok-2 à la membrane phagosomale, en plus de confirmer les résultats pour Dok-1 et Dok-3.

L'association des protéines Dok à la membrane cytoplasmique a déjà été rapportée dans plusieurs types cellulaires lors de différentes activations, (Phee, Rodgers et al. 2001; Zhao, Schmitz et al. 2001; Master, Tran et al. 2003; Stork, Neumann et al. 2007) par exemple dans des cellules B lors de l'activation du

BCR. Cette capacité d'interaction entre les protéines Dok et la membrane cytoplasmique est due à la présence du domaine PH dans les protéines Dok (Zhao, Schmitz et al. 2001). Les domaines PH interagissent avec les phospholipides des membranes cellulaires (Gu, Botelho et al. 2003; Heinsbroek, Kamen et al. 2009). Nous proposons que ce domaine PH soit responsable du recrutement des protéines Dok à la membrane phagosomale. La mutation de ces domaines PH ou leur élimination dans des expériences à venir pourrait confirmer l'importance de ce domaine dans ces interactions.

Suite à la localisation des protéines Dok dans la membrane du phagosome, l'utilisation de cellules déficientes pour Dok-1 et Dok-2 nous a permis de déterminer les fonctions des protéines Dok lors de la phagocytose. Nos résultats montrent que l'élimination des protéines Dok-1 et Dok-2 ne semble pas être indispensable à la capacité phagocytaire des macrophages. Toutes nos expériences montrent une quantité et une cinétique équivalentes pour la phagocytose de différentes particules (billes de latex enrobées d'igG et *Leishmania major*) chez les macrophages de type sauvage ou déficients pour Dok-1 et Dok-2.

De plus, nous avons vérifié l'activation de certaines molécules clés dans les voies de signalisation impliquées lors de la phagocytose telles qu'Akt et ERK (Parsa, Butchar et al. 2008; Tachado, Samrakandi et al. 2008). La cinétique et l'intensité de l'activation d'ERK et d'Akt pour les deux types de cellules sont semblables. Cela contraste avec les travaux des autres groupes qui ont montré qu'ERK et Akt sont régulées par les protéines Dok (Yasuda, Shirakata et al. 2004; Shinohara, Inoue et al. 2005; Van Slyke, Coll et al. 2005; Honma, Higuchi et al. 2006; Inoue, Yasuda et al. 2007; Berger, Niki et al. 2010). Ces résultats nous permettent de déterminer que même si les protéines Dok sont recrutées au phagosome lors de la phagocytose, leur rôle dans l'internalisation ou dans la modulation d'Akt ou d'ERK ne semble pas important. Par contre, il serait pertinent d'étudier l'activation d'autres molécules impliquées dans la phagocytose via les différents récepteurs, comme ceux qui se trouvent dans les voies de signalisation de PKC ou PLC.

L'importance de l'interaction des protéines Dok avec la membrane phagosomale reste à déterminer, mais nous suggérons que cette interaction permette à Dok

lorsqu'elle est phosphorylée d'agir comme site d'ancrage pour d'autres protéines, de la même façon qu'elle le fait avec des protéines comme rasGAP (Songyang, Yamanashi et al. 2001). Ces interactions avec d'autres protéines pourraient être nécessaires au processus de maturation phagosomale et l'élimination des particules phagocytées. Dans ce sens, la présence de certaines protéines importantes pour le processus de la phagocytose et capables d'interagir avec les protéines Dok, a déjà été démontrée au phagosome par exemple Abl, Hck, Lyn, PI3K, SHIP-1 et Grb2 (Gu, Botelho et al. 2003; Lee, Harrison et al. 2003; Vieira, Bucci et al. 2003; Kamen, Levinsohn et al. 2008; Kannan, Audet et al. 2008; Bruns, Stegelmann et al. 2012). L'étude des fonctions de ces protéines dans la phagocytose, chez des cellules déficientes pour Dok-1 et Dok-2, serait importante pour déterminer les fonctions des protéines Dok dans ce processus.

Nous avons également vérifié la maturation phagosomale par le suivi de l'acquisition du marqueur de maturation LAMP1. Aucune différence n'a été trouvée entre les macrophages normaux et les macrophages déficients en Dok-1 et Dok-2. Par contre, le suivi des marqueurs de maturation tels que rab5, rab7, V-ATPase et la quantification des paramètres comme l'acidification de l'intérieur du phagosome seraient nécessaires pour confirmer que les protéines Dok n'ont pas un rôle dans la maturation phagosomale.

L'entrée d'un pathogène dans le macrophage, tout comme d'autres particules, déclenche son activation ce qui permet l'acidification du phagolysosome, le versement des enzymes protéolytiques dans celui-ci et l'activation d'autres processus menant à la destruction du parasite. Dans le cas de *Leishmania*, le parasite est capable de survivre à l'intérieur des phagosomes en prenant le contrôle de la maturation phagosomale et des réponses du macrophage (Chaudhuri, Chaudhuri et al. 1989; Lodge and Descoteaux 2005). Pour ce faire, la métalloprotéase GP63 est une molécule très importante. Cette métalloprotéase est responsable du clivage de plusieurs molécules importantes dans la signalisation cellulaire de l'hôte telle que mTOR, TAB-1, SHP-1, PTP1B, TC-PTP, PTP-PEST et p130 cas (Gomez, Contreras et al. 2009; Halle, Gomez et al. 2009; Jaramillo, Gomez et al. 2011; Olivier, Atayde et al. 2012). Nous avons étudié les conséquences de l'infection par *Leishmania* dans l'activation cellulaire

et nous avons montré que les protéines Dok-1, Dok-2 et Dok-3 sont clivées par GP63.

Nous proposons des sites potentiels de clivage dans la portion C-terminale pour Dok-1, Dok-2 et Dok-3. Ces sites corrèlent avec la séquence d'acides aminés proposée comme préférentiellement coupée par GP63 (Bouvier, Schneider et al. 1990) P1 ↓ P2 P3 P4, où « P1 » est un acide aminé polaire, « P2 » un acide aminé hydrophobe, « P3 » un acide aminé basique, « P4 » un acide aminé variable et « ↓ » est le site de clivage (Figure 18). La production de constructions par mutagenèse dirigée possédant des mutations à ces sites de clivage permettrait de confirmer si ces sites sont coupés par GP63.

Dans notre modèle, le clivage des protéines Dok par GP63 produirait des fragments qui gardent certaines portions importantes pour les fonctions des protéines Dok, tels que le domaine PH et le domaine PTB. Par contre, il aurait un impact très important dans la partie C-terminale des protéines Dok. Ce clivage permettrait toujours le recrutement des protéines Dok à la membrane phagosomale, mais il empêcherait l'ancrage au phagosome des protéines qui interagissent avec les protéines Dok par leurs domaines SH2. Une autre possibilité serait que le clivage des protéines Dok mène à la dégradation dans le protéasome de la partie clivée et des molécules qui y sont attachées. Une hypothèse similaire a été énoncée par le groupe du Dr. Humphrey pour la dégradation simultanée de Dok-3 et SOS1 lors de l'activation via le TLR4 (Peng, O'Loughlin et al. 2012). Nous ne pouvons pas pour l'instant confirmer en microscopie confocale si le fragment résultant reste au phagosome puisque nous n'avons pas les outils nécessaires pour le détecter. Par contre, nous avons réalisé des expériences où nous avons effectué une phagocytose de billes magnétiques concomitantes à l'infection par *Leishmania*. En isolant les phagosomes contenant les billes, et par détection par immunobuvardage de type western des protéines Dok, nous avons obtenu des résultats préliminaires qui montrent que le fragment résultant de la digestion de Dok-1 par GP63, reste associé aux fractions correspondant aux phagososmes. Ces résultats concordent avec notre hypothèse où les domaines PH et PTB sont encore fonctionnels et associés aux phagosomes.

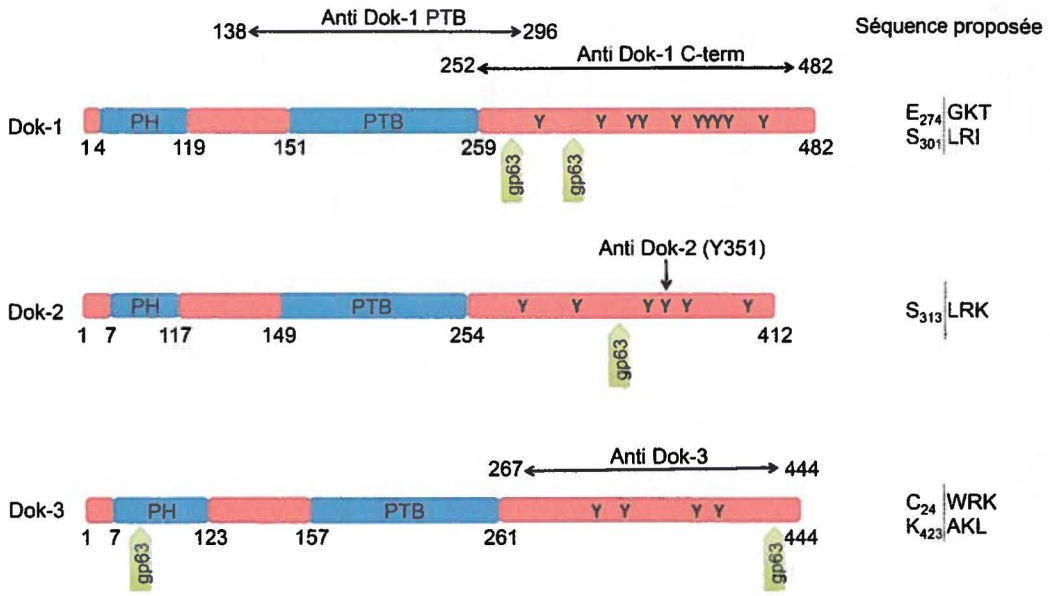


Figure 18. Sites de clivage potentiels des protéines Dok par GP63. Les domaines PH et PTB des protéines Dok sont marqués en bleu. Dans la partie C terminal, les résidus tyrosine susceptibles d'être phosphorylés et représentant des sites accepteurs de protéiness possédant des domaines SH2 sont indiqués. Les séquences de sites de clivage potentiels et leurs positions sont montrées.

La dernière étape de ce projet de maîtrise avait comme objectif de déterminer l'impact de l'absence des protéines Dok dans la production de NO et TNF en réponse à l'infection par *Leishmania*. L'importance de la régulation de la production de NO et TNF dans les macrophages par Dok-1 et Dok-2 a déjà été montrée lors de l'activation avec du LPS (Shinohara, Inoue et al. 2005). Les expériences de ce groupe montrent que Dok-1 et Dok-2 régulent négativement la production de NO et TNF dans l'activation de la voie du TLR4. Par contre, de façon surprenante, lorsque nous utilisons *Leishmania* pour infecter des BMM préstimulés avec de l'IFN-γ, la production de NO et TNF semble être régulée de façon positive par les protéines Dok-1 et Dok-2. En effet, les cellules déficientes en Dok-1 et Dok-2 produisent significativement moins de NO et TNF, mais ce

phénomène semble indépendant de GP63. Comme décrit auparavant, même si les protéines Dok sont clivées par GP63, les fragments résultants pourraient conserver certaines fonctions, puisque plusieurs domaines importants pour ces fonctions restent intacts (domaines PH et PTB). Pour poursuivre ce projet, il sera important de déterminer quelle étape dans les voies de signalisation menant à la production de NO et TNF est régulée par les protéines Dok. D'autre part, afin de définir le rôle de Dok-3 et sa possible redondance fonctionnelle avec Dok-1 et Dok-2 dans la production de NO et TNF, ainsi que dans la phagocytose, il serait important de réaliser les mêmes experiences décrites dans ce mémoire en utilisant des BMM de souris *Dok-3*$^{-/-}$ et *Dok-1/Dok-2/Dok-3*$^{-/-}$.

CONCLUSION

En conclusion, le projet développé pendant cette maîtrise a permis pour la première fois de montrer le recrutement des protéines Dok à la membrane du phagosome suite à la phagocytose de particules. Ce recrutement a lieu à des étapes précoces de la maturation phagosomale et il est stable pendant la maturation. Par contre, la capacité phagocytique des macrophages ne semble pas être affectée par l'absence des protéines Dok-1 et Dok-2.

Cette étude a également permis de mettre en évidence pour la première fois le clivage des protéines Dok lors de l'infection du macrophage par le parasite *Leishmania*. Ce clivage est dépendant de la métalloprotéase GP63 du parasite. Nos expériences indiquent que les protéines Dok-1 et Dok-2 sont impliquées dans la régulation positive de la production de NO et TNF lors de l'infection par *Leishmania*.

Cette étude ouvre la voie à des recherches plus approfondies pour déterminer d'autres fonctions possibles des protéines Dok pendant le processus de la phagocytose et notamment dans la biogénèse du phagosome. Par ailleurs, étant donné que les protéines Dok sont des cibles de la métalloprotéase GP63, l'élucidation des mécanismes par lesquels les protéines Dok régulent les fonctions de l'hôte permettra de mieux déterminer le rôle de ce facteur de virulence de *Leishmania*.

RÉFÉRENCES

Abramson, J., G. Rozenblum, et al. (2003). "Dok protein family members are involved in signaling mediated by the type 1 Fcepsilon receptor." European Journal of Immunology **33**(1): 85-91.

Abramson, J., G. Rozenblum, et al. (2003). "Dok protein family members are involved in signaling mediated by the type 1 Fcepsilon receptor." Eur J Immunol **33**(1): 85-91.

Abu-Dayyeh, I., K. Hassani, et al. (2010). "Comparative study of the ability of Leishmania mexicana promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions." Infection and Immunity **78**(6): 2438-2445.

Abu-Dayyeh, I., M. T. Shio, et al. (2008). "Leishmania-induced IRAK-1 inactivation is mediated by SHP-1 interacting with an evolutionarily conserved KTIM motif." PLoS Negl Trop Dis **2**(12): e305.

Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Annu Rev Immunol **17**: 593-623.

Ahmed, A. A., A. Wahbi, et al. (1998). "In vitro Leishmania major promastigote-induced macrophage migration is modulated by sensory and autonomic neuropeptides." Scand J Immunol **48**(1): 79-85.

Allen, L. A. and A. Aderem (1996). "Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages." J Exp Med **184**(2): 627-637.

Allen, L. H. and A. Aderem (1995). "A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages." J Exp Med **182**(3): 829-840.

Antoine, J. C., T. Lang, et al. (1999). "H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of Leishmania-infected macrophages and internalized by amastigotes of L. amazonensis and L. mexicana." J Cell Sci **112 (Pt 15)**: 2559-2570.

Antoine, J. C., E. Prina, et al. (1990). "Parasitophorous vacuoles of Leishmania amazonensis-infected macrophages maintain an acidic pH." Infect Immun **58**(3): 779-787.

Antoine, J. C., E. Prina, et al. (1998). "The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages." Trends Microbiol **6**(10): 392-401.

Areschoug, T., J. Waldemarsson, et al. (2008). "Evasion of macrophage scavenger receptor A-mediated recognition by pathogenic streptococci." Eur J Immunol **38**(11): 3068-3079.

Assreuy, J., F. Q. Cunha, et al. (1994). "Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of Leishmania major." Eur J Immunol **24**(3): 672-676.

Austyn, J. M. and S. Gordon (1981). "F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage." Eur J Immunol **11**(10): 805-815.

Bahr, V., Y. D. Stierhof, et al. (1993). "Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of Leishmania mexicana." Mol Biochem Parasitol **58**(1): 107-121.

Balestieri, F. M., A. R. Queiroz, et al. (2002). "Leishmania (L.) amazonensis-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages." Microbes Infect **4**(1): 23-29.

Beattie, R. E., S. G. Volsen, et al. (1997). "Preparation and purification of antibodies specific to human neuronal voltage-dependent calcium channel subunits." Brain Research. Brain Research Protocols **1**(3): 307-319.

Becker, M., A. Cotena, et al. (2006). "Expression of the class A macrophage scavenger receptor on specific subpopulations of murine dendritic cells limits their endotoxin response." Eur J Immunol **36**(4): 950-960.

Beeson, D., O. Higuchi, et al. (2006). "Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junction synaptopathy." Science **313**(5795): 1975-1978.

Belkaid, Y., B. Butcher, et al. (1998). "Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in Leishmania-infected cells." Eur J Immunol **28**(4): 1389-1400.

Belkaid, Y., K. F. Hoffmann, et al. (2001). "The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of Leishmania major in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure." J Exp Med **194**(10): 1497-1506.

Belosevic, M., D. S. Finbloom, et al. (1989). "Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with Leishmania major." J Immunol **143**(1): 266-274.

Berg, K. L., K. A. Siminovitch, et al. (1999). "SHP-1 regulation of p62(DOK) tyrosine phosphorylation in macrophages." J Biol Chem **274**(50): 35855-35865.

Berger, A. H., M. Niki, et al. (2010). "Identification of DOK genes as lung tumor suppressors." Nat Genet **42**(3): 216-223.

Bertholet, S., H. L. Dickensheets, et al. (2003). "Leishmania donovani-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation." Infect Immun **71**(4): 2095-2101.

Beyenbach, K. W. and H. Wieczorek (2006). "The V-type H+ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation." J Exp Biol **209**(Pt 4): 577-589.

Bhardwaj, N., L. E. Rosas, et al. (2005). "Leishmania inhibits STAT1-mediated IFN-gamma signaling in macrophages: increased tyrosine phosphorylation of dominant negative STAT1beta by Leishmania mexicana." Int J Parasitol **35**(1): 75-82.

Bhardwaj, S., N. Srivastava, et al. (2010). "Leishmania interferes with host cell signaling to devise a survival strategy." J Biomed Biotechnol **2010**: 109189.

Blanchette, J., N. Racette, et al. (1999). "Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-

gamma-triggered JAK2 activation." European Journal of Immunology **29**(11): 3737-3744.

Blanchette, J., N. Racette, et al. (1999). "Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation." Eur J Immunol **29**(11): 3737-3744.

Bogdan, C., N. Donhauser, et al. (2000). "Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis." J Exp Med **191**(12): 2121-2130.

Bogdan, C. and M. Rollinghoff (1998). "The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion." Int J Parasitol **28**(1): 121-134.

Bordier, C., R. J. Etges, et al. (1986). "Leishmania and Trypanosoma surface glycoproteins have a common glycophospholipid membrane anchor." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(16): 5988-5991.

Botelho, R. J. and S. Grinstein (2011). "Phagocytosis." Curr Biol **21**(14): R533-538.

Boulais, J., M. Trost, et al. (2010). "Molecular characterization of the evolution of phagosomes." Molecular Systems Biology **6**: 423.

Boulay, I., J. G. Nemorin, et al. (2005). "Phosphotyrosine binding-mediated oligomerization of downstream of tyrosine kinase (Dok)-1 and Dok-2 is involved in CD2-induced Dok phosphorylation." J Immunol **175**(7): 4483-4489.

Boulton, T. G. and M. H. Cobb (1991). "Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies." Cell Regul **2**(5): 357-371.

Boulton, T. G., S. H. Nye, et al. (1991). "ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF." Cell **65**(4): 663-675.

Bouvier, J., R. J. Etges, et al. (1985). "Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of Leishmania promastigotes." J Biol Chem **260**(29): 15504-15509.

Bouvier, J., P. Schneider, et al. (1990). "Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of Leishmania." Biochemistry **29**(43): 10113-10119.

BRENDA. (2011). "Leishmanolysin." from http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.4.24.36.

Breton, A. and A. Descoteaux (2000). "Protein kinase C-alpha participates in FcgammaR-mediated phagocytosis in macrophages." Biochemical and Biophysical Research Communications **276**(2): 472-476.

Brittingham, A., C. J. Morrison, et al. (1995). "Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis." J Immunol **155**(6): 3102-3111.

Brown, E. J. (1991). "Complement receptors and phagocytosis." Curr Opin Immunol **3**(1): 76-82.

Brown, G. E., M. Q. Stewart, et al. (2003). "A novel assay system implicates PtdIns(3,4)P(2), PtdIns(3)P, and PKC delta in intracellular production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase." Mol Cell **11**(1): 35-47.

Bruhns, P., B. Iannascoli, et al. (2009). "Specificity and affinity of human Fcgamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses." Blood **113**(16): 3716-3725.

Bruns, H., F. Stegelmann, et al. (2012). "Abelson tyrosine kinase controls phagosomal acidification required for killing of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages." J Immunol **189**(8): 4069-4078.

Buchmuller-Rouiller, Y. and J. Mauel (1987). "Impairment of the oxidative metabolism of mouse peritoneal macrophages by intracellular Leishmania spp." Infect Immun **55**(3): 587-593.

Campbell, S. L., R. Khosravi-Far, et al. (1998). "Increasing complexity of Ras signaling." Oncogene **17**(11 Reviews): 1395-1413.

Caron, E. and A. Hall (1998). "Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases." Science **282**(5394): 1717-1721.

Carpino, N., D. Wisniewski, et al. (1997). "p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells." Cell **88**(2): 197-204.

Carrera, L., R. T. Gazzinelli, et al. (1996). "Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice." J Exp Med **183**(2): 515-526.

Carroll, M. C. (1998). "The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity." Annu Rev Immunol **16**: 545-568.

CDC. (2013). "Leishmaniasis." from http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/.

Chakraborty, D., S. Banerjee, et al. (2005). "Leishmania donovani affects antigen presentation of macrophage by disrupting lipid rafts." J Immunol **175**(5): 3214-3224.

Chang, C. S. and K. P. Chang (1986). "Monoclonal antibody affinity purification of a Leishmania membrane glycoprotein and its inhibition of leishmania-macrophage binding." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(1): 100-104.

Chang, K. P. and D. M. Dwyer (1976). "Multiplication of a human parasite (Leishmania donovani) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro." Science **193**(4254): 678-680.

Chang, K. P. and B. S. McGwire (2002). "Molecular determinants and regulation of Leishmania virulence." Kinetoplastid Biol Dis **1**(1): 1.

Charest, H. and G. Matlashewski (1994). "Developmental gene expression in Leishmania donovani: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene." Mol Cell Biol **14**(5): 2975-2984.

Chatelain, R., K. Varkila, et al. (1992). "IL-4 induces a Th2 response in Leishmania major-infected mice." J Immunol **148**(4): 1182-1187.

Chaudhuri, G. and K. P. Chang (1988). "Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from Leishmania mexicana promastigotes." Mol Biochem Parasitol **27**(1): 43-52.

Chaudhuri, G., M. Chaudhuri, et al. (1989). "Surface acid proteinase (gp63) of Leishmania mexicana. A metalloenzyme capable of protecting liposome-

encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages." J Biol Chem **264**(13): 7483-7489.

Chimini, G. and P. Chavrier (2000). "Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment." Nat Cell Biol **2**(10): E191-196.

Cong, F., B. Yuan, et al. (1999). "Characterization of a novel member of the DOK family that binds and modulates Abl signaling." Mol Cell Biol **19**(12): 8314-8325.

Contreras, I., M. A. Gomez, et al. (2010). "Leishmania-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63." PLoS Pathog **6**(10): e1001148.

Contreras, I., M. A. Gomez, et al. (2010). "Leishmania-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63." PLoS Pathogens **6**(10): e1001148.

Corradin, S., A. Ransijn, et al. (1999). "MARCKS-related protein (MRP) is a substrate for the Leishmania major surface protease leishmanolysin (gp63)." Journal of Biological Chemistry **274**(36): 25411-25418.

Courret, N., C. Frehel, et al. (2002). "Biogenesis of Leishmania-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites." J Cell Sci **115**(Pt 11): 2303-2316.

Courret, N., E. Prina, et al. (1999). "Presentation of the Leishmania antigen LACK by infected macrophages is dependent upon the virulence of the phagocytosed parasites." Eur J Immunol **29**(3): 762-773.

Cox, D., P. Chang, et al. (1997). "Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes." J Exp Med **186**(9): 1487-1494.

Crowder, R. J., H. Enomoto, et al. (2004). "Dok-6, a Novel p62 Dok family member, promotes Ret-mediated neurite outgrowth." J Biol Chem **279**(40): 42072-42081.

Crowley, M. T., P. S. Costello, et al. (1997). "A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcgamma receptors on macrophages." J Exp Med **186**(7): 1027-1039.

Da Silva, R. P., B. F. Hall, et al. (1989). "CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective Leishmania major metacyclic promastigotes to human macrophages." J Immunol **143**(2): 617-622.

De Almeida, M. C., S. A. Cardoso, et al. (2003). "Leishmania (Leishmania) chagasi infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage." Int J Parasitol **33**(2): 153-162.

de Chastellier, C. and L. Thilo (1997). "Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle." Eur J Cell Biol **74**(1): 49-62.

De Souza Leao, S., T. Lang, et al. (1995). "Intracellular Leishmania amazonensis amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells." J Cell Sci **108 (Pt 10)**: 3219-3231.

de Veer, M. J., J. M. Curtis, et al. (2003). "MyD88 is essential for clearance of Leishmania major: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling." Eur J Immunol **33**(10): 2822-2831.

DeClue, J. E., W. C. Vass, et al. (1993). "Functional role of GTPase-activating protein in cell transformation by pp60v-src." Mol Cell Biol **13**(11): 6799-6809.

Dermine, J. F., G. Goyette, et al. (2005). "Leishmania donovani lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages." Cell Microbiol **7**(9): 1263-1270.

Dermine, J. F., S. Scianimanico, et al. (2000). "Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis." Cell Microbiol **2**(2): 115-126.

Descoteaux, A. and G. Matlashewski (1989). "c-fos and tumor necrosis factor gene expression in Leishmania donovani-infected macrophages." Molecular and Cellular Biology **9**(11): 5223-5227.

Descoteaux, A. and G. Matlashewski (1989). "c-fos and tumor necrosis factor gene expression in Leishmania donovani-infected macrophages." Mol Cell Biol **9**(11): 5223-5227.

Descoteaux, A., G. Matlashewski, et al. (1992). "Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by Leishmania donovani lipophosphoglycan." J Immunol **149**(9): 3008-3015.

Descoteaux, A., G. Matlashewski, et al. (1992). "Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by Leishmania donovani lipophosphoglycan." Journal of Immunology **149**(9): 3008-3015.

Descoteaux, A., S. J. Turco, et al. (1991). "Leishmania donovani lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages." J Immunol **146**(8): 2747-2753.

Desjardins, M. (1995). "Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis." Trends Cell Biol **5**(5): 183-186.

Desjardins, M. and A. Descoteaux (1997). "Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan." Journal of Experimental Medicine **185**(12): 2061-2068.

Desjardins, M. and A. Descoteaux (1997). "Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan." J Exp Med **185**(12): 2061-2068.

Desjardins, M., N. N. Nzala, et al. (1997). "Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes." J Cell Sci **110 (Pt 18)**: 2303-2314.

Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **27**(5): 305-318.

Dey, R., N. Majumder, et al. (2007). "Leishmania donovani-induced ceramide as the key mediator of Akt dephosphorylation in murine macrophages: role of protein kinase Czeta and phosphatase." Infect Immun **75**(5): 2136-2142.

Di Cristofano, A., N. Carpino, et al. (1998). "Molecular cloning and characterization of p56dok-2 defines a new family of RasGAP-binding proteins." J Biol Chem **273**(9): 4827-4830.

Di Cristofano, A., M. Niki, et al. (2001). "p62(dok), a negative regulator of Ras and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity, opposes leukemogenesis by p210(bcr-abl)." J Exp Med **194**(3): 275-284.

Diefenbach, A., H. Schindler, et al. (1998). "Type 1 interferon (IFNalpha/beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite." Immunity **8**(1): 77-87.

Dogra, N., C. Warburton, et al. (2007). "Leishmania major abrogates gamma interferon-induced gene expression in human macrophages from a global perspective." Infect Immun **75**(7): 3506-3515.

Dong, S., B. Corre, et al. (2006). "T cell receptor for antigen induces linker for activation of T cell-dependent activation of a negative signaling complex involving Dok-2, SHIP-1, and Grb-2." J Exp Med **203**(11): 2509-2518.

Dunant, N. M., D. Wisniewski, et al. (2000). "The phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP1 associates with the dok1 phosphoprotein in bcr-Abl transformed cells." Cell Signal **12**(5): 317-326.

Dunne, D. W., D. Resnick, et al. (1994). "The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(5): 1863-1867.

Ellis, C., M. Moran, et al. (1990). "Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases." Nature **343**(6256): 377-381.

Elomaa, O., M. Kangas, et al. (1995). "Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages." Cell **80**(4): 603-609.

Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**(6916): 629-635.

Favre, C., A. Gerard, et al. (2003). "DOK4 and DOK5: new Dok-related genes expressed in human T cells." Genes Immun **4**(1): 40-45.

Ferracini, M., J. O. Martins, et al. (2010). "Impaired phagocytosis by alveolar macrophages from diabetic rats is related to the deficient coupling of LTs to the Fc gamma R signaling cascade." Mol Immunol **47**(11-12): 1974-1980.

Fitzer-Attas, C. J., M. Lowry, et al. (2000). "Fcgamma receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn." J Exp Med **191**(4): 669-682.

Forget, G., D. J. Gregory, et al. (2005). "Proteasome-mediated degradation of STAT1alpha following infection of macrophages with Leishmania donovani." J Biol Chem **280**(34): 30542-30549.

Forget, G., D. J. Gregory, et al. (2006). "Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in Leishmania donovani-induced inhibition of nitric oxide production." Infect Immun **74**(11): 6272-6279.

Forget, G., K. A. Siminovitch, et al. (2001). "Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine leishmaniasis." Eur J Immunol **31**(11): 3185-3196.

Forman-Kay, J. D. and T. Pawson (1999). "Diversity in protein recognition by PTB domains." Curr Opin Struct Biol **9**(6): 690-695.

Fruth, U., N. Solioz, et al. (1993). "Leishmania major interferes with antigen presentation by infected macrophages." J Immunol **150**(5): 1857-1864.

Gabriel, C., W. R. McMaster, et al. (2010). "Leishmania donovani promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps." J Immunol **185**(7): 4319-4327.

Gantt, K. R., T. L. Goldman, et al. (2001). "Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of Leishmania chagasi." J Immunol **167**(2): 893-901.

Garcia, M. R., S. Graham, et al. (1997). "Epitope cleavage by Leishmania endopeptidase(s) limits the efficiency of the exogenous pathway of major histocompatibility complex class I-associated antigen presentation." Eur J Immunol **27**(4): 1005-1013.

Garcia-Garcia, E. and C. Rosales (2002). "Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis." Journal of Leukocyte Biology **72**(6): 1092-1108.

Garner, R. E., K. Rubanowice, et al. (1994). "Secretion of TNF-alpha by alveolar macrophages in response to Candida albicans mannan." J Leukoc Biol **55**(2): 161-168.

Gazi, U. and L. Martinez-Pomares (2009). "Influence of the mannose receptor in host immune responses." Immunobiology **214**(7): 554-561.

Gerard, A., M. Ghiotto, et al. (2009). "Dok-4 is a novel negative regulator of T cell activation." J Immunol **182**(12): 7681-7689.

Ghazizadeh, S., J. B. Bolen, et al. (1994). "Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells." J Biol Chem **269**(12): 8878-8884.

Ghosh, S., S. Bhattacharyya, et al. (2001). "Generation of ceramide in murine macrophages infected with Leishmania donovani alters macrophage signaling events and aids intracellular parasitic survival." Mol Cell Biochem **223**(1-2): 47-60.

Ghosh, S., S. Bhattacharyya, et al. (2002). "Leishmania donovani suppresses activated protein 1 and NF-kappaB activation in host macrophages via ceramide generation: involvement of extracellular signal-regulated kinase." Infect Immun **70**(12): 6828-6838.

Gilfillan, A. M. and J. Rivera (2009). "The tyrosine kinase network regulating mast cell activation." Immunol Rev **228**(1): 149-169.

Gillooly, D. J., A. Simonsen, et al. (2001). "Phosphoinositides and phagocytosis." J Cell Biol **155**(1): 15-17.

Giorgione, J. R., S. J. Turco, et al. (1996). "Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from Leishmania donovani." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11634-11639.

Gomez, C. P., M. Tiemi Shio, et al. (2012). "The protein tyrosine phosphatase SHP-1 regulates phagolysosome biogenesis." Journal of Immunology **189**(5): 2203-2210.

Gomez, M. A., I. Contreras, et al. (2009). "Leishmania GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases." Sci Signal **2**(90): ra58.

Gomez, M. A. and M. Olivier (2010). "Proteases and phosphatases during Leishmania-macrophage interaction: paving the road for pathogenesis." Virulence **1**(4): 314-318.

Gordon, S., L. Lawson, et al. (1992). "Antigen markers of macrophage differentiation in murine tissues." Curr Top Microbiol Immunol **181**: 1-37.

Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol **5**(12): 953-964.

Green, S. J., R. M. Crawford, et al. (1990). "Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha." J Immunol **145**(12): 4290-4297.

Green, S. J., M. S. Meltzer, et al. (1990). "Activated macrophages destroy intracellular Leishmania major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism." Journal of Immunology **144**(1): 278-283.

Green, S. J., M. S. Meltzer, et al. (1990). "Activated macrophages destroy intracellular Leishmania major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism." J Immunol **144**(1): 278-283.

Gregory, D. J., M. Godbout, et al. (2008). "A novel form of NF-kappaB is induced by Leishmania infection: involvement in macrophage gene expression." Eur J Immunol **38**(4): 1071-1081.

Gregory, D. J. and M. Olivier (2005). "Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite Leishmania." Parasitology **130 Suppl**: S27-35.

Gresham, H. D., B. M. Dale, et al. (2000). "Negative regulation of phagocytosis in murine macrophages by the Src kinase family member, Fgr." J Exp Med **191**(3): 515-528.

Griffin, F. M., Jr. and P. J. Mullinax (1985). "In vivo activation of macrophage C3 receptors for phagocytosis." J Exp Med **162**(1): 352-357.

Grimm, J., M. Sachs, et al. (2001). "Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation." J Cell Biol **154**(2): 345-354.

Gu, H., R. J. Botelho, et al. (2003). "Critical role for scaffolding adapter Gab2 in Fc gamma R-mediated phagocytosis." J Cell Biol **161**(6): 1151-1161.

Gugasyan, R., C. Quilici, et al. (2002). "Dok-related protein negatively regulates T cell development via its RasGTPase-activating protein and Nck docking sites." J Cell Biol **158**(1): 115-125.

Guittard, G., A. Gerard, et al. (2009). "Cutting edge: Dok-1 and Dok-2 adaptor molecules are regulated by phosphatidylinositol 5-phosphate production in T cells." J Immunol **182**(7): 3974-3978.

Hackstadt, T. and J. C. Williams (1981). "Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by Coxiella burnetii." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(5): 3240-3244.

Halle, M., M. A. Gomez, et al. (2009). "The Leishmania surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation." Journal of Biological Chemistry **284**(11): 6893-6908.

Halle, M., M. A. Gomez, et al. (2009). "The Leishmania surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation." J Biol Chem **284**(11): 6893-6908.

Hallock, P. T., C. F. Xu, et al. (2010). "Dok-7 regulates neuromuscular synapse formation by recruiting Crk and Crk-L." Genes Dev **24**(21): 2451-2461.

Han, M. Y., H. Kosako, et al. (2007). "Extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase regulates actin organization and cell motility by phosphorylating the actin cross-linking protein EPLIN." Mol Cell Biol **27**(23): 8190-8204.

Hannun, Y. A. (1996). "Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress." Science **274**(5294): 1855-1859.

Hannun, Y. A. and L. M. Obeid (1995). "Ceramide: an intracellular signal for apoptosis." Trends Biochem Sci **20**(2): 73-77.

Hatzigeorgiou, D. E., J. Geng, et al. (1996). "Lipophosphoglycan from Leishmania suppresses agonist-induced interleukin 1 beta gene expression in human monocytes via a unique promoter sequence." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14708-14713.

Heinsbroek, S. E., L. A. Kamen, et al. (2009). "Actin and phosphoinositide recruitment to fully formed Candida albicans phagosomes in mouse macrophages." J Innate Immun **1**(3): 244-253.

Hey, A. S., T. G. Theander, et al. (1994). "The major surface glycoprotein (gp63) from Leishmania major and Leishmania donovani cleaves CD4 molecules on human T cells." J Immunol **152**(9): 4542-4548.

Hiragun, T., Z. Peng, et al. (2005). "Dexamethasone up-regulates the inhibitory adaptor protein Dok-1 and suppresses downstream activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in antigen-stimulated RBL-2H3 mast cells." Mol Pharmacol **67**(3): 598-603.

Hoebe, K., P. Georgel, et al. (2005). "CD36 is a sensor of diacylglycerides." Nature **433**(7025): 523-527.

Hollifield, M., E. Bou Ghanem, et al. (2007). "Scavenger receptor A dampens induction of inflammation in response to the fungal pathogen Pneumocystis carinii." Infect Immun **75**(8): 3999-4005.

Holm, A., K. Tejle, et al. (2003). "Role of protein kinase C alpha for uptake of unopsonized prey and phagosomal maturation in macrophages." Biochem Biophys Res Commun **302**(4): 653-658.

Holm, A., K. Tejle, et al. (2001). "Leishmania donovani lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKCalpha and defective phagosome maturation." Cell Microbiol **3**(7): 439-447.

Honma, M., O. Higuchi, et al. (2006). "Dok-3 sequesters Grb2 and inhibits the Ras-Erk pathway downstream of protein-tyrosine kinases." Genes Cells **11**(2): 143-151.

Honma, M., O. Higuchi, et al. (2006). "Dok-3 sequesters Grb2 and inhibits the Ras-Erk pathway downstream of protein-tyrosine kinases." Genes to Cells **11**(2): 143-151.

Hosooka, T., T. Noguchi, et al. (2008). "Dok1 mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and obesity through modulation of PPAR-gamma phosphorylation." Nat Med **14**(2): 188-193.

Hughes, P. E. and M. Pfaff (1998). "Integrin affinity modulation." Trends Cell Biol **8**(9): 359-364.

Huynh, K. K., E. L. Eskelinen, et al. (2007). "LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes." EMBO J **26**(2): 313-324.

Igarashi, K., G. Garotta, et al. (1994). "Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor." J Biol Chem **269**(20): 14333-14336.

Ilg, T., M. Demar, et al. (2001). "Phosphoglycan repeat-deficient Leishmania mexicana parasites remain infectious to macrophages and mice." J Biol Chem **276**(7): 4988-4997.

Ilgoutz, S. C. and M. J. McConville (2001). "Function and assembly of the Leishmania surface coat." Int J Parasitol **31**(9): 899-908.

Inoue, A., K. Setoguchi, et al. (2009). "Dok-7 activates the muscle receptor kinase MuSK and shapes synapse formation." Sci Signal **2**(59): ra7.

Inoue, A., T. Yasuda, et al. (2007). "Dok-1 is a positive regulator of IL-4 signalling and IgE response." J Biochem **142**(2): 257-263.

Irschick, E. U., G. Haas, et al. (2009). "Involvement of protein kinase C in phagocytosis of human retinal pigment epithelial cells and induction of matrix metalloproteinase secretion." Int Ophthalmol **29**(5): 333-341.

Isnard, A., M. T. Shio, et al. (2012). "Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling." Front Cell Infect Microbiol **2**: 72.

Janeway, C. A., Jr. (1992). "The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self." Immunol Today **13**(1): 11-16.

Jaramillo, M., M. A. Gomez, et al. (2011). "Leishmania repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection." Cell Host and Microbe **9**(4): 331-341.

Jaramillo, M., M. A. Gomez, et al. (2011). "Leishmania repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection." Cell Host Microbe **9**(4): 331-341.

Jeannin, P., B. Bottazzi, et al. (2005). "Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors." Immunity **22**(5): 551-560.

Joshi, P. B., B. L. Kelly, et al. (2002). "Targeted gene deletion in Leishmania major identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor." Molecular and Biochemical Parasitology **120**(1): 33-40.

Jutras, I. and M. Desjardins (2005). "Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 511-527.

Kagan, J. C. (2012). "Signaling organelles of the innate immune system." Cell **151**(6): 1168-1178.

Kamen, L. A., J. Levinsohn, et al. (2008). "SHIP-1 increases early oxidative burst and regulates phagosome maturation in macrophages." J Immunol **180**(11): 7497-7505.

Kane, M. M. and D. M. Mosser (2001). "The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis." J Immunol **166**(2): 1141-1147.

Kannan, S., A. Audet, et al. (2008). "Cholesterol-rich membrane rafts and Lyn are involved in phagocytosis during Pseudomonas aeruginosa infection." J Immunol **180**(4): 2396-2408.

Kaye, P. M., N. J. Rogers, et al. (1994). "Deficient expression of co-stimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages." Eur J Immunol **24**(11): 2850-2854.

Kepley, C. L., S. Taghavi, et al. (2004). "Co-aggregation of FcgammaRII with FcepsilonRI on human mast cells inhibits antigen-induced secretion and involves SHIP-Grb2-Dok complexes." Journal of Biological Chemistry **279**(34): 35139-35149.

Kepley, C. L., S. Taghavi, et al. (2004). "Co-aggregation of FcgammaRII with FcepsilonRI on human mast cells inhibits antigen-induced secretion and involves SHIP-Grb2-Dok complexes." J Biol Chem **279**(34): 35139-35149.

Kiefer, F., J. Brumell, et al. (1998). "The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fcgamma receptor signaling in macrophages and neutrophils." Mol Cell Biol **18**(7): 4209-4220.

Kima, P. E. (2007). "The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist." Int J Parasitol **37**(10): 1087-1096.

Kima, P. E., L. Soong, et al. (1996). "Leishmania-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4+ T cells." Eur J Immunol **26**(12): 3163-3169.

Kopf, M., F. Brombacher, et al. (1996). "IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with Leishmania major." J Exp Med **184**(3): 1127-1136.

Kweider, M., J. L. Lemesre, et al. (1987). "Infectivity of Leishmania braziliensis promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65,000-dalton surface antigen." J Immunol **138**(1): 299-305.

Kweider, M., J. L. Lemesre, et al. (1989). "Development of metacyclic Leishmania promastigotes is associated with the increasing expression of GP65, the major surface antigen." Parasite Immunol **11**(3): 197-209.

Kyaw, M., M. Yoshizumi, et al. (2004). "Src and Cas are essentially but differentially involved in angiotensin II-stimulated migration of vascular smooth muscle cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun NH2-terminal kinase activation." Mol Pharmacol **65**(4): 832-841.

Lang, T., R. Hellio, et al. (1994). "Leishmania donovani-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation." J Cell Sci **107 (Pt 8)**: 2137-2150.

Larsen, E. C., T. Ueyama, et al. (2002). "A role for PKC-epsilon in Fc gammaR-mediated phagocytosis by RAW 264.7 cells." J Cell Biol **159**(6): 939-944.

Larsson, M., J. F. Fonteneau, et al. (2001). "Efficiency of cross presentation of vaccinia virus-derived antigens by human dendritic cells." Eur J Immunol **31**(12): 3432-3442.

Latour, S., G. Gish, et al. (2001). "Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product." Nat Immunol **2**(8): 681-690.

Latour, S., R. Roncagalli, et al. (2003). "Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation." Nat Cell Biol **5**(2): 149-154.

Le Roy, C. and J. L. Wrana (2005). "Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(2): 112-126.

Lee, W. L., R. E. Harrison, et al. (2003). "Phagocytosis by neutrophils." Microbes Infect **5**(14): 1299-1306.

Leishman, W. B. (1903). "On the possibility of the occurrence of trypanomiasis in India." The British Medical Journal: 1252-1254.

Lemay, S., D. Davidson, et al. (2000). "Dok-3, a novel adapter molecule involved in the negative regulation of immunoreceptor signaling." Mol Cell Biol **20**(8): 2743-2754.

Lemay, S., D. Davidson, et al. (2000). "Dok-3, a novel adapter molecule involved in the negative regulation of immunoreceptor signaling." Molecular and Cellular Biology **20**(8): 2743-2754.

Lemmon, M. A. (2008). "Membrane recognition by phospholipid-binding domains." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(2): 99-111.

Lemmon, M. A. and K. M. Ferguson (2000). "Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains." Biochem J **350 Pt 1**: 1-18.

Lieke, T., S. Nylen, et al. (2008). "Leishmania surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation." Clin Exp Immunol **153**(2): 221-230.

Liew, F. Y., Y. Li, et al. (1991). "Resistance to Leishmania major infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages." Eur J Immunol **21**(12): 3009-3014.

Liew, F. Y., S. Millott, et al. (1990). "Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine." J Immunol **144**(12): 4794-4797.

Limmon, G. V., M. Arredouani, et al. (2008). "Scavenger receptor class-A is a novel cell surface receptor for double-stranded RNA." FASEB J **22**(1): 159-167.

Lippuner, C., D. Paape, et al. (2009). "Real-time imaging of Leishmania mexicana-infected early phagosomes: a study using primary macrophages generated from green fluorescent protein-Rab5 transgenic mice." FASEB J **23**(2): 483-491.

Lodge, R. and A. Descoteaux (2005). "Leishmania donovani promastigotes induce periphagosomal F-actin accumulation through retention of the GTPase Cdc42." Cell Microbiol **7**(11): 1647-1658.

Lodge, R. and A. Descoteaux (2005). "Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of Leishmania." Clin Immunol **114**(3): 256-265.

Lodge, R. and A. Descoteaux (2006). "Phagocytosis of Leishmania donovani amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation." Eur J Immunol **36**(10): 2735-2744.

Lodge, R., T. O. Diallo, et al. (2006). "Leishmania donovani lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane." Cell Microbiol **8**(12): 1922-1931.

Lowell, C. A. (2004). "Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling." Mol Immunol **41**(6-7): 631-643.

Luo, Y., J. W. Pollard, et al. (2010). "Fcgamma receptor cross-linking stimulates cell proliferation of macrophages via the ERK pathway." J Biol Chem **285**(6): 4232-4242.

Marshall, J. G., J. W. Booth, et al. (2001). "Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis." J Cell Biol **153**(7): 1369-1380.

Martelli, M. P., J. Boomer, et al. (2001). "T cell regulation of p62(dok) (Dok1) association with Crk-L." J Biol Chem **276**(49): 45654-45661.

Martinez-Pomares, L. (2012). "The mannose receptor." J Leukoc Biol.

Martinez-Pomares, L., D. Wienke, et al. (2006). "Carbohydrate-independent recognition of collagens by the macrophage mannose receptor." Eur J Immunol **36**(5): 1074-1082.

Martinez-Salazar, B., M. Berzunza-Cruz, et al. (2008). "[Leishmania mexicana DNA activates murine macrophages and increases their TLR9 expression]." Gac Med Mex **144**(2): 99-104.

Mashima, R., Y. Hishida, et al. (2009). "The roles of Dok family adapters in immunoreceptor signaling." Immunol Rev **232**(1): 273-285.

Mashima, R., K. Honda, et al. (2010). "Mice lacking Dok-1, Dok-2, and Dok-3 succumb to aggressive histiocytic sarcoma." Lab Invest **90**(9): 1357-1364.

Master, Z., J. Tran, et al. (2003). "Dok-R binds c-Abl and regulates Abl kinase activity and mediates cytoskeletal reorganization." J Biol Chem **278**(32): 30170-30179.

Mathias, S., L. A. Pena, et al. (1998). "Signal transduction of stress via ceramide." Biochem J **335 (Pt 3)**: 465-480.

Matlashewski, G. (2001). "Leishmania infection and virulence." Med Microbiol Immunol **190**(1-2): 37-42.

Matte, C. and A. Descoteaux (2010). "Leishmania donovani amastigotes impair gamma interferon-induced STAT1alpha nuclear translocation by blocking the interaction between STAT1alpha and importin-alpha5." Infect Immun **78**(9): 3736-3743.

Matte, C. and A. Descoteaux (2010). "Leishmania donovani amastigotes impair gamma interferon-induced STAT1alpha nuclear translocation by blocking the interaction between STAT1alpha and importin-alpha5." Infection and Immunity **78**(9): 3736-3743.

Matte, C., J. Mallégol, et al. (2009). Leishmania: L. Mexicana vs. Donovani vs. Major; Amastigotes vs. Promastigotes. Intracellular Niches of Microbes, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 583-595.

Matte, C., J. F. Marquis, et al. (2000). "Peroxovanadium-mediated protection against murine leishmaniasis: role of the modulation of nitric oxide." Eur J Immunol **30**(9): 2555-2564.

May, R. C. and L. M. Machesky (2001). "Phagocytosis and the actin cytoskeleton." Journal of Cell Science **114**(Pt 6): 1061-1077.

McConville, M. J. and J. M. Blackwell (1991). "Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of Leishmania donovani. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids." J Biol Chem **266**(23): 15170-15179.

McConville, M. J., L. F. Schnur, et al. (1995). "Structure of Leishmania lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species." Biochem J **310 (Pt 3)**: 807-818.

McGilvray, I. D., L. Serghides, et al. (2000). "Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance." Blood **96**(9): 3231-3240.

McGwire, B. S., K. P. Chang, et al. (2003). "Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan Leishmania is enhanced by surface metalloprotease gp63." Infect Immun **71**(2): 1008-1010.

McGwire, B. S., W. A. O'Connell, et al. (2002). "Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked Leishmania surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence." J Biol Chem **277**(11): 8802-8809.

McNeely, T. B., G. Rosen, et al. (1989). "Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite Leishmania." Biochem J **259**(2): 601-604.

Medina-Acosta, E., R. E. Karess, et al. (1993). "Structurally distinct genes for the surface protease of Leishmania mexicana are developmentally regulated." Mol Biochem Parasitol **57**(1): 31-45.

Medina-Acosta, E., R. E. Karess, et al. (1989). "The promastigote surface protease (gp63) of Leishmania is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage." Mol Biochem Parasitol **37**(2): 263-273.

Meier, C. L., M. Svensson, et al. (2003). "Leishmania-induced inhibition of macrophage antigen presentation analyzed at the single-cell level." J Immunol **171**(12): 6706-6713.

Melby, P. C., A. Tabares, et al. (2001). "Leishmania donovani: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection." Exp Parasitol **99**(1): 17-25.

Mercier, P. L., M. Bachvarova, et al. (2011). "Characterization of DOK1, a candidate tumor suppressor gene, in epithelial ovarian cancer." Mol Oncol **5**(5): 438-453.

Miao, L., A. Stafford, et al. (1995). "Potent inhibition of viral fusion by the lipophosphoglycan of Leishmania donovani." Biochemistry **34**(14): 4676-4683.

Michel, F., G. Attal-Bonnefoy, et al. (2001). "CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities." Immunity **15**(6): 935-945.

Miller, R. A., S. G. Reed, et al. (1990). "Leishmania gp63 molecule implicated in cellular adhesion lacks an Arg-Gly-Asp sequence." Mol Biochem Parasitol **39**(2): 267-274.

Moradin, N. and A. Descoteaux (2012). "Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages." Front Cell Infect Microbiol **2**: 121.

Morehead, J., I. Coppens, et al. (2002). "Opsonization modulates Rac-1 activation during cell entry by Leishmania amazonensis." Infect Immun **70**(8): 4571-4580.

Mosser, D. M. and P. J. Edelson (1985). "The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of Leishmania promastigotes." J Immunol **135**(4): 2785-2789.

Mosser, D. M. and P. J. Edelson (1987). "The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of Leishmania major." Nature **327**(6120): 329-331.

Mosser, D. M. and L. A. Rosenthal (1993). "Leishmania-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses." Semin Cell Biol **4**(5): 315-322.

Mukbel, R. M., C. Patten, Jr., et al. (2007). "Macrophage killing of Leishmania amazonensis amastigotes requires both nitric oxide and superoxide." Am J Trop Med Hyg **76**(4): 669-675.

Mukhopadhyay, S. and S. Gordon (2004). "The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity." Immunobiology **209**(1-2): 39-49.

Mukhopadhyay, S. and C. Mandal (2006). "Glycobiology of Leishmania donovani." Indian J Med Res **123**(3): 203-220.

Muller, J. S., C. D. Jepson, et al. (2010). "Dok-7 promotes slow muscle integrity as well as neuromuscular junction formation in a zebrafish model of congenital myasthenic syndromes." Hum Mol Genet **19**(9): 1726-1740.

Murphy, J. E., P. R. Tedbury, et al. (2005). "Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors." Atherosclerosis **182**(1): 1-15.

Murray, H. W., H. Masur, et al. (1982). "Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. I. Correlation between resistance to Leishmania donovani and lymphokine-generating capacity." J Immunol **129**(1): 344-350.

Murray, H. W. and C. F. Nathan (1999). "Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral Leishmania donovani." J Exp Med **189**(4): 741-746.

Myers, M. P., J. N. Andersen, et al. (2001). "TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B." J Biol Chem **276**(51): 47771-47774.

Nandan, D., R. Lo, et al. (1999). "Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-FOS and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with Leishmania donovani." Infect Immun **67**(8): 4055-4063.

Nandan, D. and N. E. Reiner (1995). "Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with Leishmania donovani: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1." Infection and Immunity **63**(11): 4495-4500.

Nemorin, J. G. and P. Duplay (2000). "Evidence that Lick-mediated phosphorylation of p56dok and p62dok may play a role in CD2 signaling." J Biol Chem **275**(19): 14590-14597.

Nemorin, J. G., P. Laporte, et al. (2001). "p62dok negatively regulates CD2 signaling in Jurkat cells." J Immunol **166**(7): 4408-4415.

Neumann, K., T. Oellerich, et al. (2011). "Fc gamma receptor IIb modulates the molecular Grb2 interaction network in activated B cells." Cell Signal **23**(5): 893-900.

Ng, C. H., S. Xu, et al. (2007). "Dok-3 plays a nonredundant role in negative regulation of B-cell activation." Blood **110**(1): 259-266.

Niki, M., A. Di Cristofano, et al. (2004). "Role of Dok-1 and Dok-2 in leukemia suppression." J Exp Med **200**(12): 1689-1695.

Niu, Y., F. Roy, et al. (2006). "A nuclear export signal and phosphorylation regulate Dok1 subcellular localization and functions." Mol Cell Biol **26**(11): 4288-4301.

Noguchi, T., T. Matozaki, et al. (1999). "Tyrosine phosphorylation of p62(Dok) induced by cell adhesion and insulin: possible role in cell migration." EMBO J **18**(7): 1748-1760.

Nordmann, M., M. Cabrera, et al. (2010). "The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7." Curr Biol **20**(18): 1654-1659.

Novozhilova, N. M. and N. V. Bovin (2010). "Structure, functions, and biosynthesis of glycoconjugates of Leishmania spp. cell surface." Biochemistry (Mosc) **75**(6): 686-694.

Okada, K., A. Inoue, et al. (2006). "The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis." Science **312**(5781): 1802-1805.

Olazabal, I. M., E. Caron, et al. (2002). "Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcgammaR, phagocytosis." Curr Biol **12**(16): 1413-1418.

Olivier, M., V. D. Atayde, et al. (2012). "Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63." Microbes and Infection **14**(15): 1377-1389.

Olivier, M., V. D. Atayde, et al. (2012). "Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63." Microbes Infect.

Olivier, M., K. G. Baimbridge, et al. (1992). "Stimulus-response coupling in monocytes infected with Leishmania. Attenuation of calcium transients is related to defective agonist-induced accumulation of inositol phosphates." J Immunol **148**(4): 1188-1196.

Olivier, M., R. W. Brownsey, et al. (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**(16): 7481-7485.

Olivier, M., D. J. Gregory, et al. (2005). "Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view." Clin Microbiol Rev **18**(2): 293-305.

Olivier, M., B. J. Romero-Gallo, et al. (1998). "Modulation of interferon-gamma-induced macrophage activation by phosphotyrosine phosphatases inhibition. Effect on murine Leishmaniasis progression." J Biol Chem **273**(22): 13944-13949.

Ono, K. and J. Han (2000). "The p38 signal transduction pathway: activation and function." Cell Signal **12**(1): 1-13.

Ott, V. L., I. Tamir, et al. (2002). "Downstream of kinase, p62(dok), is a mediator of Fc gamma IIB inhibition of Fc epsilon RI signaling." J Immunol **168**(9): 4430-4439.

Ozeki, Y., H. Tsutsui, et al. (2006). "Macrophage scavenger receptor down-regulates mycobacterial cord factor-induced proinflammatory cytokine production by alveolar and hepatic macrophages." Microb Pathog **40**(4): 171-176.

Parsa, K. V., J. P. Butchar, et al. (2008). "The tyrosine kinase Syk promotes phagocytosis of Francisella through the activation of Erk." Mol Immunol **45**(10): 3012-3021.

Patel, S. N., L. Serghides, et al. (2004). "CD36 mediates the phagocytosis of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by rodent macrophages." J Infect Dis **189**(2): 204-213.

Paul, A., S. Wilson, et al. (1997). "Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function." Cell Signal **9**(6): 403-410.

Peng, Q., J. L. O'Loughlin, et al. (2012). "DOK3 negatively regulates LPS responses and endotoxin tolerance." PLoS One **7**(6): e39967.

Pham, N. K., J. Mouriz, et al. (2005). "Leishmania pifanoi amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation." Infect Immun **73**(12): 8322-8333.

Phee, H., W. Rodgers, et al. (2001). "Visualization of negative signaling in B cells by quantitative confocal microscopy." Mol Cell Biol **21**(24): 8615-8625.

Piedrafita, D., L. Proudfoot, et al. (1999). "Regulation of macrophage IL-12 synthesis by Leishmania phosphoglycans." Eur J Immunol **29**(1): 235-244.

Pimenta, P. F., E. M. Saraiva, et al. (1991). "The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of Leishmania major." Exp Parasitol **72**(2): 191-204.

Pollard, J. W. (2009). "Trophic macrophages in development and disease." Nat Rev Immunol **9**(4): 259-270.

Pommier, C. G., S. Inada, et al. (1983). "Plasma fibronectin enhances phagocytosis of opsonized particles by human peripheral blood monocytes." J Exp Med **157**(6): 1844-1854.

Ponte-Sucre, A., D. Heise, et al. (2001). "Leishmania major lipophosphoglycan modulates the phenotype and inhibits migration of murine Langerhans cells." Immunology **104**(4): 462-467.

Prina, E., C. Jouanne, et al. (1993). "Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with Leishmania amazonensis amastigotes." J Immunol **151**(4): 2050-2061.

Prina, E., T. Lang, et al. (1996). "Presentation of the protective parasite antigen LACK by Leishmania-infected macrophages." J Immunol **156**(11): 4318-4327.

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**(8): 2235-2244.

Puentes, S. M., R. P. Da Silva, et al. (1990). "Serum resistance of metacyclic stage Leishmania major promastigotes is due to release of C5b-9." J Immunol **145**(12): 4311-4316.

Qadoumi, M., I. Becker, et al. (2002). "Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis." Infect Immun **70**(8): 4638-4642.

Raingeaud, J., S. Gupta, et al. (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." J Biol Chem **270**(13): 7420-7426.

Ramamoorthy, R., J. E. Donelson, et al. (1992). "Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of Leishmania donovani chagasi promastigotes to an infectious form." J Biol Chem **267**(3): 1888-1895.

Ravetch, J. V. (1997). "Fc receptors." Curr Opin Immunol **9**(1): 121-125.

Ravetch, J. V. and R. A. Clynes (1998). "Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo." Annu Rev Immunol **16**: 421-432.

Ray, M., A. A. Gam, et al. (2000). "Inhibition of interferon-gamma signaling by Leishmania donovani." J Infect Dis **181**(3): 1121-1128.

Rebecchi, M. J. and S. Scarlata (1998). "Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions." Annu Rev Biophys Biomol Struct **27**: 503-528.

Reiner, N. E. (1987). "Parasite accessory cell interactions in murine leishmaniasis. I. Evasion and stimulus-dependent suppression of the macrophage interleukin 1 response by Leishmania donovani." J Immunol **138**(6): 1919-1925.

Reiner, N. E., W. Ng, et al. (1988). "Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in Leishmania-infected macrophages." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **85**(12): 4330-4334.

Reiner, N. E., W. Ng, et al. (1988). "Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in Leishmania-infected macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(12): 4330-4334.

Reiner, N. E., W. Ng, et al. (1987). "Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. Leishmania donovani suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products." J Immunol **138**(6): 1926-1932.

Reiner, N. E., W. Ng, et al. (1987). "Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. Leishmania donovani suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products." Journal of Immunology **138**(6): 1926-1932.

Reiner, N. E., W. Ng, et al. (1990). "Modulation of in vitro monocyte cytokine responses to Leishmania donovani. Interferon-gamma prevents parasite-induced inhibition

of interleukin 1 production and primes monocytes to respond to Leishmania by producing both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1." J Clin Invest **85**(6): 1914-1924.

Reth, M. (1989). "Antigen receptor tail clue." Nature **338**(6214): 383-384.

Ridley, A. J. and A. Hall (1992). "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors." Cell **70**(3): 389-399.

Ridley, A. J., H. F. Paterson, et al. (1992). "The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling." Cell **70**(3): 401-410.

Roberts, P. J. and C. J. Der (2007). "Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer." Oncogene **26**(22): 3291-3310.

Robson, J. D., D. Davidson, et al. (2004). "Inhibition of the Jun N-terminal protein kinase pathway by SHIP-1, a lipid phosphatase that interacts with the adaptor molecule Dok-3." Molecular and Cellular Biology **24**(6): 2332-2343.

Robson, J. D., D. Davidson, et al. (2004). "Inhibition of the Jun N-terminal protein kinase pathway by SHIP-1, a lipid phosphatase that interacts with the adaptor molecule Dok-3." Mol Cell Biol **24**(6): 2332-2343.

Rodgers, W. and K. Smith (2005). "Properties of glycolipid-enriched membrane rafts in antigen presentation." Crit Rev Immunol **25**(1): 19-30.

Rodrigues, V., Jr., J. Santana da Silva, et al. (1998). "Transforming growth factor beta and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis." Infect Immun **66**(3): 1233-1236.

Rodriguez, N. E., H. K. Chang, et al. (2004). "Novel program of macrophage gene expression induced by phagocytosis of Leishmania chagasi." Infect Immun **72**(4): 2111-2122.

Ross, G. D. and V. Vetvicka (1993). "CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions." Clin Exp Immunol **92**(2): 181-184.

Rottner, K., S. Lommel, et al. (2004). "Pathogen-induced actin filament rearrangement in infectious diseases." J Pathol **204**(4): 396-406.

Russell, D. G. and H. Wilhelm (1986). "The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of Leishmania promastigotes in attachment to macrophages." J Immunol **136**(7): 2613-2620.

Saba, J. D., L. M. Obeid, et al. (1996). "Ceramide: an intracellular mediator of apoptosis and growth suppression." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **351**(1336): 233-240; discussion 240-231.

Sacks, D. L. (2001). "Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence." Cell Microbiol **3**(4): 189-196.

Saha, B., G. Das, et al. (1995). "Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity." Eur J Immunol **25**(9): 2492-2498.

Sakatsume, M., K. Igarashi, et al. (1995). "The Jak kinases differentially associate with the alpha and beta (accessory factor) chains of the interferon gamma receptor to form a functional receptor unit capable of activating STAT transcription factors." J Biol Chem **270**(29): 17528-17534.

Sattler, M., S. Verma, et al. (2001). "SHIP1, an SH2 domain containing polyinositol-5-phosphatase, regulates migration through two critical tyrosine residues and forms a novel signaling complex with DOK1 and CRKL." J Biol Chem **276**(4): 2451-2458.

Schlagenhauf, E., R. Etges, et al. (1998). "The crystal structure of the Leishmania major surface proteinase leishmanolysin (gp63)." Structure **6**(8): 1035-1046.

Schmidt, A., E. Caron, et al. (2001). "Lipopolysaccharide-induced activation of beta2-integrin function in macrophages requires Irak kinase activity, p38 mitogen-activated protein kinase, and the Rap1 GTPase." Mol Cell Biol **21**(2): 438-448.

Schneider, P., J. P. Rosat, et al. (1992). "Leishmania major: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages." Exp Parasitol **75**(2): 196-206.

Scianimanico, S., M. Desrosiers, et al. (1999). "Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by Leishmania donovani promastigotes." Cell Microbiol **1**(1): 19-32.

Sengelov, H. (1995). "Complement receptors in neutrophils." Crit Rev Immunol **15**(2): 107-131.

Shatwell, K. P. and A. W. Segal (1996). "NADPH oxidase." Int J Biochem Cell Biol **28**(11): 1191-1195.

Shi, L., J. Yue, et al. (2006). "Dok5 is substrate of TrkB and TrkC receptors and involved in neurotrophin induced MAPK activation." Cell Signal **18**(11): 1995-2003.

Shi, N., S. Ye, et al. (2004). "Structural basis for the specific recognition of RET by the Dok1 phosphotyrosine binding domain." J Biol Chem **279**(6): 4962-4969.

Shibata, Y., W. J. Metzger, et al. (1997). "Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production." J Immunol **159**(5): 2462-2467.

Shimaoka, T., T. Nakayama, et al. (2003). "Cutting edge: SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates bacterial phagocytosis by APCs through its chemokine domain." J Immunol **171**(4): 1647-1651.

Shinohara, H., A. Inoue, et al. (2005). "Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of lipopolysaccharide-induced signaling." J Exp Med **201**(3): 333-339.

Shinohara, H., T. Yasuda, et al. (2004). "Dok-1 tyrosine residues at 336 and 340 are essential for the negative regulation of Ras-Erk signalling, but dispensable for rasGAP-binding." Genes Cells **9**(6): 601-607.

Silverman, J. M., J. Clos, et al. (2010). "An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from Leishmania and communication with macrophages." Journal of Cell Science **123**(Pt 6): 842-852.

Sim, R. B. and A. Laich (2000). "Serine proteases of the complement system." Biochem Soc Trans **28**(5): 545-550.

Simoncic, P. D., A. Lee-Loy, et al. (2002). "The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3." Curr Biol **12**(6): 446-453.

Smith, A., J. Wang, et al. (2004). "High-level expression of Dok-1 in neurons of the primate prefrontal cortex and hippocampus." J Neurosci Res **75**(2): 218-224.

Smith, M. J., W. R. Hardy, et al. (2006). "Screening for PTB domain binding partners and ligand specificity using proteome-derived NPXY peptide arrays." Mol Cell Biol **26**(22): 8461-8474.

Smith-Garvin, J. E., G. A. Koretzky, et al. (2009). "T cell activation." Annu Rev Immunol **27**: 591-619.

Songyang, Z., Y. Yamanashi, et al. (2001). "Domain-dependent function of the rasGAP-binding protein p62Dok in cell signaling." J Biol Chem **276**(4): 2459-2465.

Stahl, P. D. and R. A. Ezekowitz (1998). "The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense." Curr Opin Immunol **10**(1): 50-55.

Stein, M. and S. Gordon (1991). "Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophages: role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors." Eur J Immunol **21**(2): 431-437.

Stevens, J. M., E. E. Galyov, et al. (2006). "Actin-dependent movement of bacterial pathogens." Nat Rev Microbiol **4**(2): 91-101.

Stork, B., K. Neumann, et al. (2007). "Subcellular localization of Grb2 by the adaptor protein Dok-3 restricts the intensity of Ca2+ signaling in B cells." EMBO J **26**(4): 1140-1149.

Stout, R. D. and J. Suttles (1997). "T cell signaling of macrophage function in inflammatory disease." Front Biosci **2**: d197-206.

Stoute, J. A. (2011). "Complement receptor 1 and malaria." Cell Microbiol **13**(10): 1441-1450.

Stuart, L. M., S. A. Bell, et al. (2007). "CD36 signals to the actin cytoskeleton and regulates microglial migration via a p130Cas complex." J Biol Chem **282**(37): 27392-27401.

Stuart, L. M., J. Deng, et al. (2005). "Response to Staphylococcus aureus requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain." J Cell Biol **170**(3): 477-485.

Suzu, S., M. Tanaka-Douzono, et al. (2000). "p56(dok-2) as a cytokine-inducible inhibitor of cell proliferation and signal transduction." EMBO J **19**(19): 5114-5122.

Tachado, S. D., M. M. Samrakandi, et al. (2008). "Non-opsonic phagocytosis of Legionella pneumophila by macrophages is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase." PLoS One **3**(10): e3324.

Tamir, I., J. C. Stolpa, et al. (2000). "The RasGAP-binding protein p62dok is a mediator of inhibitory FcgammaRIIB signals in B cells." Immunity **12**(3): 347-358.

Tauber, A. I. (2003). "Metchnikoff and the phagocytosis theory." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(11): 897-901.

Toker, A. and L. C. Cantley (1997). "Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase." Nature **387**(6634): 673-676.

Tolson, D. L., S. J. Turco, et al. (1990). "Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with Leishmania donovani." Infect Immun **58**(11): 3500-3507.

Trost, M., L. English, et al. (2009). "The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages." Immunity **30**(1): 143-154.

Turco, S. J. and A. Descoteaux (1992). "The lipophosphoglycan of Leishmania parasites." Annu Rev Microbiol **46**: 65-94.

Turco, S. J. and D. L. Sacks (1991). "Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in Leishmania major amastigotes." Mol Biochem Parasitol **45**(1): 91-99.

Uchida, M., A. Enomoto, et al. (2006). "Dok-4 regulates GDNF-dependent neurite outgrowth through downstream activation of Rap1 and mitogen-activated protein kinase." J Cell Sci **119**(Pt 15): 3067-3077.

Ueno, N. and M. E. Wilson (2012). "Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival." Trends in Parasitology **28**(8): 335-344.

Uhlik, M. T., B. Temple, et al. (2005). "Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains." J Mol Biol **345**(1): 1-20.

Underhill, D. M. and H. S. Goodridge (2012). "Information processing during phagocytosis." Nature Reviews. Immunology **12**(7): 492-502.

van Dijk, T. B., E. van Den Akker, et al. (2000). "Stem cell factor induces phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent Lyn/Tec/Dok-1 complex formation in hematopoietic cells." Blood **96**(10): 3406-3413.

van Kooyk, Y. and C. G. Figdor (2000). "Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion." Curr Opin Cell Biol **12**(5): 542-547.

Van Slyke, P., M. L. Coll, et al. (2005). "Dok-R mediates attenuation of epidermal growth factor-dependent mitogen-activated protein kinase and Akt activation through processive recruitment of c-Src and Csk." Mol Cell Biol **25**(9): 3831-3841.

van Vliet, C., P. E. Bukczynska, et al. (2005). "Selective regulation of tumor necrosis factor-induced Erk signaling by Src family kinases and the T cell protein tyrosine phosphatase." Nat Immunol **6**(3): 253-260.

van Zandbergen, G., M. Klinger, et al. (2004). "Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages." J Immunol **173**(11): 6521-6525.

Vandal, O. H., L. M. Pierini, et al. (2008). "A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal Mycobacterium tuberculosis." Nat Med **14**(8): 849-854.

Vieira, O. V., C. Bucci, et al. (2003). "Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase." Mol Cell Biol **23**(7): 2501-2514.

Villwock, A., C. Schmitt, et al. (2008). "Recognition via the class A scavenger receptor modulates cytokine secretion by human dendritic cells after contact with Neisseria meningitidis." Microbes Infect **10**(10-11): 1158-1165.

Vinet, A. F., M. Fukuda, et al. (2008). "The exocytosis regulator synaptotagmin V controls phagocytosis in macrophages." J Immunol **181**(8): 5289-5295.

Vinet, A. F., M. Fukuda, et al. (2009). "The Leishmania donovani lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V." PLoS Pathog **5**(10): e1000628.

Vinet, A. F., M. Fukuda, et al. (2009). "The Leishmania donovani lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V." PLoS Pathogens **5**(10): e1000628.

Voth, B. R., B. L. Kelly, et al. (1998). "Differentially expressed Leishmania major gp63 genes encode cell surface leishmanolysin with distinct signals for glycosylphosphatidylinositol attachment." Mol Biochem Parasitol **93**(1): 31-41.

Wang, T., Z. Ming, et al. (2011). "Rab7: role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic." Cell Signal **23**(3): 516-521.

Wang, Y. L. and M. B. Goren (1987). "Differential and sequential delivery of fluorescent lysosomal probes into phagosomes in mouse peritoneal macrophages." J Cell Biol **104**(6): 1749-1754.

Wei, X. Q., I. G. Charles, et al. (1995). "Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase." Nature **375**(6530): 408-411.

Weinheber, N., M. Wolfram, et al. (1998). "Phagocytosis of Leishmania mexicana amastigotes by macrophages leads to a sustained suppression of IL-12 production." Eur J Immunol **28**(8): 2467-2477.

Weise, F., Y. D. Stierhof, et al. (2000). "Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite Leishmania, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells." J Cell Sci **113 Pt 24**: 4587-4603.

Wen, J., Q. Xia, et al. (2009). "Dok-5 is involved in cardiomyocyte differentiation through PKB/FOXO3a pathway." J Mol Cell Cardiol **47**(6): 761-769.

WHO. (2008). "The global burden of disease: 2004 update." from http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf.

Wick, M. J., L. Q. Dong, et al. (2001). "Insulin receptor-mediated p62dok tyrosine phosphorylation at residues 362 and 398 plays distinct roles for binding GTPase-activating protein and Nck and is essential for inhibiting insulin-stimulated activation of Ras and Akt." J Biol Chem **276**(46): 42843-42850.

Williams, M. A. and J. S. Solomkin (1999). "Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning." J Leukoc Biol **65**(6): 725-736.

Wilson, M. E. and K. K. Hardin (1988). "The major concanavalin A-binding surface glycoprotein of Leishmania donovani chagasi promastigotes is involved in attachment to human macrophages." J Immunol **141**(1): 265-272.

Winberg, M. E., A. Holm, et al. (2009). "Leishmania donovani lipophosphoglycan inhibits phagosomal maturation via action on membrane rafts." Microbes Infect **11**(2): 215-222.

Winkler, H. H. (1990). "Rickettsia species (as organisms)." Annu Rev Microbiol **44**: 131-153.

Woodring, P. J., J. Meisenhelder, et al. (2004). "c-Abl phosphorylates Dok1 to promote filopodia during cell spreading." J Cell Biol **165**(4): 493-503.

Wotton, K. R., F. K. Weierud, et al. (2008). "Comparative genomics of Lbx loci reveals conservation of identical Lbx ohnologs in bony vertebrates." BMC Evol Biol **8**: 171.

Wright, S. D., L. S. Craigmyle, et al. (1983). "Fibronectin and serum amyloid P component stimulate C3b- and C3bi-mediated phagocytosis in cultured human monocytes." J Exp Med **158**(4): 1338-1343.

Wright, S. D. and F. M. Griffin, Jr. (1985). "Activation of phagocytic cells' C3 receptors for phagocytosis." J Leukoc Biol **38**(2): 327-339.

Wright, S. D. and S. C. Silverstein (1982). "Tumor-promoting phorbol esters stimulate C3b and C3b' receptor-mediated phagocytosis in cultured human monocytes." J Exp Med **156**(4): 1149-1164.

Xin, L., K. Li, et al. (2008). "Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by Leishmania amazonensis amastigotes." Mol Immunol **45**(12): 3371-3382.

Yamamoto, Y., T. W. Klein, et al. (1997). "Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of Candida albicans to macrophages." Infect Immun **65**(3): 1077-1082.

Yamanashi, Y. and D. Baltimore (1997). "Identification of the Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok." Cell **88**(2): 205-211.

Yamanashi, Y., T. Tamura, et al. (2000). "Role of the rasGAP-associated docking protein p62(dok) in negative regulation of B cell receptor-mediated signaling." Genes Dev **14**(1): 11-16.

Yang, Z., D. M. Mosser, et al. (2007). "Activation of the MAPK, ERK, following Leishmania amazonensis infection of macrophages." J Immunol **178**(2): 1077-1085.

Yao, C., J. E. Donelson, et al. (2003). "The major surface protease (MSP or GP63) of Leishmania sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function." Mol Biochem Parasitol **132**(1): 1-16.

Yao, C., K. G. Leidal, et al. (2002). "Biosynthesis of the major surface protease GP63 of Leishmania chagasi." Mol Biochem Parasitol **121**(1): 119-128.

Yasuda, T., K. Bundo, et al. (2007). "Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of T cell receptor signaling." Int Immunol **19**(4): 487-495.

Yasuda, T., M. Shirakata, et al. (2004). "Role of Dok-1 and Dok-2 in myeloid homeostasis and suppression of leukemia." J Exp Med **200**(12): 1681-1687.

Yeung, T. and S. Grinstein (2007). "Lipid signaling and the modulation of surface charge during phagocytosis." Immunological Reviews **219**: 17-36.

Zhang, W., C. L. Sommers, et al. (1999). "Essential role of LAT in T cell development." Immunity **10**(3): 323-332.

Zhang, Y., Z. Yan, et al. (2004). "Molecular basis of distinct interactions between Dok1 PTB domain and tyrosine-phosphorylated EGF receptor." J Mol Biol **343**(4): 1147-1155.

Zhao, M., J. A. Janas, et al. (2006). "Dok-1 independently attenuates Ras/mitogen-activated protein kinase and Src/c-myc pathways to inhibit platelet-derived growth factor-induced mitogenesis." Mol Cell Biol **26**(7): 2479-2489.

Zhao, M., A. A. Schmitz, et al. (2001). "Phosphoinositide 3-kinase-dependent membrane recruitment of p62(dok) is essential for its negative effect on mitogen-activated protein (MAP) kinase activation." J Exp Med **194**(3): 265-274.

Zheleznyak, A. and E. J. Brown (1992). "Immunoglobulin-mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation. Evidence for protein kinase C translocation to phagosomes." J Biol Chem **267**(17): 12042-12048.

Zhu, F. G., C. F. Reich, et al. (2001). "The role of the macrophage scavenger receptor in immune stimulation by bacterial DNA and synthetic oligonucleotides." Immunology **103**(2): 226-234.