CHARLES PRIVÉ

Activité des MAPKs et de NF-KB chez le macrophage infecté par *Leishmania donovani*

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.) en virologie et immunologie

Jury d'évaluation :

Albert Descoteaux, Ph.D Gaétan Faubert, Ph.D Jacques Bernier, Ph.D

Janvier 2000 INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER Université du Québec



Table des matières

Table des matières iii
Liste des figures
Liste des abréviations
Sommaireviii
Introduction
Revue bibliographique
1. Leishmania
1.1. Leishmanioses
1.2. Cycle de vie
2. Les glycoconjugués de <i>Leishmania</i>
2.1. Lipophosphoglycan
2.2. Autres glycoconjugués
2.3. Biosynthèse du LPG et gènes impliqués 10
2.4. Rôles du LPG 11
2.4.1. À l'intérieur de l'insecte
2.4.2. Dans la circulation sanguine
2.4.3. Dans les interactions Leishmania- macrophage
2.4.3.1. Attachement du parasite au macrophage
2.4.3.2. Survie dans la vacuole parasitophore
3. Réponse du macrophage à l'infection
3.1. Apoptose
3.2. Mécanismes microbicides du macrophage 17
3.3. Cytokines
3.3.1. Production de cytokines inhibitrices
3.3.2. Inhibition de cytokines activatrices
3.3.2.1. TNF-α
3.3.2.2. IL-1
3.3.2.3. IL-12 et IFN-γ

4. Modulation des voies de signalisation	24	
4.1. PTK	25	
4.2. PKC	26	
4.3. Calcium	27	
4.4. Jak/Stat	28	
5. MAPKs et NF-κB	29	
5.1. MAPKs	29	
5.2. NF-кВ 3	33	
5.3. MAPKs et NF-κB	36	
Article: Leishmania promastigotes and MAPK activation in macrophages	38	
Abstract4	10	
Introduction4	41	
Materials and methods4	14	
Results 4	17	
Discussion	58	
Acknowledgments	53	
References	54	
Footnotes	73	
Discussion	74	
Remerciements	31	
Bibliographie		
Annexe I)0	
Annexe II)2	

Liste des figures

Figure A.	Cycle de vie de Leishmania	7
Figure B.	Schéma d'organisation des MAPKs	31
Figure C.	Activation de NF-KB	35
Figure 1.	Structure of the LPG from L.donovani and	
	the truncated LPG accumulating in the $lpg1^{-h}$	
	and <i>lpg2</i> ^{-/-} mutants	51
Figure 2.	Effect of L. donovani infection on MAPK activation	52
Figure 3.	Effect of cytochalasin B-treatment on the	
	induction of ERK1/2 phosphorylation	53
Figure 4.	In vitro ERK1/2 kinase assay	54
Figure 5.	Effect IFN-γ-priming on L. donovani-induced	
	MAPK phosphorylation in BMM	55
Figure 6.	Effect of <i>L. donovani</i> on the degradation	
	of IκB-α in BMM	56
Figure 7.	LPS induces MAPK phosphorylation	
	in L. donovani-infected BMM	57

Liste des abréviations

BMM	: « bone marrow-derived macrophages »
CIF	: « Ca ²⁺ influx factor »
CMH II	: complexe majeur d'histocompatibilité, classe II
CR1	: « complement receptor type 1 »
CR3	: « complement receptor type 3 »
CRP	: « C-reactive protein »
CSF	: « colony-stimulating factor »
EGF	: « epidermal growth factor »
ERK	: « extracellular signal-regulated kinase »
fMLP	: fMet-Leu-Phe
Gal	: galactose
Gal _f	: galactosylfuranose
G-CSF	: « granulocyte CSF »
GDP	: guanosine di-phosphate
GIPL	: glycosylinositolphospholipide
GM-CSF	: « granulocyte-macrophage CSF »
GMPc	: guanosine mono-phosphate cyclique
GPI	: glycosylphosphatidylinositol
IFN-γ	: interféron gamma
IL	: interleukine
iNOS	: « inducible NO synthase »
IP ₃	: inositol 1,4,5-triphosphate
IP-10	: « IFN-γ-inducible protein 10»
Jak	: Janus kinases
JNK	: « c-Jun N-teminal kinase »
kb	: kilobases
LPG	: lipophosphoglycan
LPS	: lipopolysaccharide
Man	: mannose

MAPK	: « mitogen-activated protein kinase »
МАРКК	: « mitogen-activated protein kinase kinase»
MAPKKK	: « mitogen-activated protein kinase kinase kinase»
M-CSF	: « macrophage CSF »
NK	: « natural killer »
NO	: oxyde nitrique
ORF	: « open reading frame »
PA	: phosphatase acide
pb	: paire de bases
PDGF	: « platelet-derived growth factor »
PG	: phosphoglycan
PLC	: phospholipase C
PI	: phosphatidylinositol
РКС	: protéine kinase C
PPG	: protéophosphoglycan
PGE ₂	: prostaglandine E ₂
РТК	: protéine tyrosine kinase
SOC	: « store-operated Ca ²⁺ channel »
Stat1	: « signal transducer and activator of transcription 1 »
Т	: thymus
ΤΝΓ-α	: « tumor necrosis factor alpha »
UDP	: uridine di-phosphate
UTR	: « untranslated region »

vii

Sommaire

Lorsqu'il infecte le macrophage, le parasite *Leishmania* module certaines voies de signalisation à son avantage. Par exemple, l'infection cause une inhibition de la voie des Jak/Stat en réponse à l'IFN- γ et une inhibition de la PKC. Le mécanisme d'inhibition de la PKC implique fort probablement le lipophosphoglycan (LPG), la principale molécule exprimée à la surface de la forme promastigote du parasite. De plus, ce parasite évite d'induire la production d'IL-1, d'IL-12 et de TNF- α par le macrophage. Or, les MAPKs et NF- κ B régulent l'expression de plusieurs gènes de cytokines pro-inflammatoires.

Nous avons donc analysé l'activité des MAPKs et de NF- κ B lors de l'infection de macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris BALB/c, naïfs ou pré-traités à l'IFN- γ , par des promastigotes de *L. donovani*. Pour évaluer le rôle du LPG sur ces voies de signalisation, nous avons également infectés les macrophages avec une série de trois mutants exprimant des formes tronquées du LPG. Finalement, nous avons vérifié s'il était possible d'activer les MAPKs et NF κ B avec du lipopolysaccharide (LPS) chez des macrophages préalablement infectés par *L. donovani* puisqu'une fois parasités, ces macrophages sont incapables de produire certaines cytokines telles que l'IL-1 et l'IL-12.

Nous avons démontré que les promastigotes de type sauvage du parasite *L.* donovani évitent l'activation des voies de ERK1/2, p38 et JNK. Par contre, les mutants déficients en unités répétitives disaccharides du LPG ont tous induit la phosphorylation de ERK1/2. Chez les macrophages pré-activés à l'IFN- γ , l'infection par *L. donovani* a provoqué une rapide et importante phosphorylation de la p38 et une activation un peu plus tardive de ERK1/2 et NF- κ B. Enfin, l'activation des MAPKs et de NF- κ B par le LPS était en tout point semblable chez les macrophages infectés et non-infectés. La capacité de la forme sauvage de *L. donovani* à éviter l'activation des MAPKs doit être importante dans l'issue de l'infection.

1

Introduction

Leishmania est un parasite intracellulaire des macrophages. Lors de l'infection, le macrophage ne produit ni cytokines pro-inflammatoire, ni oxide nitrique. Les mécanismes par lesquels *Leishmania* réussit à éviter d'activer la cellule hôte sont mal connus. Or, le lipophosphoglycan (LPG) est la principale molécule exprimée à la surface du parasite et joue plusieurs rôles dans sa survie. Sachant que les MAPKs et NF-KB sont impliqués dans l'expression de plusieurs gènes de cytokines, l'hypothèse de cette recherche était que le LPG de *Leishmania donovani* lui est nécessaire pour éviter d'activer les MAPKs et NF-KB chez le macrophage.

Les objectifs de cette étude étaient de :

- Déterminer le niveau de phosphorylation des MAPKs et d'IκB-α lors de la première phase de l'infection.
- Vérifier si le pré-traitement des macrophages à l'IFN-γ va changer le patron d'activité des MAPKs et d'IκB-α lors de la première phase de l'infection.
- Déterminer si les MAPKs et IκB-α de macrophages préalablement infectés, peuvent être phosphorylés suite à une stimulation au LPS.
- 4) Vérifier si le LPG joue un rôle dans 1), 2) et 3).

Pour rencontrer ces objectifs, nous avons d'abord généré trois différents mutants de *L. donovani* arborant des formes tronquées du LPG. Nous avons ensuite choisi des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMM) de souris BALB/c comme modèle d'infection. Les macrophages, traités ou non à l'IFN- γ , ont été infectés soit avec la forme sauvage de *L. donovani*, soit avec chacun des trois mutants. D'autres macrophages ont d'abord été infectés par *L. donovani*, puis stimulés au LPS. La phosphorylation des MAPKs et d'IkB- α a été analysée par immunobuvardage de type « Western ».

Dans cette étude, nous avons démontré que la forme sauvage de *L. donovani* n'active pratiquement pas les MAPKs ni NF- κ B et que les unités répétitives disaccharides du LPG sont nécessaires pour éviter d'activer ERK1/2. D'autre part, l'activité microbicide des macrophages pré-activés à l'IFN- γ semble dépendre de la phosphorylation rapide et soutenue de la p38 lors de la phase initiale de l'infection.

Enfin, les MAPKs et NF-KB peuvent être activés par le LPS chez les macrophages infectés par *L. donovani*.

Revue bibliographique

1. Leishmania

1.1. Leishmanioses

Leishmania est un protozoaire flagellé de la famille des Trypanosomatidae. Durant l'une des deux phases de son cycle de vie, Leishmania est un parasite obligatoire des macrophages et infecte plusieurs millions de personnes à travers le monde, principalement dans l'hémisphère sud et en Asie. Les différentes espèces de Leishmania causent des pathologies distinctes qui peuvent prendre trois formes. La leishmaniose cutanée (L. major) est caractérisée par des ulcères de la peau qui guérissent généralement d'eux-mêmes alors que la leishmaniose mucocutanée (L. braziliensis) atteint et détruit les tissus de la région du nez et du pharynx. La leishmaniose viscérale (L. donovani) affecte le foie, la rate et la moelle osseuse et peut être fatale si non traitée. Il n'existe toujours pas de vaccins efficaces pour limiter la propagation de Leishmania et le parasite est de plus en plus résistant aux médicaments actuellement employés (Descoteaux and Turco, 1999).

1.2. Cycle de vie

Leishmania a besoin de deux hôtes pour compléter son cycle de vie (Figure A). Même si des rongeurs et autres animaux domestiques constituent le réservoir, les humains sont aussi sujets à l'infection puisque Leishmania est transmis par un un insecte piqueursuceur (mouche des sables) du genre Phlebotomus ou Lutzomia (Liew and O'Donnell, 1993). Les parasites se répliquent dans les macrophages de mammifère sous la forme d'amastigotes dépourvus de flagelle (Chang and Dwyer, 1976). Les amastigotes se propagent ainsi d'un macrophage à l'autre, dans le même mammifère, jusqu'à ce qu'une mouche des sables en prélève durant un repas sanguin. Dès lors, les amastigotes se transforment en promastigotes flagellés qui vont s'attacher à l'épithélium intestinal de l'insecte. Les promastigotes sont alors capables de se répliquer mais ne sont pas infectieux (procycliques). Après un certain temps, les promastigotes arrêtent de se diviser, se détachent de la paroi intestinale et migrent vers les glandes salivaires de l'insecte. Ces promastigotes, dits métacycliques, sont prêts à infecter un autre mammifère (Sacks, 1989). Les changements de température et de pH sont les signaux qui déclenchent le passage de la forme amastigote à promastigote, et vice et versa (Zilberstein and Shapira, 1994).





2. Les glycoconjugués de Leishmania

Durant toutes les étapes de son cycle de vie, *Leishmania* doit faire face à plusieurs situations qui pourraient être compromettantes pour sa survie; complément dans le milieu extra-cellulaire, enzymes et radicaux oxygénés présents dans le phagolysosome, enzymes digestives à l'intérieur de l'insecte, etc. Les molécules exprimées à la surface du parasite ou sécrétées dans son environnement immédiat constituent son seul bouclier contre ces milieux hostiles.

2.1. Lipophosphoglycan

Le lipophosphoglycan (LPG) est la principale molécule, en nombre et en importance, exprimée à la surface de Leishmania, et forme un glycocalix autour du parasite. Le LPG est composé de quatre domaines (Figure 1, p.51) : 1) une ancre lipidique phosphatidylinositol, 2) une charpente polysaccharide phosphatée, 3) de 15 à 30 disaccharides phosphatés et 4) une coiffe d'oligosaccharides (King et al., 1987). Les domaines 1) et 2) sont conservés chez toutes les espèces de Leishmania alors que les domaines 3) et 4) sont plus variables (Turco and Descoteaux, 1992). La forme du LPG varie également en fonction du stade du cycle de vie dans lequel se trouve un parasite d'une même espèce. Lors de la métacyclogénèse, le nombre d'unités répétitives double, passant de 15 (procyclique) à 30 (métacyclique) environ (Sacks et al., 1995). De plus, les amastigotes sont pratiquement dépourvus de LPG et la structure de la molécule n'est souvent pas la même que celle retrouvée chez les promastigotes (Turco and Sacks, 1991). La grande variabilité structurale et quantitative du LPG en fonction du stade du cycle de vie de Leishmania implique que ce polymère doit être facilement et rapidement libéré de la membrane plasmique (Handman et al., 1984). Cette propriété est probablement attribuable à un faible ancrage d'une seule chaîne aliphatique dans la couche extérieure de la double membrane lipidique (McConville and Ferguson, 1993).

2.2. Autres glycoconjugués

Pratiquement toutes les molécules (connues) sécrétées par *Leishmania* ou exprimées à sa surface contiennent l'un ou l'autre des domaines qui composent le LPG (Mengeling *et al.*, 1997). La gp63 est une molécule de surface qui comprend une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) de même qu'une charpente de polysaccharides (communes au LPG) auxquelles sont associées une protéase zinc-dépendante (Chaudhuri *et al.*, 1989). D'autre part, les glycosylinositolphospholipides (GIPLs) constituent une famille de petites molécules retenues à la surface du parasite par une ancre GPI dont certaines exposent une charpente polysaccharidique identique à celle du LPG (précurseur). Les GIPLs sont exprimées autant par les amastigotes que par les promastigotes (McConville and Ferguson, 1993).

Les molécules sécrétées apparentées au LPG ont en commun des unités répétitives Gal-Man-PO₄ et des coiffes d'oligosaccharides. Les phosphoglycan (PG) sécrétés sont composés uniquement de ces deux derniers domaines (Greis *et al.*, 1992). D'autre part, les protéophosphoglycans (PPG) sécrétés s'apparentent à la mucine des mammifère (Ilg *et al.*, 1996). Les phosphatases acides (PA), quant à elles, sont sécrétées par toutes les espèces de *Leishmania* sauf *L. major* (Lovelace and Gottlieb, 1986). Cette phosphatase est liée aux unités répétitives de disaccharides par une sérine phosphorylée grâce à un type unique de glycosylation qui n'a pu être observé chez aucun autre organisme (Ilg *et al.*, 1994).

La redondance structurale de toutes ces molécules suggère qu'elles ont un rôle prépondérant dans la survie du parasite soit en le protégeant directement contre un environnement hostile, soit en modifiant ce dernier. Par exemple, il a été démontré que la gp63 était nécessaire à la survie de *L. mexicana* dans le phagolysosome (Seay *et al.*, 1996). Toutefois, les fonctions attribuées au LPG sont beaucoup mieux caractérisées.

2.3. Biosynthèse du LPG et gènes impliqués

La voie de synthèse de l'ancre *lyso*-1-*O*-alkyl PI de *Leishmania* n'a pas encore été établie avec certitude mais elle s'apparente probablement à celles déjà décrites chez d'autres trypanosomes (Doering *et al.*, 1990; McConville and Ferguson, 1993). Comme il a déjà été mentionné, il est probable qu'une faible proportion de la famille des GIPLs, composés d'une ancre GPI et d'une charpente de six glucides, serve de précurseur à la synthèse du LPG (McConville and Ferguson, 1993). Un GIPL identifié chez *L. mexicana* possède d'ailleurs les caractéristiques propres à un tel précurseur (McConville *et al.*, 1993). Des expériences *in vitro* ont ensuite démontré que les unités répétitives de disaccharides étaient ajoutées séquentiellement par l'addition de Man-1-PO₄ et de Gal à partir de GDP-Man et d'UDP-Gal, respectivement (Carver and Turco, 1991). L'assemblage des unités répétitives Gal-Man-PO₄ se fait dans l'appareil de Golgi (Bates *et al.*, 1990). Quant à l'addition de la coiffe d'oligosaccharides, l' (les) enzyme(s) responsable(s) n'a (ont) pas encore été caractérisée(s).

Beverley and Turco (1998) estiment qu'il y a au moins 25 enzymes distinctes impliquées dans la biosynthese du LPG et qu'un nombre équivalent de protéines sont nécessaires à la compartimentalisation et à l'acheminement de ce polymère à la surface de *Leishmania*. Jusqu'à maintenant, quatres gènes codant pour quatres molécules impliquées dans la biosynthèse du LPG ont été identifiés : *LPG1*, *LPG2*, *LPG3* et *LPG4a*. Le gène *LPG1* code pour une glycosyltransférase responsable de l'addition du résidu galactosylfuranose (Gal_f, Figure 1, article) dans la charpente d'hexasaccharides (Ryan *et al.*, 1993). Quant au gène *LPG2*, il encode une protéine impliquée dans la translocation des GDP-Man dans la lumière du Golgi. Sans cette molécule, les unités Gal-Man-PO₄ ne peuvent être ajoutées sur aucun des glycoconjugués exprimés par *Leishmania* (Descoteaux *et al.*, 1995). Le gène *LPG3* code pour une protéine présumée chaperon, responsable de l'ajout du résidu Gal de la première unité répétitive. La protéine LPG3 est homologue à la GRP94, une protéine chaperon exprimée dans le réticulum endoplasmique des cellules de mammifères (Descoteaux *et al.*, soumis). Enfin, le gène LPG4a encode une mannosylphosphoryltransférase requise pour l'ajout de la seconde unité Gal-Man-PO₄ sur le LPG (Descoteaux *et al.*, 1998). Les séquences des trois premiers gènes sont connues mais le gène LPG4a n'a pas encore été séquencé.

L'identification de ces quatre gènes s'est faite par la méthode de complémentation génétique décrite par Descoteaux *et al.* (1994). Le principe de cette méthode est d'obtenir, par mutagénèse chimique, des *Leishmania* dépourvus de LPG et de découvrir quel sont les gènes en cause. Brièvement, les parasites sont exposés à des agents mutagènes puis, incubés avec une lectine (« ricin agglutinin ») qui reconnaît les résidus β -Gal du LPG. Les parasites exprimant le LPG sont éliminés et les *Leishmania* déficients en LPG, récupérés. Ces derniers sont ensuite transfectés avec des cosmides dans lesquels une banque d'ADN génomique de la souche sauvage a été insérée. Les parasites exprimant à nouveau le LPG sont reconnus avec la lectine mentionnée précédemment et les gènes d'intérêt peuvent être isolés (Descoteaux *et al.*, 1994).

2.4. Rôles du LPG

2.4.1. À l'intérieur de l'insecte

L'étape critique de la survie de *Leishmania* dans l'insecte consiste à ne pas être excrété en même temps que le reste du repas sanguin digéré. Or, il a été démontré que la rétention du parasite se fait par la liaison du LPG à des lectines exprimées à la surface des cellules épithéliales de l'intestin de l'insecte (Pimenta *et al.*, 1992; Sacks *et al.*, 1995). Les interactions moléculaires impliquées n'ont pas été élucidées pour toutes les espèces de *Leishmania*. Toutefois, il est intéressant de noter que les différentes espèces de parasites ne peuvent être propagées que par certaines espèces de mouches des sables et que cette spécificité est attribuable à la variabilité d'expression du LPG (Pimenta *et al.*, 1994).

Lors du passage de l'état procyclique à métacyclique, le parasite se détache de l'épithélium intestinal et migre vers les glandes salivaires. Ce détachement est associé à un changement dans l'expression du LPG. Dans le cas de *L. major*, les unités répétitives de disaccharides chez les promastigotes procycliques sont dotées de chaînes latérales terminées surtout par des résidus galactoses alors que celles des métacycliques sont plutôt terminées par des résidus arabinoses (McConville *et al.*, 1992). Or, l'adhésion à l'épithélium intestinal est justement dû à la liaison des résidus galactoses à une lectine spécifique et c'est ce qui explique le détachement des promastigotes lors de la métacyclogénèse (Pimenta *et al.*, 1992).

Pour ce qui est de *L. donovani*, il n'y a pas de branchements associés aux unités répétitives disaccharides (Figure 1, p.51). Cependant, le nombre de ces unités double lors de la métacyclogénèse, comme chez toutes les espèces de *Leishmania*. Pour expliquer le détachement des promastigotes de l'épithélium intestinal, Sacks *et al.* (1995) ont émis l'hypothèse que la coiffe d'oligosaccharides, responsable de l'attachement à une lectine, devient inaccessible (cryptique) sur les LPG exprimés par les métacycliques.

2.4.2. Dans la circulation sanguine

La modification du LPG lors de la métacyclogénèse est aussi essentielle pour la survie du parasite injecté dans la circulation sanguine. En effet, les promastigotes procycliques sont beaucoup plus sujets à la lyse via le complément que les métacycliques (Puentes *et al.*, 1990). Les mécanismes impliqués ne sont pas très bien connus et semblent, encore une fois, distincts d'une espèce à l'autre. Chez *L. major*, autant les procycliques que les métacycliques activent le complément. Toutefois, la forme procyclique de *L. major* lie la composante C3b du complément de façon covalente et active ce dernier par la voie alternative alors que les métacycliques lient le C3b de façon non covalente et activent le complément par la voie classique (Puentes *et al.*, 1988). La plus grande résistance au complément des *L. major* métacycliques semble attribuable à

une libération spontanée du complexe C5b-9 de la surface du parasite (Puentes et al., 1990).

La résistance au complément de *L. donovani* semble provenir du fait que la majeure forme de C3 qui s'y lie est le C3bi et que cette composante ne peut participer à la formation de la C5 convertase. De plus, la moitié des C3 liés à *L. donavani* sont rapidement clivés par un mécanisme inconnu qui implique peut-être la protéinase gp63 (Puentes *et al.*, 1989). Quoiqu'il en soit, l'élongation du LPG lors de la métacyclogénèse ne peut que rendre plus difficile l'accès du complexe C5b-9 à la membrane du parasite.

2.4.3. Dans les interactions Leishmania- macrophage

2.4.3.1. Attachement du parasite au macrophage

Le fait que *Leishmania* infecte préférentiellement les macrophages implique une reconnaissance spécifique de certaines molécules exprimées à leurs surfaces. De plus, cette spécificité est fort probablement responsable du tropisme des différentes espèces de *Leishmania* pour les macrophages de certains tissus. Il n'y a pas de ligands ni récepteurs uniques par lesquels *Leishmania* entre dans le macrophage. La situation générale est assez complexe et une multitude de molécules sont susceptibles d'avoir un rôle à jouer. Étant donné qu'il forme un dense glycocalix autour du parasite, le LPG est une de ces molécules très importantes dans l'attachement du promastigote au macrophage (Handman and Goding, 1985). Tout dépendant des espèces, le LPG de *Leishmania* va lier les composantes C3b et C3bi du complément lors de son passage dans la circulation sanguine et/ou le milieu extra-cellulaire (voir la section 2.4.2.). Dans des conditions physiologiques, il a été démontré que *Leishmania* est phagocyté principalement via les CR1 et CR3, respectivement récepteurs des composantes C3b et C3bi du complément des composantes C3b et C3bi du complément, de même que via le récepteur p150/95 (Mosser and Rosenthal, 1993). De plus, la « C-reactive protein » (CRP), une protéine exprimée en grande quantité lors de

l'inflammation, peut opsoniser *L. donovani* et favoriser sa phagocytose par le macrophage. Même dans des conditions non-inflammatoires, la CRP se lie spécifiquement aux unités répétitives de disaccharides du LPG (Culley *et al.*, 1996). Malgré le fait qu'un récepteur de la CRP a été identifié (Tebo and Mortensen, 1990), son rôle dans la réponse du macrophage n'est pas connu. En plus d'être phagocyté par l'intermédiaire de molécules opsonisantes, le LPG peut lier directement le CR3 et le p150/p95 (Russell and Talamas-Rohana, 1989). D'autres molécules à la surface de *Leishmania* peuvent également être impliquées dans sa phagocytose. La gp63 lie elle aussi les composantes C3b et C3bi du complément et peut en plus interagir directement avec le CR3 (Russell and Talamas-Rohana, 1989).

Il est clair que l'entrée de *Leishmania* via les CR1 et CR3 va favoriser sa survie à l'intérieur du macrophage puisque l'association des ligands à ces récepteurs n'engendre pas de flambée respiratoire (Wright and Silverstein, 1983). De plus, la liaison d'un ligand au CR3 a pour effet d'inhiber la production d'IL-12 par le macrophage (Marth and Kelsall, 1997). Or, l'IL-12 a un rôle prépondérant à jouer dans la réponse immunitaire de type cellulaire (voir la section 3.3.2.3.). Par ailleurs, le récepteur du mannose-fucose n'est pas un récepteur par lequel *Leishmania* entre habituellement dans le macrophage. Cependant, ce récepteur pourrait être emprunté par des mutants non-viables de *L. donovani* déficients en unités répétitives de disaccharides (Descoteaux and Turco, 1999) de même que par une souche avirulente (UR6) de la même espèce de *Leishmania* (Chakraborty *et al.*, 1998). Les rôles que peuvent avoir le récepteur mannose-fucose dans la réponse du macrophage sont très mal connus. Toutefois, Klegeris *et al.* (1996) ont démontré que ce récepteur était impliqué dans la flambée respiratoire du macrophage induite par l'acétylcholinestérase.

2.4.3.2. Survie dans la vacuole parasitophore

Après son attachement à un récepteur du macrophage, le promastigote est internalisé dans un phagosome. Cette vacuole parasitophore va éventuellement se transformer en phagolysosome suite à une série de contacts avec des endosomes précoces, des endosomes tardifs et des lysosomes. Ces contacts impliquent des échanges de matériel et de protéines membranaires selon un processus décrit comme la maturation du phagosome (Ryter, 1985; Desjardins et al., 1994; Desjardins, 1995). Les promastigotes se différencient en amastigotes parallèlement à la maturation du phagosome en phagolysosome et l'acidification de la vacuole est un des signaux responsables de cette différenciation (Zilberstein and Shapira, 1994). C'est dans le phagolysosome, un milieu acide et riche en hydrolases, que se répliquent les amastigotes (Chang and Dwyer, 1976). Même si les amastigotes n'expriment pratiquement pas de LPG à leur surface (McConville and Blackwell, 1991), cette molécule est essentielle à la survie de Leishmania, le temps qu'il se différencie d'une forme à une autre. En effet, des mutants de L. donovani dépourvus des unités répétitives disaccharides sont rapidement détruits lors de leur phagocytose (McNeely and Turco, 1990). Étant donné que d'autres molécules exprimées par Leishmania, comme les PA, les phosphoglycan (PG) et PPG, comportent des unités répétitives disaccharides (voir plus haut), il est fort possible que celles-ci jouent un rôle dans la survie des amastigotes (Descoteaux and Turco, 1999).

Même si les amastigotes sont bien adaptés au milieu acide et riche en hydrolases du phagolysosome, il semble que les promastigotes nouvellement phagocytés aient besoin d'un peu de temps pour se différencier. En effet, Desjardins et Descoteaux (1997) ont démontré que les promastigotes (*L. donovani*) inhibent la fusion entre les phagosomes, dans lesquels ils se trouvent, et les endosomes avoisinants. Quoique ce moyen de se protéger soit employé par d'autres pathogènes intra-cellulaires comme *Toxoplasma gondii* (Joiner *et al.*, 1990), *Legionella pneumophila* et *Salmonella* ssp. (Small *et al.*, 1994), les molécules et mécanismes en causes ne sont pas les mêmes. Dans le cas de *Leishmania*, c'est l'expression du LPG à sa surface, et plus particulièrement les unités répétitives de disaccharides, qui sont responsables de l'inhibition de la fusion entre le phagosome et les endosomes (Desjardins and Descoteaux, 1997). Le rôle des unités répétitives a été démontré en utilisant des mutants de *L. donovani* déficients en LPG. Il semble que le mécanisme en cause soit dû à l'insertion des unités répétitives disaccharides dans la membrane du phagosome. Cette insertion a pour effet de stabiliser la double couche lipidique et d'induire une répulsion stérique empêchant la formation de structures hexagonales inversées propices à la fusion des membranes entre elles (Miao *et al.*, 1995).

À elle seule, la démonstration de l'inhibition de la fusion des phagosomes et des endosomes par le LPG (Desjardins and Descoteaux, 1997) permet de concevoir parallèlement la différenciation progressive des promastigotes, couverts de LPG, en amastigotes, dépourvus de LPG, et la maturation tout aussi progressive, quoique retardée, du phagosome en phagolysosome. En plus de cela, la nature hautement anionique des liens Gal β 1,4Man du LPG peut offrir une protection contre les enzymes hydrolytiques (Descoteaux and Turco, 1999). Les unités répétitives de disaccharides ont également le pouvoir de neutraliser (« scavenger ») les radicaux hydroxyles (OH) et les anions superoxydes (O₂⁻) (Chan *et al.*, 1989). Étant donné que la production de radicaux oxygénés a un rôle prépondérant dans l'activité microbicide du macrophage (Adams and Hamilton, 1984), il a été suggéré que les unités répétitives du LPG (Chan *et al.*, 1989; Elhay *et al.*, 1990) ou des molécules sécrétées (PA, PG, PPG) par *Leishmania* (El-On *et al.*, 1990) puisse protéger le parasite contre une éventuelle flambée respiratoire.

3. Réponse du macrophage à l'infection

3.1. Apoptose

La condition première pour qu'un parasite intra-cellulaire puisse survivre et se répliquer dans la cellule-hôte est que cette dernière conserve son intégrité. Or, Moore et Matlashewski (1994) ont démontré que L. donovani pouvait intervenir activement dans la survie de macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris BALB/c. Ce type de cellule représente un modèle d'infection in vitro de choix puisque, dans des conditions naturelles, L. donovani infecte, entre autres, les macrophages de la moelle osseuse. Ces macrophages meurent rapidement lorsqu'ils sont privés de CSF-1, cette cytokine étant nécessaire à leur différenciation in vitro (Descoteaux and Matlashewski, 1989). Dans une étude réalisée par Moore et al. (1994), des cultures infectées par les formes promastigotes et amastigotes de L. donovani comprenaient respectivement 180% et 95% plus de macrophages que la culture contrôle, quarante-huit heures après leur inoculation. De plus, il a été démontré que le LPG purifié de L. donovani pouvait à lui seul augmenter la viabilité de ces macrophages (Moore and Matlashewski, 1994). Ces observations semblent indiquer que le LPG joue un rôle crucial dans la désactivation du processus d'apoptose des macrophages infectés. Le mécanisme impliqué semble provenir du fait que L. donovani induit les macrophages à produire certaines cytokines, comme le TNF-a et le GM-CSF, et que celles-ci pourraient être impliquées dans le maintien de la survie du macrophage. En effet, le traitement des cultures avec du rTNF-a ou du rGM-CSF augmente la survie des macrophages (Moore and Matlashewski, 1994).

3.2. Mécanismes microbicides du macrophage

L'oxyde nitrique (NO) est la meilleure arme dont dispose un macrophage pour éliminer le parasite *Leishmania*. La production de NO peut être catalisée par au moins trois isoenzymes de NO synthétase (James, 1995) et il semble que ce soit celle de type 2 (NOS2 ou iNOS) qui soit déterminante dans l'activité leishmanicide du macrophage (Liew *et al.*, 1991). L'ARNm d'iNOS est indétectable chez le macrophage tant qu'il n'est pas activé par l'IFN- γ et/ou le LPS (McMicking *et al.*, 1997). Toutefois, iNOS est une enzyme essentielle à l'élimination *in vitro* de *Leishmania* par les macrophages murins et humains (Bogdan and Röllinghoff, 1999). Elle est également requise pour le contrôle *in vivo* de *L. major*, ces études ayant été réalisées avec des souris déficientes en iNOS (Wei *et al.*, 1995).

Les études in vitro portant sur l'induction d'iNOS par Leishmania et/ou l'IFN-y offrent des résultats variables tout dépendant de l'ordre dans lequel ces deux stimulants sont administrés aux macrophages. L'infection directe par Leishmania ou le traitement de macrophages avec le LPG n'activent pas iNOS. En effet, Carrera et al. (1996) ont démontré que ni L. major ni L. donovani n'induisent la transcription de l'ARNm d'iNOS chez des macrophages dérivés de la moelle osseuse. De plus, l'incubation d'une lignée de macrophages (J774) avec du LPG ou des portions de ce dernier (L. major) ne provoque pas d'augmentation de la concentration en nitrite dans le surnageant de ces cultures (Proudfoot et al., 1996). Qui plus est, ces derniers auteurs ont démontré que les macrophages prétraités avec du LPG de L. major ou ses fractions, en particulier les unités répétitives de disaccharides, produisaient moins de nitrites que les contrôles, suite à une stimulation à l'IFN-y. La situation inverse, c'est-à-dire la stimulation de macrophages péritonéaux pré-activés à l'IFN-y avec des glycoconjugués de L. major ou L. donovani (amastigotes ou promastigotes), n'a pas d'effet sur la production de nitrites (Camargo et al., 1997). Par contre, lorsqu'ils sont administrés ensemble, l'IFN-y et L. major, ou le LPG de ce dernier, agissent synergiquement pour activer iNOS (Carrera et al., 1996; Proudfoot et al., 1996). Ces recherches in vitro ont été corroborées par Diefenbach et al. (1998) qui n'ont rapporté qu'une très faible expression d'iNOS chez des souris récemment infectées par L. major. Il semble donc que, au tout début de l'infection et tant que les macrophages n'ont pas été activés par l'IFN- γ , *Leishmania* n'active pas iNOS.

Outre l'oxyde nitrique, il a déjà été mentionné que *Leishmania* ne provoque pas de flambée respiratoire chez le macrophage infecté. En plus de protéger le parasite contre les métabolites oxygénés de par sa propriété « scavenger » (Chan *et al.*, 1989), le LPG peut contrecarrer la flambée respiratoire en inhibant directement la PKC (abordé plus loin). Or, l'indolamine 2,3-dioxygénase (IDO) est un composé utilisé pour contrer *Leishmania*. Son mode d'action est justement de promouvoir la génération d'intermédiaires oxygénés réactifs (O_2^- et H_2O_2) par le système de NADPH oxydase et la suppression de tryptophane (Bogdan and Röllinghoff, 1999).

3.3. Cytokines

Étant donné la spécificité de leur relation, le macrophage constitue la première ligne de défense du mammifère contre *Leishmania*. Toutefois, l'issue de l'infection va aussi dépendre de l'activité des cellules « natural killer » (NK) et des cellules T CD4⁺ et CD8⁺. Or, la coordination de toutes ces composantes du système immunitaire se fait par la sécrétion de molécules solubles que sont les cytokines. Le développement de souches de souris congéniques respectivement résistantes et susceptibles à l'infection par *Leishmania* a contribué à mieux comprendre les rôles protecteurs ou non-protecteurs de plusieurs cytokines. À cet effet, l'étude de la relation *Leishmania*-macrophage (et particulièrement celle de *L. major*-macrophage) est devenue un paradigme de l'immunologie quant à la distinction entre une réponse de type Th2 (humorale), associée à la susceptibilité, et une réponse protectrice de type Th1 (cellulaire) ou l'IFN- γ et l'IL-12 jouent un rôle prépondérant (Bogdan *et al.*, 1996).

En ce qui concerne la production de cytokines, deux scénarios sont envisageables pour promouvoir la survie de *Leishmania* à l'intérieur du macrophage; le parasite peut soit favoriser la sécrétion de cytokines associées à une inhibition des macrophages, NK ou cellules T, soit inhiber la production de cytokines activatrices de ces mêmes cellules (Bogdan and Röllighoff, 1999). Il semble en fait que *Leishmania* utilise parallèlement ces deux scénarios.

3.3.1. Production de cytokines inhibitrices

Parmi les cytokines susceptibles de contrecarrer le développement d'une réponse protectrice de type Th1 figurent le TGF- β et l'IL-10 (Bogdan and Nathan, 1993). Le TGF- β semble affecter la synthèse de NO (Nelson *et al.*, 1991) alors que l'IL-10 inhibe la synthèse de cytokines de type Th1, et en particulier l'IFN- γ (Fiorentino *et al.*, 1989). Or, le TGF-B est produit par les macrophages de hamsters infectés (in vivo) par L. donovani (Rodrigues et al., 1998), par les macrophages murins infectés (in vitro et in vivo) par L. major (Stenger et al., 1994) ou L. braziliensis (Barral et al., 1993). De plus, L. major peut induire la production d'IL-10 par des macrophages murins (Carrera et al., 1996) ou humains (Sartori *et al.*, 1997). L'importance du TGF- β dans la propagation du parasite a été mise en évidence par Barral-Netto et al. (1992). En traitant des souris normalement résistantes (C57BL/6) à L. amazonensis avec du rTGF-B, celles-ci y sont devenues susceptibles. À l'inverse, en traitant des souris habituellement susceptibles (BALB/c) au même parasite avec de l'anti-TGF- β , elles sont devenues résistantes à L. amazonensis (Barral-Netto *et al.*, 1992). In vitro, l'addition d'anti-TGF- β a restauré la réponse proliférative des cellules de nœuds lymphatiques isolées à partir de hamsters infectés par L. donovani (Rodrigues et al., 1998). Cette réponse est fortement inhibée lors d'une telle infection.

3.3.2. Inhibition de cytokines activatrices

3.3.2.1. TNF-α

Le TNF- α est une cytokine qui joue plusieurs rôles et affecte une grande variété de cellules. Elle est produite principalement par le macrophage activé (Sherry and

Cerami, 1988). Le TNF- α semble impliqué dans l'activité leishmanicide du macrophage en activant ce dernier plus qu'en agissant directement sur le parasite (Liew *et al.*, 1990). À lui seul, le rTNF- α n'a fait que réduire l'ampleur de l'infection, par *L. major*, de macrophages péritonéaux murins. Par contre, administré en combinaison avec l'IFN- γ , l'addition de rTNF- α a pratiquement éliminé *L. major* chez le même type de macrophage (Bogdan *et al.*, 1990). De plus, l'ajout d'anti-TNF- α à des cultures de macrophages infectés par *L. major* a considérablement réduit leur activité leishmanicide induite par l'IFN- γ (Stenger *et al.*, 1991).

Leishmania n'a donc pas intérêt à stimuler la production de TNF- α par le macrophage. En fait, *L. major* n'induit qu'une très faible transcription d'ARNm de TNF- α par des macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris BALB/c (Carrera *et al.*, 1996). Le même type de macrophages infectés par *L. donovani*, quant à eux, ne transcrivent pas d'ARNm de TNF- α du tout (Carrera *et al.*, 1996; Descoteaux and Matlashewski, 1989). Il est intéressant de constater qu'un mutant de *L. donovani* déficient en unités répétitives de disaccharides (R2D2) a induit la transcription d'ARNm de TNF- α dans le même genre d'expérience (Carrera *et al.*, 1996). Ceci sous-entend que les unités répétitives jouent un rôle dans la non-activation du macrophage, du moins en ce qui concerne l'expression du TNF- α .

Au fur et à mesure que *Leishmania* colonise un tissu ou un organe, les macrophages infectés peuvent voir leurs fonctions et capacités à produire des cytokines perturbées. Ainsi, Descoteaux et Matlashewski (1989) ont remarqué que les macrophages murins dérivés de la moelle osseuse de souris infectés par *L. donovani* étaient moins aptes à transcrire l'ARNm de TNF- α , suite à une stimulation au LPS. Carrera *et al.* (1996) ont remarqué le même effet inhibiteur chez les macrophages infectés par *L. major* et stimulés avec du LPS ou *Mycobacterium tuberculosis*. Par contre, les macrophages infectés par *L. donovani* conservaient leur capacité à transcrire l'ARNm de TNF- α suite à une stimulation au LPS. Carrera *et al.* (1996) ont remarqué le même effet inhibiteur chez les macrophages infectés par *L. major* et stimulés avec du LPS ou *Mycobacterium tuberculosis*. Par contre, les macrophages infectés par *L. donovani* conservaient leur capacité à transcrire l'ARNm de TNF- α suite à une stimulation avec *M. tuberculosis*.

L'IL-1 est une autre cytokine, produite par le macrophage, très importante dans la réponse immunitaire contre les pathogènes. Son rôle dans l'activation des cellules T est bien reconnu (Mizel, 1982). La production d'IL-1 par le macrophage infecté par *Leishmania* est très variable et dépend de : l'espèce et même la souche de *Leishmania*, la souche de souris et les auteurs considérés! Dans le cas de *L. major*, Cilliari *et al.* (1989) ont démontré que les macrophages péritonéaux de souris susceptibles à *L. major* sécrétaient des quantités appréciables d'IL-1, comparativement aux macrophages provenant de souris résistantes. Delfino *et al.* (1995) sont arrivés à des résultats tout à fait contraires; *L. major* induisait la production d'IL-1 seulement chez les macrophages péritonéaux provenant de souris résistantes (et vice-et-versa). Ces derniers auteurs ont aussi démontré que, en plus de *L. major*, certaines souches de *L. infantum* induisaient la sécrétion d'IL-1, toujours chez les macrophages provenant de souris résistantes à l'infection (Delfino *et al.*, 1995). Il est donc très difficile d'associer production d'IL-1 et issue de l'infection.

Toutefois, tous les auteurs s'entendent pour dire que *L. donovani* n'induit pas la production d'IL-1 par le macrophage, peu importe la souche de souris (Delfino *et al.*, 1995; Reiner, 1987). De plus, une fois infectés par *L. donovani*, les macrophages péritonéaux (BALB/c) produisent moins d'IL-1 lorsque stimulés avec *Listeria monocytogenes*, mais en produisent autant lorsque stimulés avec du LPS (Reiner, 1987). Les macrophages murins dérivés de la moelle osseuse (BALB/c) et infectés tant par *L. donovani* que *L. major*, sont aussi perturbés dans leur capacité à transcrire l'ARNm d'IL-1 α et IL-1 β quand ils sont traités subséquemment avec *M. tuberculosis* (Carrera *et al.*, 1996). Le LPG apparaît encore une fois impliqué dans ce processus d'inhibition. Lorsqu'incubés en présence de LPG provenant de *L. donovani* ou *L. major*, les monocytes humains produisent moins d'IL-1 suite à une stimulation au LPS (Frankenburg *et al.*, 1990). Il semble que le LPG agisse négativement sur la stabilité de l'ARNm de l'IL-1 β (Hatzigeorgiou *et al.*, 1996).

22

3.3.2.3. IL-12 et IFN-γ

L'IL-12 est probablement la cytokine produite par le macrophage la plus cruciale dans l'issue d'une infection par *Leishmania*. En effet, cette cytokine est la plus apte à optimiser la production d'IFN- γ par les cellules NK et les cellules T (Trinchieri, 1995). Or, l'IFN- γ est requis pour activer le macrophage et lui permettre d'éliminer efficacement *Leishmania* (Murray *et al.*, 1985). Le rôle de l'IFN- γ dans la synthèse du NO a d'ailleurs été abordé plus haut. En plus de promouvoir directement la production de NO par le macrophage, l'IFN- γ peut favoriser une réponse immunitaire de type Th1 en inhibant la prolifération des cellules de type Th2 (Fernandez-Botran, 1988).

Il n'est pas surprenant de constater que Leishmania ne stimule pas la production d'IL-12 par le macrophage. Les formes promastigotes (métacycliques) de L. donovani et L. major n'induisent pas la synthèse d'IL-12 chez les macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris BALB/c (Carrera et al., 1996). L. major métacyclique n'induit pas non plus l'IL-12 chez les monocytes humains (Sartori et al., 1997). Ce qui est le plus remarquable, c'est qu'une fois infecté par Leishmania, le macrophage est tout à fait incapable de produire de l'IL-12 suite à diverses stimulations. Carrera et al. (1996) l'ont démontré en stimulant des macrophages infectés avec du LPS (L. major) ou M. tuberculosis (L. major et L. donovani). Sartori et al. (1997) sont arrivés aux mêmes conclusions en utilisant Staphylococcus aureus comme stimulant de macrophages infectés par L. major. Des recherches employant la cytométrie en flux ont récemment confirmé les précédentes observations. Cette méthode a permis d'évaluer la réponse de pratiquement chacune des cellules infectées par L. major. Non seulement les macrophages n'ont pas produit d'IL-12 lors de l'infection, mais toutes les cellules infectées ont perdu leur capacité à produire l'IL-12, suite à une stimulation à l'IFN-y/LPS (Belkaid et al., 1998).

Il semble que les unités répétitives de disaccharides exprimées par Leishmania soient en cause dans l'inhibition de l'IL-12. En traitant des macrophages avec des glycoconjugués purifiés (L. major et L. mexicana) ou synthétisés, Piedrafita et al. (1999) ont découvert que les unités Gal-Man-PO₄ inhibaient la production d'IL-12 au niveau de la transcription de son ARNm. Cependant, dans des conditions plus physiologiques, le rôle du LPG dans l'inhibition de l'IL-12 n'est pas très clair. D'une part, Sartori et al. (1997) ont démontré que, contrairement aux métacycliques, les promastigotes procycliques de L. major induisaient la production d'IL-12 par le macrophage stimulé avec S. aureus. Or, la métacyclogénèse se caractérise, entre autres, par le dédoublement du nombre d'unité répétitives disaccharides (voir la section 2.1.). D'autre part, lorsqu'infectés par un mutant de L. donovani déficient en unités répétitives disaccharides (R2D2), les macrophages étaient toujours incapables de produire de l'IL-12 sous stimulation par M. tuberculosis (Carrera et al., 1996). Il s'est également avéré que les amastigotes de L. major et L. mexicana, qui sont pratiquement dépourvus de LPG, bloquaient la synthèse d'IL-12 des macrophages infectés et subséquemment traités avec du LPS (Weinheber et al., 1998). Il est donc possible que l'inhibition de la synthèse de l'IL-12 soit attribuable à l'expression ou à la sécrétion, par Leishmania, de molécules autres que le LPG mais arborant tout de même des unités répétitives de disaccharides.

4. Modulation des voies de signalisation

Les fonctions microbicides et sécrétoires du macrophage sont régulées très précisément par une multitude de voies de signalisation intracellulaires. L'activation d'un macrophage par un stimulus donné implique généralement la phosphorylation (réversible) d'enzymes spécifiques par l'addition de groupements phosphates à leurs résidus sérine, thréonine ou tyrosine (Krebs and Beavo, 1979). Parmi ces enzymes, les membres des familles d'IkB kinases (Baeuerle and Henkel, 1994), des protéines tyrosine kinases (PTK), des protéines kinases C (PKC), des *Janus* kinases (Jak), et des « mitogen-

activated protein kinases » (MAPK) jouent des rôles prépondérants dans l'activation du macrophage (Reiner, 1994). Pour un parasite intracellulaire, ces voies de signalisation représentent autant de cibles pour contrecarrer les fonctions effectrices du macrophage et ainsi favoriser la survie de *Leishmania*. Effectivement, les macrophages infectés par *Leishmania* ne répondent plus correctement à certains stimulus comme l'IFN- γ (Nandan and Reiner, 1995), le LPS (Reiner *et al.*, 1990) ou le diacylglycérol (Descoteaux and Matlashewski, 1989).

4.1. PTK

Les PTK ont un rôle à jouer dans les fonctions phagocytaires du macrophage (Greenberg, 1995), l'activité de la PKC (Dekker and Parker, 1994) et le métabolisme de l'acide arachidonique (Glaser et al., 1993). Sachant que tous ces mécanismes sont altérés lors de l'infection du macrophage par Leishmania (Descoteaux and Turco, 1993; Moore et al., 1993; Reiner and Malemud, 1985), Martiny et al. (1996) ont investigué l'activité des PTK de macrophages murins péritonéaux infectés par L. amazonensis. Ces derniers ont observé une augmentation transitoire de la phosphorylation des PTK de la cellule hôte dans les régions à proximité des promastigotes. La phosphorylation des PTK semble favoriser l'entrée des parasites puisque le traitement des macrophages avec des inhibiteurs de tyrosines kinases a réduit le niveau d'infection de façon dose-dépendante. Cependant, une souche avirulente induisait une phosphorylation plus intense des PTK que la souche virulente de promastigotes, une heure après le début de l'infection. Ces résultats suggèrent qu'une fois phagocyté, la virulence du parasite est associée à une modulation à la baisse de la capacité du macrophage à phosphoryler les PTK (Martiny et al., 1996). Ceci n'est pas surprenant étant donné l'implication des PTK dans la flambée respiratoire (Wei et al., 1993), la réponse à l'IFN-y (Greenlund et al., 1994) et la production de cytokines suite à une stimulation au LPS (Geng et al., 1993).

4.2. PKC

La famille des PKC est constituée de plusieurs isoenzymes qui jouent des rôles majeurs dans la transmission des signaux extra-cellulaires jusqu'au noyau (Nishizuka, 1988). L'infection par *Leishmania* a pour conséquence d'inhiber certaines des fonctions du macrophage dépendantes de la PKC telles la flambée respiratoire (Wilson *et al.*, 1986) et l'expression du gène c-*fos* (Descoteaux and Matlashewski, 1989), ce dernier étant un gène précoce essentiel à l'activation du nacrophage (Collart *et al.*, 1987). De plus, l'IFN- γ et le TNF- α , qui sont des cytokines promouvant l'activité microbicide (voir les sections 3.2., 3.3.2.1. et 3.3.2.3.), activent le macrophage via des voies de signalisation PKC-dépendantes (Fan *et al.*, 1988; Schütze *et al.*, 1990). En inhibant la PKC, *Leishmania* augmente donc considérablement ses chances de survie à l'intérieur du macrophage.

Parmi tous les rôles qui sont attribués au LPG, son pouvoir inhibiteur de la PKC est sans doute le mieux caractérisé (Descoteaux and Turco, 1993). Dans un contexte acellulaire, le LPG agit comme un inhibiteur compétitif de la PKC purifiée à partir de cerveau de rat ($K_1 < 1\mu$ M). Cette inhibition est sélective puisque le LPG n'a pas d'effet sur la région catalytique de la PKC, ni sur la PKA, une protéine kinase AMPc-dépendante (McNeely and Turco, 1987). Des études subséquentes ont permis de démontrer que c'est la portion 1-*O*-alkylglycérol du LPG qui possède le plus grand potentiel inhibiteur quoique la portion phosphoglycan peut également inhiber la PKC (McNeely *et al.*, 1989). Ces résultats suggèrent fortement que le LPG interagit avec le domaine régulateur de la PKC, cette région liant le diacylglycérol, le calcium et les phospholipides (Descoteaux and Turco, 1999).

Au cour de l'infection, le parasite se lie d'abord à la surface du macrophage, puis se retrouve à l'intérieur d'un phagosome, alors que la PKC transloque du cytosol à la surface cytosolique de la membrane plasmique. De plus, certaines de ses isoenzymes s'associent normalement à la surface cytosolique de la membrane du phagosome (Allen and Aderem, 1995). Malgré le fait qu'ils se retrouvent de part et d'autre de la double couche lipidique, le LPG inhibe la PKC. Giorgione *et al.* (1996) ont en effet démontré que le LPG peut d'une part, limiter l'association de la PKC à la membrane, et d'autre part, inhiber l'activité catalytique de l'enzyme liée à la membrane sans toutefois induire un changement dans sa conformation. Dans ces expériences, la forme complète du LPG avait un pouvoir inhibiteur plus important que ses fractions. L'effet inhibiteur de la PKC semble donc dépendre d'une altération, par le LPG, des propriétés physiques de la double couche lipidique. Ces observations sont en parfait accord avec les expériences démontrant que le LPG inhibait la fusion entre les phagosomes et les endosomes (Desjardins and Descoteaux, 1997), et entre des érythrocytes et des particules virales enveloppées (Miao *et al.*, 1995).

4.3. Calcium

Le calcium joue un rôle très important dans la régulation des fonctions du macrophage en tant que second messager et cofacteur enzymatique. Par exemple, la stimulation d'un macrophage avec le peptide chimiotactique fMLP (fMet-Leu-Phe) induit une libération de Ca²⁺, à partir des réserves intra-cellulaires (réticulum endoplasmique), auquelle est associée la génération d'une flambée respiratoire (Olivier *et al.*, 1992). Or, les macrophages infectés par *Leishmania* affichent des concentrations en Ca²⁺ cytosolique (disponible) environ deux fois plus élevées que les macrophages non-infectés (Eilam *et al.*, 1985; Olivier *et al.*, 1992). L'augmentation de la concentration en Ca²⁺ est due à un influx de ces cations du milieu extra-cellulaire vers le milieu intra-cellulaire, comme l'ont démontré des expériences utilisant du Ca²⁺ marqué à la radioactivité. Le mécanisme en cause n'est pas connu mais il semble que ni la protéine G, ni la phospholipase C (PLC) ne soient en cause (Olivier *et al.*, 1992). Olivier (1996) a suggéré que *Leishmania* puisse induire une activité phosphatase endogène ou exogène au macrophage. Ces phosphatases désactiveraient les pompes ATPase du réticulum endoplasmique. Il s'ensuivrait un débalancement à la baisse du contenu en Ca²⁺ dans le réticulum endoplasmique, ce qui
provoquerait l'ouverture des canaux à Ca^{2+} de la famille des SOC (store-operated Ca^{2+} channel) via un second messager (CIF, GMPc). Turco and Descoteaux (1992) ont suggéré que ce soit plutôt les propriétés de chélation du LPG envers le Ca^{2+} qui puissent moduler l'augmentation de la concentration intra-cellulaires en Ca^{2+} des macrophages infectés par *Leishmania*. En effet, les ions Ca^{2+} se lient au LPG à proximité des groupements phosphates (Homans *et al.*, 1992).

En plus de l'augmentation intra-cellulaire de Ca²⁺ observée, des monocytes humains infectés par *L. donovani* ne répondent plus normalement à une stimulation au fMLP; il y a moins de Ca²⁺ libéré du réticulum endoplasmique et moins de radicaux oxygénés produits (Olivier *et al.*, 1992). Les mécanismes impliqués ne sont pas connus avec certitude, mais Olivier *et al.* (1992) ont observé que les niveaux d'inositol 1,4,5triphosphate (IP₃) étaient anormalement bas chez les monocytes infectés. Or, l' IP₃ est responsable de la libération du Ca²⁺ à partir du réticulum endoplasmique. Il a été rapporté que les phosphatases acides exprimées à la surface de *L. donovani* pouvaient déphosphoryler *in vitro* l'IP₃ et il n'est pas impossible que ces molécules puissent interagir *in vivo* (Das *et al.*, 1986). D'autre part, l'élévation de la concentration en Ca²⁺ intra-cellulaire consécutive à l'infection par *Leishmania* pourrait activer des phosphatases endogènes au macrophage et dépendantes du Ca²⁺ qui pourraient elles aussi déphosphoryler l'IP₃ (Kukita *et al.*, 1986).

4.4. Jak/Stat

La réponse à l'IFN- γ des macrophages infectés par *Leishmania* est déficiente, en particulier en ce qui concerne l'expression de certains gènes comme le CMH II, ce qui contribue fort probablement à augmenter les chances de survie du parasite (Reiner *et al.*, 1988). La cause exacte de cette désactivation n'est pas connue et est probablement multifactorielle. Par exemple, des macrophages infectés par *L. donovani* ou *L. braziliensis* sécrètent respectivement des prostaglandines E₂ (PGE₂) (Reiner and Malemud, 1985) et du TGF- β (Barral *et al.*, 1993), deux molécules auto-inhibitrices qui atténuent la réponse à l'IFN- γ .

Chez le macrophage, la signalisation intra-cellulaire en réponse à l'IFN- γ implique la phosphorylation sur tyrosine de deux PTK de la famille *Janus*, Jak1 et Jak2. Ces dernières s'autophosphorylent et phosphorylent à leur tour Stat1(« signal transducer and activator of transcription 1 »), ce qui induit sa dimérisation et sa translocation dans le noyau. Stat1 va agir comme facteur de transcription des gènes précédés par des séquences qui lui sont spécifiques (« gamma interferon activation sequence »). Or, Nandan and Reiner (1995) ont démontré que l'infection par des amastigotes de *L. donovani* affectait la signalisation en réponse à l'IFN- γ . En effet, les niveaux de phosphorylation de Jak1, Jak2 et Stat1 étaient tous atténués chez des cellules U-937 différenciées de même que chez des monocytes humains infectés. Cette inhibition est sélective car le patron général de phosphorylation sur tyrosine induite par l'IFN- γ n'est pas altéré. Le mécanisme par lequel *Leishmania* affecte la voie des Jak/Stat n'est pas connu mais les auteurs invoquent une éventuelle activation, par le parasite, d'une phosphatase endogène au macrophage.

5. MAPKs et NF-KB

5.1. MAPKs

La voie des MAPKs (« mitogen-activated protein kinases ») permet la transmission intra-cellulaire d'une grande variété de signaux extra-cellulaires, par une cascade de phosphorylation des protéines qui en font partie. Chez les mammifères, il existe trois voies de MAPKs génétiquement distinctes et bien caractérisées : ERK (« extracellular signal-regulated kinase »), JNK (« c-Jun N-treminal kinase ») et p38 (Figure B). D'autres MAPKs ont été identifiées, comme la p57 (Lee *et al.*, 1993), et

l'identification de six MAPKs distinctes chez la levure laisse supposer qu'il en existe au moins autant chez le mammifère. En dépit du fait que les différentes MAPKs peuvent être activées par des stimuli extra-cellulaires particuliers, elles sont toutes activées en réponse au LPS (DeFranco *et al.*, 1998) ou au TNF- α (Van Lint *et al.*, 1992; Raingeaud *et al.*, 1995; Chan and Riches, 1998). Les MAPKs sont activées par la phosphorylation de deux résidus thréonine et tyrosine (TXY) situés dans un domaine régulateur commun à ERK, JNK et p38. Les différentes MAPKs sont phosphorylées par des MAPKKs qui leurs sont relativement spécifiques, ces dernières étant elles-mêmes activées par des MAPKKKs. La transmission des signaux extra-cellulaires aux MAPKKKs se fait par l'intermédiaire de plusieurs enzymes comprenant les GTPases telles que Ras et celles de la famille Rho. La PKC intervient également dans la voie des MAPKs (Blobe *et al.*, 1996). Une fois activées, ERK, JNK et p38 peuvent à leur tour phosphoryler leurs substrats sur des résidus sérine ou thréonine. Il faut noter qu'il semble y avoir beaucoup d'interactions au niveau de la spécificité des MAPKs pour leurs substrats (Cobb and Goldsmith, 1995; Lu *et al.*, 1999).



Figure B. Schéma d'organisation des MAPKs. Les enzymes encadrées sont homologues entre elles (Adapté de Weber, 1999).

ERK1 (p44) et ERK2 (p42) sont les deux enzymes les mieux caractérisées de cette voie mais d'autres enzymes apparentées ont été identifiées, comme ERK3 (Boulton et al., 1991) et ERK4 (Boulton and Cobb, 1991). La voie de ERK peut être activée en réponse à des agents mitogènes et des facteurs de croissance, tels que l'EGF et le PDGF, et régule la prolifération et la différentiation cellulaire (Cowley et al., 1994). ERK est aussi impliqué dans d'autres fonctions cellulaires comme la sécrétion (Cox and Parsons, 1997) et la motilité (Klemke et al., 1997). Il a été démontré que la phosphorylation de ERK2 entraînait son homodimérisation et sa translocation au noyau (Khokhlatchev et al., 1998). ERK peut également phosphoryler et activer des facteurs de transcription tels que elk1 (Gille et al., 1992) et NF-IL6 (Nakajima et al., 1993). Or, elk1 est reconnu pour promouvoir la transcription de c-fos qui, en tant que composante du facteur de transcription AP-1, joue un rôle important dans la production de cytokines (Karin, 1995). D'autre part, NF-IL6 est, entre autres, impliqué dans la production de l'IL-1 (Zhang and Rom, 1993), du TNF-α (Mukaida et al., 1990) et de iNOS (Lowenstein et al., 1993). L'implication de ERK dans la production du TNF-a ne fait plus de doute. Elle a été démontré dans des expériences utilisant des RAW 264.7 stimulées au LPS (Geppert et al., 1994), des macrophages péritonéaux murins également stimulés avec du LPS (Zheng and Specter, 1996) et des monocytes humains stimulés avec des IgG2 (Foreback et al., 1998).

Les deux voies de JNK et p38 peuvent être activées suite à l'exposition de la cellule à des perturbations de son micro-environnement (« stress-activated ») telles qu'un changement de température ou un débalancement osmotique. Les fonctions physiologiques de ces deux voies sont dès lors susceptibles de se recouper (Ip and Davis, 1998). Des études biochimiques et génétiques ont en effet démontré que JNK et p38 pouvaient être impliquées dans des fonctions cellulaires variées, voire même opposées. JNK et p38 ont en effet été associées à l'apoptose (Xia *et al.*, 1995) de même qu'à la prolifération et la différenciation cellulaire (Su *et al.*, 1994; Dickens *et al.*, 1997; Crawley *et al.*, 1997). Chez le macrophage, l'activation de JNK et de p38 a récemment été reliée à l'induction d'iNOS (Chan *et al.*, 1999; Chen and Wang, 1999). Il semble que ces deux MAPKs soient aussi nécessaires à l'induction de plusieurs cytokines pro-

inflammatoires. Ceci n'est pas surprenant quand on sait que JNK active préférenciellement c-Jun qui, avec c-Fos, forment le complexe AP-1 (Karin and Hunter, 1995). Quant à p38, elle peut phosphoryler une très grande variété de substrats, in vitro du moins, dont ATF-2 (Raingeaud et al., 1995) et elk1 (Raingeaud et al., 1996). JNK est en effet requise pour la production du TNF- α par des RAW 264.7 stimulés avec du LPS (Swantek et al., 1997). Il y a cependant plus d'études qui ont associé p38 et cytokines pro-inflammatoires. La p38 semble en partie responsable de la production d'IL-1 et de TNF- α chez des monocytes humains (Lee *et al.*, 1994), joue un rôle dans la transcription de l'IL-1ß chez des RAW 264.7 et des J774 (Baldassare et al., 1999) et régule la synthèse de l'IL-6 induite par le TNF-α chez des L929 (Beyaert et al., 1996). Tout récemment, Lu et al. (1999) ont démontré que des souris déficientes en MAPKK3, une kinase qui phosphoryle spécifiquement p38 (Dérijard et al., 1995), produisaient beaucoup moins d'IL-12 et d'IFN-y que les souris contrôles. Or, il a déjà été mentionné (plus haut) que ces deux cytokines sont très importantes pour générer une réponse de type Th1. Ces travaux confirment ce qu'avaient avancé Han et al. (1998) en établissant un lien entre l'activation de p38 et une meilleure réponse immunitaire de type cellulaire.

5.2. NF-κB

Parmi tous les facteurs de transcription, NF-κB est sans doute celui qui a le plus été étudié et son importance dans la régulation de plusieurs gènes est bien reconnue. NFκB est impliqué dans l'expression de facteurs de transcription (dont lui-même), de molécules d'adhésion, de protéines de la phase aïgue, d'immuno-récepteurs, de facteurs de croissance hématopoïétiques et de cytokines (Baeurle and Henkel, 1994). NF-κB est composé de deux sous-unités, la p50 et la p65 (Rel A), et fait partie de la famille des protéines Rel. Les protéines Rel ont en commun un domaine régulateur en N-terminal (Rel homology domain) responsable de la liaison à l'ADN, la dimérisation et l'interaction avec les membres de la famille IκB. IκB est un inhibiteur de NF-κB; il masque son signal de localisation nucléaire et retient NF-κB dans le cytoplasme, sous une forme inactive (Verma *et al.*, 1995). La famille d'IκB comprend plusieurs isoformes (Ghosh *et* *al.*, 1998). La première à avoir été clonée et, par le fait même, la mieux caractérisée est IκB-α (Kopp and Ghosh, 1995).

La voie de NF- κ B peut être activée lorsque la cellule subit un stress, est exposée à une infection virale ou bactérienne (LPS), ou encore en réponse à des cytokines proinflammatoires. Suite à l'une de ces stimulations, il y a activation d'une I κ B kinase (IKK- α) qui phosphoryle à son tour I κ B sur deux résidus sérines en N-terminal (Figure C). La phosphorylation d'I κ B provoque la dissociation du complexe NF- κ B/I κ B, ce qui permet à NF- κ B de transloquer au noyau. De son côté, I κ B est très rapidement polyubiquitiné et dégradé dans les protéasomes (Baeuerle and Baltimore, 1998). La phosphorylation d'I κ B est nécessaire à sa poly-ubiquitination et sa dégradation et ces deux derniers évènements sont essentiels à l'activation de NF- κ B (Verma *et al.*, 1995). En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de protéasomes cause une accumulation d'I κ B dans les cellules et inhibe l'activation de NF- κ B (DiDonato *et al.*, 1995).



Figure C. Activation de NF-KB (Adapté de Ghosh et al., 1998).

Chez le macrophage, l'activité de NF- κ B est cruciale. Ce dernier est effectivement impliqué dans l'expression des gènes M-CSF, G-CSF, GM-CSF, JE, IL-1, IL-6 et TNF- α , pour ne nommer que ceux-là (Baeurle and Henkel, 1994). Le TNF- α et l'IL-1 induisent l'activation de NF- κ B qui, en retour, va promouvoir l'expression de ces deux cytokines. Cette boucle de rétro-action positive démontre à quel point NF- κ B est important dans la réponse immunitaire et inflammatoire (Ghosh *et al.*, 1998). NF- κ B est aussi nécessaire à l'expression d'iNOS chez des macrophages stimulés au LPS (Xie, 1997).

5.3. MAPKs et NF-κB

Étant donné leur implication dans l'induction de plusieurs gènes de cytokines, il n'est pas surprenant de constater que la voie des MAPKs et celle de NF- κ B s'entrecoupent. L'association qui revient le plus souvent implique la p38 et NF- κ B. De nombreuses études utilisant différents types de cellules traitées avec des stimuli variés démontrent que la phosphorylation de p38 induit l'activation de NF- κ B (Vanden Berghe *et al.*, 1998; Zechner *et al.*, 1998; Maulik *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 1998; Nick *et al.*, 1999). Par contre, Schwenger *et al.* (1998) ont démontré que chez des cellules prétraitées avec un anti-inflammatoire (NaSal), l'activation de p38 inhibe la phosphorylation et la dégradation d'I κ B- α induites par le TNF- α . Outre cette dernière publication, d'autres auteurs ont suggéré que p38 et JNK soient toutes les deux impliquées dans l'activation de NF- κ B (Schulze-Osthoff *et al.*, 1997). Pour leur part, Li *et al.* (1998) ont démontré que l'activation de NF- κ B, requise pour la surproduction de mucine par des cellules épithéliales induite par *Pseudomonas aeruginosa*, était dépendante de la voie de ERK.

Les micro-organismes pathogènes ont développé plusieurs stratégies pour déjouer leurs hôtes. Certaines bactéries perturbent les voies des MAPKs et de NF-kB à leur avantage. Par exemple, *Yersinia enterocolitica* induit une désactivation générale des trois voies des MAPKs chez les macrophages (Ruckdeschel *et al.*, 1997). À l'opposé, Salmonella typhimurium provoque l'activation des trois voies des MAPKs en plus d'activer NF- κ B chez des cellules épithéliales, induisant entre autres la production d'IL-8 (Hobbie *et al.*, 1997). Or, *Leishmania* module lui aussi la production de cytokines chez les macrophages qu'ils infectent. C'est la raison principale pour laquelle nous avons étudié ce qui se passe au niveau des MAPKs et de NF- κ B lors d'une infection par *Leishmania*. Article

Submited to the Journal of Immunology on 08/25/99 (Annexe I)

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 macrophages¹

Charles Privé and Albert Descoteaux²

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

Running title: *Leishmania* promastigotes and MAPK activation in macrophages

Keywords: monocytes/macrophages; protozoan parasites; signal transduction; protein kinases

ABSTRACT

The protozoan parasite Leishmania fails to activate macrophages for the production of proinflammatory cytokines and selectively impairs signal transduction pathways in infected macrophages. Because mitogen-activated protein kinases (MAPK)- and NF-kB-dependent signaling pathways regulate various cellular functions including the production of inflammatory cytokines, we investigated their activation in mouse bone marrow-derived macrophages (BMM) exposed to L. donovani promastigotes. Remarkably, in naive BMM, attachment and ingestion of the parasite failed to induce the phosphorylation of p38 MAPK, c-Jun N-terminal kinase (JNK), and extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2, as well as the degradation of $I\kappa B-\alpha$. The use of L. donovani mutants defective in the biosynthesis of lipophosphoglycan revealed that evasion of ERK1/2 activation requires cell surface expression of the repeating unit moiety of this virulence determinant. In IFN-y-primed BMM, L. donovani promastigotes induced the rapid phosphorylation of p38 MAPK, followed by the phosphorylation of ERK1/2. This suggests a role for these pathways in the regulation of leishmanicidal activity in IFN-y-primed BMM. Finally, LPSinduced MAPK phosphorylation and $I\kappa B - \alpha$ degradation were normal in L. donovani-infected BMM. Collectively, these data suggest that the ability of L. donovani promastigotes to avoid activation of the MAPK and NF-kB pathways in macrophages may be part of the strategy evolved by this parasite to evade innate immune responses and delay the onset of an adaptative immune response.

INTRODUCTION

During its life cycle, the protozoan parasite *Leishmania* alternates between the promastigote form which develops in the midgut of sand flies, and the amastigote form which replicates in the phagolysosomal compartment of mammalian macrophages. Following inoculation into a mammalian host by a feeding sand fly, promastigotes must evade and resist non-specific defense mechanisms before entering macrophages by a receptor-mediated process (1). The entry process is remarkably silent, as promastigotes successfully avoid to activate macrophages for the production of NO and proinflammatory cytokines (2-4). Evasion of proinflammatory cytokines production such as IL-12 appears to be crucial to delay the onset of a cell-mediated immune response, given the pivotal role of this cytokine in the regulation of Th1 effector CD4 cell development and the triggering of IFN-γ production by both T cells and NK cells (5). In addition to avoid to activate macrophages during attachment and internalization, *Leishmania* parasites may promote their intracellular survival by impairing the responsivess of their host cells to extracellular signals, including IFN-γ and lipopolysaccharide LPS (2, 6-8).

To resist destruction and modulate host defense functions, *Leishmania* relies on various virulence determinants, including a family of specialized virulence glycoconjugates that have in common the presence of repeating Gal(β 1,4)Man(α 1)-PO₄ units (9, 10). Lipophosphoglycan (LPG³), which consists of a glycophosphatidylinositol-anchored polymer of the repeating units, represents the most abundant promastigote surface molecule and forms a dense glycocalyx around the parasite (10). In addition to its key role in the development of the promastigotes within the digestive tract of the sand fly (11, 12), LPG participates in a variety of processes during the establishment of

infection within macrophages, including inhibition of phagosomal maturation, resistance to oxygen radicals, impairment of signal transduction pathways, and modulation of cytokine and nitric oxide production (7, 13, 14-19). The potent inhibitory effect of LPG and the related glycosylinositolphospholipids on PKC activation may play an important role in the impairment of LPS-induced responses in infected macrophages (7, 15, 20-22).

MAPK cascades are evolutionarily conserved three-kinase modules that play a key role in the regulation of cellular functions in response to a variety of extracellular stimuli (23-25). The extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) cascade is primarily activated in response to mitogens and growth factors, and has thus been associated to the regulation of cell proliferation, development, and differentiation (25). The p38 MAPK and c-Jun N-terminal kinase (JNK) cascades become activated in response to a wide variety of physiological and stress-related stimuli and are believed to contribute to the regulation of inflammatory responses (26, 27). Similar to the MAPK cascades, the ubiquitous transcription factor NF- κ B is part of an evolutionarily conserved pathway activated in response to infection and stress (28). In macrophages, the MAPK cascades and the NF- κ B pathway play an important role in the regulation of functions involved in inflammation and host defense such as LPS-induced secretion of NO, TNF- α , IL-1, and IL-12, responses to cytokines, and Fc γ R-mediated phagocytosis (28-42).

In the present study, we have investigated the impact of *L. donovani* infection on the activity of the three MAPK cascades and on the NF- κ B pathway in mouse BMM. We report that in naive macrophages, *L. donovani* promastigotes evade the activation of these pathways, whereas in IFN- γ -primed macrophages, attachment and internalization of the parasite lead to the activation of p38 MAPK and ERK1/2, suggesting a role for these two MAPK pathways in the regulation of leishmanicidal activity in activated macrophages. Using LPG-defective mutants, we provide evidence that *L. donovani*

promastigotes require cell surface expression of LPG repeating units to evade the induction of ERK1/2 activation.

MATERIALS AND METHODS

Parasites. *L. donovani* promastigotes (1S) were grown at 27°C in RPMI 1640 medium supplemented with 20% heat-inactivated FBS, 100 μ M adenine, 20 mM MES (pH 5.5), 5 μ M hemin, 3 μ M biopterin, 1 μ M biotin and antibiotics. For infections, promastigotes were used in stationary phase of growth.

Macrophages. Bone marrow-derived macrophages were obtained by growing marrow cells from female BALB/c mice at 37°C in 5% CO₂ in complete medium [DMEM with glutamine (Life Technologies Inc., ON, Canada), containing 10% heat-inactivated FBS (Hyclone, Logan, UT), 10 mM HEPES pH 7.3, and antibiotics] in the presence of 15% (v/v) L929 cell-conditioned medium for seven days, as previously described (6). BMM were made quiescent by culturing them in complete medium in the absence of L929 cell-conditioned medium for 24 h prior to being used. BMM were stimulated with either 10 ng/ml LPS (*Escherichia coli*, strain 0127:B8, Sigma), 100 U/ml IFN- γ (Genzyme, Cambridge, MA) for the indicated period of time. Cytochalasin B (Sigma) was prepared in DMSO at 1mg/ml and was used at a concentration of 20 μ M to inhibit phagocytosis.

Targeted deletion of the LPG1 and LPG2 genes. The *LPG1* targeting construct was obtained in two steps. For the first step, a 609 bp fragment from the *LPG1 5'* UTR was amplified by PCR from *L. donovani* genomic DNA using oligodeoxynucleotides AD-31 (5'ccatcgatCGCCCGGCCGGCTC3') and AD-32 (5'tcccccgggTTCTCCGCGACGCG3'). This fragment was digested with *Cla*I and *Sma*I and ligated with the *Cla*I-*Sma*I-digested pBS-HYGB vector (provided by S. M. Beverley) upstream a hygromycin B cassette, yielding p5'HR-*LPG1*. For the second step, a 723 bp fragment comprising the last 547 bp of the *LPG1* ORF and 176 bp of the *LPG1* 3' UTR, was amplified by PCR from *L*.

donovani genomic DNA using oligodeoxynucleotides AD-33

(5'gctctagaAGCAGTTTGCCGACACGTACGGCATC3') and AD-34

(5'ataagaatgcggccgCTTTCCGTATACCTCTGCGG3'), digested with XbaI and NorI, and ligated with the XbaI-NorI-digested p5'HR-LPG1, downstream the hygromycin B cassette. The LPG1 targeting construct was excised as a 2.3 kb XhoI-KpnI fragment and transfected in WT L. donovani promastigotes as previously described (43). An hygromycin B-resistant clone, heterozygous at the LPG1 locus, was subjected to a lossof-heterozygosity protocol to obtain homozygous replacements (44, 45). Briefly, after two passages in the presence of high concentration of hygromycin B (100 µg/ml), LPG⁺ parasites were removed by agglutination with the monoclonal antibody CA7AE, and nonagglutinated cells were cloned on semi-solid medium. Five out of five clones analyzed were negative for cell surface expression of LPG and Southern blot analysis confirmed the absence of LPG1. The predicted glucidic terminal conformation of the truncated LPG expressed by these lpg1^{-/-} mutants was confirmed biochemically (46) (not shown). The lpg2^{-/-} mutant was generared using the LPG2 targeting construct previously described (47). The structures of the truncated LPG accumulating in the lpg1^{-/-} and lpg2^{-/-} mutants are shown in Figure 1.

Infection of BMM. Adherent BMM (2-3 X 10⁶/well) were incubated for the indicated time points with *L. donovani* promastigotes at a parasite-to-macrophage ratio of 10:1. For longer infections, uningested parasites were removed after 1 h by two washes with warm medium without serum. Infection levels were assessed by microscopic examination of Diff-Quick-stained cover slips placed in some wells.

Western blot analysis. Adherent BMM were washed once with cold phosphate-buffered saline containing $1 \text{mM} \text{Na}_3 \text{VO}_4$, and lysed with 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% Triton X-100 containing protease (Protease Inhibitor Cocktail, Boehringer Mannheim) and

phosphatase (50 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, 1 mM Na₃VO₄, 1.5 mM EGTA) inhibitors. Cell extracts were sonicated and protein concentrations were determined with the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL). Proteins (8-15 μ g/well) were fractionated in 10% SDS-PAGE, electroblotted onto Hybond-ECL membranes (Amersham Life Science) and immunodetected using enhanced chemiluminescence (Amersham Life Science). Antibodies against p38 MAPK, ERK1/2, JNK, IkB- α , ELK1, as well as Phospho-specific p38 (Thr180/Tyr182), Phospho-specific ERK1/2 (Thr202/Tyr204), and Phospho-specific ELK1 (Ser383) were from New England Biolabs (Beverly, MA). Anti-Active JNK was from Promega (Madison, WI) and peroxidase-conjugated anti-rabbit antiserum was from Amersham Life Science.

In vitro kinase assays. Adherent BMM (1.2-1.4 X 10^7 /dish) were incubated for 7 minutes with *L. donovani* promastigotes at a parasite-to-macrophage ratio of 10:1. The active form of ERK1/2 was immunoprecipitated using immobilized rProtein A (Intermedico, ON, Canada) coated with anti-Phospho-specific ERK1/2 (New England Biolabs) and incubated with 2 µg of inactive ELK1 fusion protein (New England Biolabs) in 50 µl kinase buffer (25 mM Tris [pH 7.5], 10 mM MgCl₂, 5 mM β-glycerophosphate, 2 mM DTT, 0.1 mM Na₃VO₄) at 30°C for 30 minutes. Phosphorylation levels of ELK1 were detected by Western blot analysis using a Phospho-specific ELK1 antiserum.

RESULTS

L. donovani promastigotes evade the induction of MAPK activation in BMM. MAPK play an important role in the regulation of proinflammatory cytokine production in macrophages (29-34, 36, 38, 40). Since *Leishmania* invades macrophages in a relatively silent way (2, 4), we determined whether the signal transduction pathways leading to MAPK activation were altered during the infection process. We first measured the kinetics of MAPK phosphorylation in BMM from 5 min to 60 min following the addition of WT promastigotes. Positive controls consisted of BMM stimulated with LPS (10 ng/ml) for the same periods of time. The activation state of p38 MAPK, ERK1/2, and JNK was assessed by Western blot analyses using antibodies specific to their phosphorylated forms. Whereas LPS induced a strong phosphorylation of p38 MAPK, ERK1/2, and JNK, WT *L. donovani* promastigotes consistently induced a slight dephosphorylation of p38 MAPK, a barely detectable and transient phosphorylation of ERK1/2, and failed to induce JNK phosphorylation (Figure 2A, B, and C).

LPG-defective *L. donovani* promastigotes induce ERK1/2 phosphorylation and activation. To determine the role of LPG in the modulation/evasion of MAPK phosphorylation, we assessed the kinetics of MAPK phosphorylation in BMM from 5 min to 60 min following the addition of either the *lpg1*^{-/-} or the *lpg2*^{-/-} mutants. Similar to WT promastigotes, the two LPG-defective mutants consistently induced a slight dephosphorylation of p38 MAPK, and failed to induce the phosphorylation of JNK (Figure 2A and C). However, in contrast to WT promastigotes, the two LPG-defective mutants significantly induced a rapid and transient phosphorylation of ERK1/2, which was apparent as early as 5 min after contact (Figure 2B). To determine whether the

induction of ERK1/2 phosphorylation by the LPG-defective mutants was contactdependent or required internalization of the parasites, BMM were pretreated with cytochalasin B, an inhibitor of phagocytosis, prior to infection. At the concentration used (20 µM), cytochalasin B inhibited Leishmania internalization, but did not prevent induction of ERK1/2 phosphorylation by the $lpg2^{-1}$ mutant (Figure 3). These data indicate that ERK1/2 activation is a contact-dependent process. To confirm that the phosphorylated form of ERK1/2 induced by the LPG-defective mutants (Figure 2B) was active, we performed in vitro kinase assays on ERK1/2 immunoprecipitated from BMM stimulated with either 10 ng/ml LPS, WT promastigotes, or the lpg2^{-/-} mutant (Figure 4A). The selected time point (7 min post-infection) corresponds to the optimal ERK1/2 phosphorylation induced by L. donovani (WT or lpg2^{-/-} mutant) (data not shown). As shown in Figure 4A, significantly higher levels of ELK1 fusion protein were phosphorylated by the phospho-ERK1/2 immunoprecipitated from lpg2^{-/-}-infected BMM than from WT-infected BMM. Densitometric analysis revealed that while WT promastigotes induced a 5-fold increase in ELK1 fusion protein phosphorylation over basal levels, the $lpg2^{-1}$ mutant induced a 38-fold increase over basal levels (Figure 4B).

IFN- γ pretreatment of BMM promotes p38 MAPK and ERK1/2 activation during *L*. donovani infection. Pretreatment of macrophages with IFN- γ induces potent leishmanicidal activity, which is accompanied by the secretion of NO and proinflammatory cytokines (48, 49). To evaluate whether IFN- γ priming alters the pattern of MAPK activation in response to *L. donovani* promastigotes, BMM were stimulated with 100 U/ml IFN- γ for 18 h prior to incubation with either WT promastigotes or LPG-defective mutants. Analyses of MAPK phosphorylation kinetics revealed that p38 MAPK phosphorylation was significantly and rapidly induced (5 min) by WT promastigotes and the LPG-defective mutants, and was sustained for at least one hour (Figure 5A). The phosphorylated form of JNK was barely detectable after 30 and 60 min of infection on over-exposed films (Figure 5C). As was the case with quiescent BMM, only the LPG-defective mutants significantly induced a rapid phosphorylation of ERK1/2 in IFN- γ -primed BMM (within 5 min) (Figure 5B). Both the WT promastigotes and the LPG-defective mutants induced high levels of ERK1/2 phosphorylation at later time points (30 min post-infection).

L. donovani promastigotes fail to activate the NF- κ B pathway in BMM. To evaluate the effect of *L. donovani* infection on the NF- κ B pathway, we measured I κ B- α degradation by Western blot analyses using an antiboby against I κ B- α . In contrast to LPS, which induced a rapid degradation of I κ B- α in normal BMM, neither WT nor LPGdefective *L. donovani* promastigotes induced I κ B- α degradation (Figure 6A). In IFN- γ primed BMM, *L. donovani* promastigotes induced a slight degradation of I κ B- α detectable at 60 min post-infection (Figure 6B). This late induction of I κ B- α degradation is independent of LPG and might be caused by the release of cytokines induced by *Leishmania* in IFN- γ -primed BMM.

L. donovani promastigotes infection does not impair LPS-induced MAPK activation and I κ B- α degradation. Leishmania-infected macrophages are selectively unresponsive to activating signals such as LPS (2, 6), which may be the consequence of impaired PKCdependent signal transduction pathways (50). Given the importance of MAPK and NF- κ B in the regulation of LPS responses (29, 31-34, 36, 40, 51), we compared the kinetics of LPS (10 ng/ml)-induced MAPK phosphorylation and I κ B- α degradation in uninfected BMM and in BMM infected for 18 h with either WT or the LPG-defective mutants. As shown in Figures 6C and 7, LPS-induced degradation of I κ B- α and phosphorylation of p38 MAPK, ERK1/2 and JNK in WT- or LPG-defective-infected BMM were similar to that observed in uninfected macrophages. Identical results were obtained with BMM infected for 3 hours prior to LPS stimulation (data not shown). These data indicate that LPS-induced MAPK activation and I κ B- α degradation are not inhibited during *L*. *donovani* infection.



Structure of the LPG from L. donovani and the truncated LPG Figure 1. accumulating in the lpg1^{-/-} and lpg2^{-/-} mutants. The L. donovani LPG comprises four domains: (i) an oligosaccharide cap, (ii) a polymer of repeating disaccharide-phosphate units (n=16 to 30 units per molecule), (iii) a glycan core, and (iv) a 1-O-alkyl-2-lyso-phosphatidylinositol anchor (PI). The LPG1 gene is required for the addition of the galactosylfuranose (Gal_f) within the glycan core (61). The $lpg l^{-4}$ mutant expresses the truncated LPG [Glc(α 1-P)]Man(α 1,3)Man(α 1,4)GN(α 1,6)-PI, and retains the ability to secrete the various repeating units-containing glycoconjugates (46). The LPG2 gene encodes for a transporter required for the transport of GDP-mannose into the Golgi lumen where repeating units are assembled on LPG and the various repeating units-containing glycoconjugates (44). The $lpg2^{-4}$ mutant expresses the truncated LPG $Gal(\alpha 1,6) Gal(\alpha 1,3)Gal(\beta 1,3)[Glc(\alpha 1-P)]Man(\alpha 1,3)Man(\alpha 1,4)GN(\alpha 1,6)-$ PI, and does not synthesize repeating units (44). Gal, galactose; Glc, glucose; GN, glucosamine; Man, mannose; P, phosphate.



Figure 2. Effect of L. donovani infection on MAPK activation. BMM were incubated in the absense (t=0) or the presence of either 10 ng/ml LPS, WT promastigotes, or the LPG-defective mutants $lpg1^{-/-}$ and $lpg2^{-/-}$, for 5, 10, 15, 30 and 60 min. Cell extracts were prepared (15 µg protein/well) and the levels of phosphorylated MAPK were measured by Western blot analysis using specific antibodies to (A) phospho-p38, (B) phospho-ERK1/2, and (C) phospho-JNK. The total levels of MAPK in each sample were also determined. The arrow indicates non-specific recognition of a *Leishmania* protein by the phospho-specific ERK1/2 antibody. The data shown in this figure are representative of three independent experiments.



Figure 3. Effect of cytochalasin B-treatment on the induction of ERK1/2 phosphorylation. BMM were incubated in the presence of 20 μ M cytochalasin B for 30 min prior to the addition of either 10 ng/ml LPS, WT promastigotes or the $lpg2^{-l-}$ mutant for 7 min. Uninfected and LPS-stimulated BMM were used as negative and positive controls, respectively. The levels of phosphorylated ERK1/2 (top panel) and ERK1/2 (bottom panel) were detected by Western blot analysis. The data shown in this figure are representative of two independent experiments.



Figure 4. In vitro ERK1/2 kinase assay. BMM were incubated with either 10 ng/ml LPS, WT promastigotes or the $lpg2^{-l}$ mutant for 7 min. The phosphorylated form of ERK1/2 was immunoprecipitated and incubated with ELK1 fusion protein (2 µg) for 30 min. Uninfected and LPS-stimulated BMM were used as negative and positive controls, respectively. (A) The levels of phosphorylated ELK1 (top panel) and ELK1 (bottom panel) were detected by Western blot analysis. (B) The relative phosphorylation levels of ELK1 were measured by densitometric analysis. The data shown in this figure are representative of two separate experiments.



Figure 5. Effect of IFN- γ -priming on *L. donovani*-induced MAPK phosphorylation in BMM. BMM were incubated in the presence of 100 U/ml IFN- γ for 18 h prior to the addition of either 10 ng/ml LPS, WT promastigotes, or LPG-defective mutants $lpg1^{-t}$ and $lpg2^{-t}$, for 5, 10, 15, 30 and 60 min. Cell extracts were prepared (15 µg protein/well) and the levels of phosphorylated MAPK were measured by Western blot analysis using specific antibodies to (A) phospho-p38, (B) phospho-ERK1/2, and (C) phospho-JNK. The total levels of MAPK in each sample were also determined. The data shown in this figure are representative of two separate experiments.



Figure 6. Effect of L. donovani on the degradation of $I \ltimes B - \alpha$ in BMM. (A) BMM were incubated in the presence of either 10 ng/ml LPS, WT promastigotes or the LPG-defective mutants $lpg1^{-l}$ and $lpg2^{-l}$ for 5, 10, 15, 30 and 60 min. Cell extracts were prepared (15 µg protein/well) and the levels of IkB- α degradation were determined by Western blot analysis using an anti-I κ B- α antibody. (B) BMM were incubated in the presence of 100 U/ml IFN-y for 18 h prior to the addition of either 10 ng/ml LPS, WT promastigotes, or the LPG-defective mutants $lpg1^{-l}$ and $lpg2^{-l}$, for 5, 10, 15, 30 and 60 min. Cell extracts were prepared (15 µg protein/well) and the levels of $I\kappa B-\alpha$ degradation were determined by Western blot analysis using an anti-I κ B- α antibody. (C) BMM were infected with either WT promastigotes or the LPG-defective mutants $lpg1^{-1}$ and $lpg2^{-1}$ for 18 h, prior to the addition of 10 ng/ml LPS for 5, 10, 15, 30 and 60 min. Uninfected BMM were used as control. Cell extracts were prepared (15 μ g protein/well) and the levels of IkB- α degradation were determined by Western blot analysis using an anti-I κ B- α antibody. The data shown in this figure are representative of at least two separate experiments.



Figure 7. LPS-induced MAPK phosphorylation in *L. donovani*-infected BMM. BMM were infected with either WT promastigotes or the LPG-defective mutants $lpg1^{-t}$ and $lpg2^{-t}$ for 18 h, prior to the addition of 10 ng/ml LPS for 5, 10, 15, 30 and 60 min. Uninfected BMM were used as control. Cell extracts were prepared (8 µg protein/well) and the levels of phosphorylated MAPK were determined by Western blot analysis using specific antibodies to (A) phospho-p38, (B) phospho-ERK1/2, and (C) phospho-JNK. The total levels of MAPK in each sample were also determined. The data shown in this figure are representative of two separate experiments.

DISCUSSION

Failure to activate macrophages to produce proinflammatory cytokines during the invasion process may be part of the strategy used by *Leishmania* parasites to evade and delay an effective immune response (2-4). To further characterize the mechanisms by which *Leishmania* avoids the induction of macrophage responses, we have examined the activation of the MAPK and NF- κ B pathways in BMM exposed to *L. donovani* promastigotes. Our main finding is that attachment and entry of *L. donovani* promastigotes failed to activate the phosphorylation of p38 MAPK, ERK1/2, and JNK, as well as the degradation of I κ B- α in naive macrophages. MAPK and the transcription factor NF- κ B are ubiquitous components of evolutionarily conserved pathways which play a central role in the regulation of immune responses, including the production of proinflammatory cytokines and NO (23, 25-28, 52). Evasion of MAPK pathways activation and I κ B- α degradation by *L. donovani* promastigotes may therefore represent a key step in the evasion of macrophage innate immune responses.

There is growing evidence that manipulation of host cell MAPK pathways during the infection process may be part of virulence strategies evolved by several pathogens. One such strategy consists in activating MAPK pathways during host cell invasion. For *Listeria monocytogenes*, induction of MAPK pathways may be required for uptake by host epithelial cells (53), whereas for *Salmonella typhimurium*, activation of MAPK pathways during intestinal epithelial cell invasion may contribute to the acute inflammatory responses induced by this pathogen (54). Activation of MAPK pathways by viruses may contribute to both their pathology and their replication. Hence, human immunodeficiency virus type 1 rapidly activates the ERK pathways in T cells via CD4, leading to the expression of cytokine and chemokine genes and contributing to viral

replication (55). Activation of ERK1/2 during human cytomegalovirus infection of foreskin fibroblasts may contribute to viral gene expression by regulating the activation of transcription factors involved in the control of early viral gene expression and DNA replication (56). For other pathogens, activation of MAPK pathways may engender undesirable host responses and they have thus devised effective strategies aimed at specifically deactivating or inhibiting these pathways. For example, *Yersinia* secretes YopJ during macrophage invasion, causing the rapid deactivation of ERK1/2, p38 MAPK, and JNK, to ultimately inhibit TNF- α production (57, 58). *Bacillus anthracis* selectively inhibits activation of ERK1/2 by proteolytically inactivating MAPK kinases 1 and 2 (59, 60). Evasion of MAPK activation during host cell infection may thus be viewed as a novel virulence strategy and may contribute to the silent entry of *Leishmania*.

Numerous studies have established the importance of LPG repeating units for the establishment of promastigotes within macrophages. In addition to scavenging oxygen radicals and inhibiting phagosomal maturation, the LPG repeating units inhibit cytokine and NO production (7, 13-19). While LPG repeating units are not involved in the evasion of p38 MAPK and JNK activation, our data showed that evasion of ERK1/2 activation requires the presence of this LPG moiety at the surface of promastigotes. Thus, repeating units may contribute partially to the silent entry of promastigotes inside macrophages. Our data indicated that induction of ERK1/2 activation by the LPG-defective mutants is a contact-dependent event. In spite of the fact that both LPG-defective mutants accumulate novel and distinct carbohydrate structures at their surface (44, 46) (Figure 1), they both induced ERK1/2 activation in a similar manner. One possible explanation is that in the absence of repeating units, which normally form a dense glycocalyx covering the entire surface of promastigotes, surface molecules that are normally buried under LPG are recognized by macrophage receptors. Recognition of

these surface molecules may thus be responsible for the induction of ERK1/2 activation by the LPG repeating unit-defective mutants. The consequences of ERK1/2 activation on the subsequent fate of LPG-defective mutants and on macrophage functions remain to be established. For instance, it will be of interest to determine whether the induction of TNF- α mRNA by R2D2 (2), a LPG-defective mutant phenotypically identical to the *lpg1*^{-/-} mutant (61), is related to ERK1/2 activation. We have previously reported that whereas WT *L. donovani* promastigotes are present in a phagosome displaying low fusogenic properties, LPG repeating units-defective mutants are internalized in a phagosome that rapidly matures into a compartment displaying phagolysosomal features (14, 47). Since the phagosomal maturation process is accompanied by cytoskeletal modifications (62), and given the role of the ERK1/2 pathway in regulating cytoskeletal reorganization (25, 63), the possibility that ERK1/2 activation by LPG-defective mutants influences the fate of the phagosome in which they are internalized will deserve further investigation.

In contrast to the evasion of ERK1/2 activation, failure to induce p38 MAPK and JNK activation as well as IkB- α degradation was independent of the presence of LPG at the promastigote surface. Of interest, we consistently observed a down-modulation of basal p38 MAPK phosphorylation levels occuring within the first 30 min of infection. This dephosphorylation of p38 MAPK might be mediated by the activation of one of the several dual specificity MAPK phosphatases that negatively regulate members of the MAPK superfamily (64-66). Alternatively, a protein phosphatase produced by *Leishmania*, such as the secreted acid phosphatase (67), could be responsible for the down-modulation of p38 MAPK phosphorylation. In recent years, it became clear that p38 MAPK, JNK, and IkB- α are part of ancient pathways conserved during evolution that regulate various cellular functions including the production of antimicrobial peptides in insects (68-70), and the production of proinflammatory cytokines in both the innate

and adaptative immune responses in vertebrates (26, 28, 32, 34, 40, 71). Given that in mammals, these pathways are activated by a wide spectrum of pathogens and pathogenderived molecules, it is significant that a protozoan parasite such as *L. donovani* evolved a strategy to evade their activation during infection of naive macrophages.

IFN-γ-primed macrophages produce NO and proinflammatory cytokines in response to *Leishmania* and become leishmanicidal (48, 49, 72). In IFN- γ -pretreated BMM, L. donovani promastigotes activated the phosphorylation of both p38 MAPK and ERK1/2. The phosphorylation of p38 MAPK was rapid and sustained and was independent of the presence of LPG repeating units on the parasite. In contrast, ERK1/2 phosphorylation was rapidly (5 min) induced by the LPG-defective mutants, but was induced only at a later time point (30 min) by WT promastigotes. A LPG-defective mutant expressing the first 5 repeating units of LPG (RT-5) (73) induced the activation of p38 MAPK and ERK1/2 with kinetics similar to those induced by WT promastigotes (data not shown), providing additional support for the importance of the repeating units in the modulation of macrophage responses. The impact of p38 MAPK and ERK1/2 activation on the expression of iNOS and various proinflammatory cytokines induced by Leishmania in IFN-y-activated macrophages, and on the regulation of leishmanicidal activity remains to be established. However, the absence of detectable JNK activation suggests that this pathway does not participate in Leishmania-induced responses in IFN- γ -activated macrophages.

In addition to avoid activating macrophages for the production of NO and proinflammatory cytokines, *Leishmania* impairs macrophage responsiveness to IFN- γ and LPS. Unresponsiveness of *L. donovani*-infected macrophages to IFN- γ may be related to a defective activation of JAK1 and JAK2 tyrosine phosphorylation (8, 74), whereas inhibition of PKC by LPG and other related glycolipids may contribute to the

selective impairment of LPS-induced events in infected macrophages (2, 6, 7, 22, 75). Given the importance of the MAPK and NF- κ B pathways in regulating LPS-induced responses, it was of interest to verify their integrity in *Leishmania*-infected macrophages. Interestingly, LPS-induced MAPK phosphorylation and IkB- α degradation were normal in *Leishmania*-infected macrophages. It is thus unlikely that impairment of LPS-induced responses such as IL-1 and IL-12 production in *Leishmania*-infected macrophages (2, 3) is the consequence of a defective activation of either MAPK or NF- κ B pathways. Future studies may reveal whether evasion of MAPK activation during host cell infection is a strategy used by other pathogens or is unique to *Leishmania*.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to P. Duplay, G. Matlashewski, and L. Borges for helpful discussions and critical comments on this manuscript.
REFERENCES

1. Alexander, J., and D. G. Russell. 1992. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv. Parasitol.* 31:175.

Carrera, L., R. T. Gazzinelli, R. Badolato, S. Hieny, W. Muller, R. Kuhn, and D. L. Sacks. 1996. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J. Exp. Med.* 183:515.
 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.* 138:1919.

4. Reiner, S. L., S. Zheng, Z. E. Wang, L. Stowring, and R. M. Locksley. 1994. *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. J. *Exp. Med. 179:447.*

5. Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13:251.

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

7. Descoteaux, A., S. J. Turco, D. L. Sacks, and G. Matlashewski. 1991. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. J. *Immunol.* 146:2747.

8. 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*.

64

9. Mengeling, B. J., S. M. Beverley, and S. J. Turco. 1997. Designing glycoconjugate biosynthesis for an insidious intent: phosphoglycan assembly in *Leishmania* parasites. *Glycobiology* 7:873.

10. Turco, S. J., and A. Descoteaux. 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:65.

Sacks, D. L., P. F. Pimenta, M. J. McConville, P. Schneider, and S. J. Turco. 1995.
 Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. J. Exp. Med. 181:685.

12. Sacks, D. L., E. M. Saraiva, E. Rowton, S. J. Turco, and P. F. Pimenta. 1994. The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. *Parasitology S55*.

13. Chan, J., T. Fujiwara, P. Brennan, M. McNeil, S. J. Turco, J. C. Sibille, M. Snapper, P. Aisen, and B. R. Bloom. 1989. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:2453.

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

15. Giorgione, J. R., S. J. Turco, and R. M. Epand. 1996. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:11634.

16. Hatzigeorgiou, D. E., J. Geng, B. Zhu, Y. Zhang, K. Liu, W. N. Rom, M. J. Fenton, S. J. Turco, and J. L. Ho. 1996. Lipophosphoglycan from *Leishmania* suppresses agonist-induced interleukin 1b gene expression in human monocytes via a unique promoter sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:14708.

17. McNeely, T. B., and S. J. Turco. 1990. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *J. Immunol.* 144:2745.

Piedrafita, D., L. Proudfoot, A. V. Nikolaev, D. Xu, W. Sands, G. J. Feng, E. Thomas,
 J. Brewer, M. A. Ferguson, J. Alexander, and F. Y. Liew. 1999. Regulation of macrophage
 IL-12 synthesis by *Leishmania* phosphoglycans. *Eur. J. Immunol.* 29:235.

19. Proudfoot, L., A. V. Nikolaev, G. J. Feng, W. Q. Wei, M. A. Ferguson, J. S.

Brimacombe, and F. Y. Liew. 1996. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:10984.

20. 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.

21. McNeely, T. B., G. Rosen, M. V. Londner, and S. J. Turco. 1989. Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochem. J.* 259:601.

22. McNeely, T. B., and S. J. Turco. 1987. Inhibition of protein kinase C activity by the Leishmania donovani lipophosphoglycan. Biochem. Biophys. Res. Commun. 148:653.

23. Cobb, M. H., and E. J. Goldsmith. 1995. How MAP kinases are regulated. J. Biol. Chem. 270:14843.

24. Schaeffer, H. J., and M. J. Weber. 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* 19:2435.

25. Seger, R., and E. G. Krebs. 1995. The MAPK signaling cascade. FASEB J. 9:726.

26. Ip, Y. T., and R. J. Davis. 1998. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:205.

27. Robinson, M. J., and M. H. Cobb. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9:180.

28. Ghosh, S., M. J. May, and E. B. Kopp. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:225.

29. Baldassare, J. J., Y. Bi, and C. J. Bellone. 1999. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 beta transcription. *J. Immunol.* 162:5367.

30. Chan, E. D., B. W. Winston, S. T. Uh, M. W. Wynes, D. M. Rose, and D. W. Riches. 1999. Evaluation of the role of mitogen-activated protein kinases in the expression of inducible nitric oxide synthase by IFN-gamma and TNF- alpha in mouse macrophages. *J. Immunol.* 162:415.

31. Chen, C. C., and J. K. Wang. 1999. p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. *Mol. Pharmacol.* 55:481.

32. Geppert, T. D., C. E. Whitehurst, P. Thompson, and B. Beutler. 1994.

Lipopolysaccharide signals activation of tumor necrosis factor biosynthesis through the ras/raf-1/MEK/MAPK pathway. *Mol. Med. 1:93*.

33. Hambleton, J., S. L. Weinstein, L. Lem, and A. L. DeFranco. 1996. Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide- stimulated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:2774.

34. Han, J., J. D. Lee, L. Bibbs, and R. J. Ulevitch. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265:808.

35. Karimi, K., and M. R. Lennartz. 1998. Mitogen-activated protein kinase is activated during IgG-mediated phagocytosis, but is not required for target ingestion. *Inflammation* 22:67.

36. Lu, H. T., D. D. Yang, M. Wysk, E. Gatti, I. Mellman, R. J. Davis, and R. A. Flavell.
1999. Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3
(Mkk3)-deficient mice. *EMBO J.* 18:1845.

37. Muller, J. M., H. W. L. Ziegler-Heitbrock, and P. A. Baeuerle. 1993. Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiology* 187:233.

38. Rose, D. M., B. W. Winston, E. D. Chan, D. W. Riches, P. Gerwins, G. L. Johnson, and P. M. Henson. 1997. Fc gamma receptor cross-linking activates p42, p38, and

JNK/SAPK mitogen-activated protein kinases in murine macrophages: role for p42MAPK in Fc gamma receptor-stimulated TNF-alpha synthesis. *J. Immunol.* 158:3433.

39. Sanchez-Mejorada, G., and C. Rosales. 1998. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J. Leukoc. Biol.* 63:521.

40. Swantek, J. L., M. H. Cobb, and T. D. Geppert. 1997. Jun N-terminal kinase/stressactivated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol. Cell. Biol.* 17:6274.

41. Weinstein, S. L., J. S. Sanghera, K. Lemke, A. L. DeFranco, and S. L. Pelech. 1992. Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogenactivated protein kinases in macrophages. *J. Biol. Chem.* 267:14955.

42. Winston, B. W., E. D. Chan, G. L. Johnson, and D. W. Riches. 1997. Activation of p38mapk, MKK3, and MKK4 by TNF-alpha in mouse bone marrow- derived macrophages. *J. Immunol.* 159:4491.

43. Descoteaux, A., L. A. Garraway, K. A. Ryan, L. K. Garrity, S. J. Turco, and S. M.
Beverley. 1994. Identification of genes by functional complementation in protozoan parasite *Leishmania*. In Methods in Molecular Genetics (Molecular Microbiology Techniques), Vol. 3. K. W. Adolph, eds. Academic Press, San Diego, p. 22.

44. Descoteaux, A., Y. Luo, S. J. Turco, and S. M. Beverley. 1995. A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. *Science* 269:1869.

45. Gueiros-Filho, F. J., and S. M. Beverley. 1996. Selection against the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) locus as a probe of genetic alterations in *Leishmania major. Mol. Cell. Biol. 16:5655*.

46. Huang, C., and S. J. Turco. 1993. Defective galactofuranose addition in lipophosphoglycan biosynthesis in a mutant of *Leishmania donovani*. J. Biol. Chem. 268:24060.

47. Scianimanico, S., M. Desrosiers, J.-F. Dermine, S. Méresse, A. Descoteaux, and M. Desjardins. 1999. Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell. Microbiol. 1:19*.

48. 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.

49. Reiner, N. E., W. Ng, C. B. Wilson, W. R. McMaster, and S. K. Burchett. 1990. Modulation of in vitro monocyte cytokine responses to *Leishmania donovani*. Interferongamma 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. 85:1914.

50. Descoteaux, A., and S. J. Turco. 1993. The lipophosphoglycan of *Leishmania* and macrophage protein kinase C. *Parasitol. Today* 9:468.

51. Reimann, T., D. Buscher, R. A. Hipskind, S. Krautwald, M.-L. Lohmann-Matthes, and M. Baccarini. 1994. Lipopolysaccharide induces activation of the Raf-1/MAP kinase pathway. A putative role for Raf-1 in the induction of the IL-1 beta and the TNF- alpha genes. *J. Immunol.* 153:5740.

52. Baldwin, A. S. J. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14:649.

53. Tang, P., C. L. Sutherland, M. R. Gold, and B. B. Finlay. 1998. *Listeria monocytogenes* invasion of epithelial cells requires the MEK-1/ERK-2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Infect. Immun.* 66:1106.

54. Hobbie, S., L. M. Chen, R. J. Davis, and J. E. Galan. 1997. Involvement of mitogenactivated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 159:5550. 55. Popik, W., J. E. Hesselgesser, and P. M. Pitha. 1998. Binding of human

immunodeficiency virus type 1 to CD4 and CXCR4 receptors differentially regulates expression of inflammatory genes and activates the MEK/ERK signaling pathway. J. Virol. 72:6406.

56. Rodems, S. M., and D. H. Spector. 1998. Extracellular signal-regulated kinase activity is sustained early during human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 72:9173.

57. Palmer, L. E., S. Hobbie, J. E. Galan, and J. B. Bliska. 1998. YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol. Microbiol.* 27:953.

58. Ruckdeschel, K., J. Machold, A. Roggenkamp, S. Schubert, J. Pierre, R. Zumbihl, J. P. Liautard, J. Heesemann, and B. Rouot. 1997. *Yersinia enterocolitica* promotes deactivation of macrophage mitogen- activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1/2, p38, and c-Jun NH2-terminal kinase. Correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor-alpha production. *J. Biol. Chem.* 272:15920.

59. Duesbery, N. S., C. P. Webb, S. H. Leppla, V. M. Gordon, K. R. Klimpel, T. D. Copeland, N. G. Ahn, M. K. Oskarsson, K. Fukasawa, K. D. Paull, and G. F. Vande Woude. 1998. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science* 280:734.

60. Vitale, G., R. Pellizzari, C. Recchi, G. Napolitani, M. Mock, and C. Montecucco. 1998. Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKs and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKs in cultured macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248:706.

 Ryan, K. A., L. A. Garraway, A. Descoteaux, S. J. Turco, and S. M. Beverley. 1993.
 Isolation of virulence genes directing surface glycosyl- phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:8609.
 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. 182:829. 63. Reszka, A. A., R. Seger, C. D. Diltz, E. G. Krebs, and E. H. Fischer. 1995. Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:8881.

64. Muda, M., U. Boschert, A. Smith, B. Antonsson, C. Gillieron, C. Chabert, M. Camps, I. Martinou, A. Ashworth, and S. Arkinstall. 1997. Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen- activated protein kinase phosphatase, MKP-4. *J. Biol. Chem.* 272:5141.

65. Muda, M., A. Theodosiou, N. Rodrigues, U. Boschert, M. Camps, C. Gillieron, K. Davies, A. Ashworth, and S. Arkinstall. 1996. The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 271:27205.

66. Tanoue, T., T. Moriguchi, and E. Nishida. 1999. Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, MKP-5. J. Biol. Chem. 274:19949.
67. Lovelace, J. K., D. M. Dwyer, and M. Gottlieb. 1986. Purification and characterization of the extracellular acid phosphatase of Leishmania donovani. Mol. Biochem. Parasitol. 20:243.

68. Dushay, M. S., B. Asling, and D. Hultmark. 1996. Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 93:10343.

69. Han, Z. S., H. Enslen, X. Hu, X. Meng, I. H. Wu, T. Barrett, R. J. Davis, and Y. T. Ip. 1998. A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates *Drosophila* immunity gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 18:3527.

70. Sluss, H. K., Z. Han, T. Barrett, R. J. Davis, and Y. T. Ip. 1996. A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev.* 10:2745.

71. Lee, J. C., J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Heys, S. W. Landvatter, J. E. Strickler, M. M.

McLaughlin, I. R. Siemens, S. M. Fisher, G. P. Livi, J. R. White, J. L. Adams, and P. R. Young. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature 372:739*.

72. Murray, H. W., G. L. Spitalny, and C. F. Nathan. 1985. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *J. Immunol.* 134:1619.

73. McNeely, T. B., D. L. Tolson, T. W. Pearson, and S. J. Turco. 1990. Characterization of *Leishmania donovani* variant clones using anti-lipophosphoglycan monoclonal antibodies. *Glycobiology* 1:63.

74. 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. USA*. 85:4330.

75. Frankenburg, S., V. Leibovici, N. Mansbach, S. J. Turco, and G. Rosen. 1990. Effect of glycolipids of *Leishmania* parasites on human monocyte activity. Inhibition by lipophosphoglycan. *J. Immunol.* 145:4284.

FOOTNOTES

1. This work was supported by establishment grants from the Fonds de la recherche en santé du Québec and the Fonds FCAR. C.P is the recipient of a studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. A.D. is Scholar from the Medical Research Council of Canada.

Address correspondence to Albert Descoteaux, Institut Armand-Frappier,
 Université du Québec, 531 des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7. Tel: (450)
 687-5010; Fax: (450) 686-5501; email: adescoteaux@hotmail.com

3. Abbreviations used in this paper: BMM, bone marrow-derived macrophages; LPG, lipophosphoglycan; PKC, protein kinase C; MAPK, mitogen-activated protein kinase; WT, wild type; ERK, extracellular signal-regulated kinase; JNK, Jun N-terminal kinase

Discussion

Dans cette étude, nous avons démontré que le LPG des promastigotes de L. donovani était nécessaire pour ne pas activer les MAPKs, et plus spécifiquement la voie de ERK1/2, chez les macrophages infectés. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons d'abord généré une série de trois mutants isogéniques de L. donovani déficients en unités répétitives Gal-Man-PO₄. La génération des mutants $lpg2^{-t}$ et $lpg3^{-t}$ a été rendue possible par l'utilisation de construction déjà disponibles au laboratoire (Scianimanico *et al.*, 1999; Descoteaux *et al.*, soumis). La caractérisation du mutant $lpg3^{-t}$ faisant l'objet d'un article non publié (Descoteaux *et al.*, soumis), nous n'avons pas obtenu les autorisations nécessaires pour diffuser les résultats que nous avons obtenu avec ce mutant. D'autre part, c'était la première fois qu'un mutant $lpg1^{-t}$ de L. donovani était généré et nous avons dû créer la construction ayant permis de remplacer, par recombinaison homologue, le gène LPG1 par un gène de résistance à l'hygromycine (Annexe II, Figure D). Nous avons ensuite procédé à des analyses de type « Southern blot » pour valider nos outils de travail (Annexe II, Figure E).

Après avoir confirmé que les mutant $lpg l^{-r}$ étaient bien dépourvus d'unités répétitives sur leurs LPG, nous avons procéder à d'autres expériences qui avaient pour but de vérifier la capacité du mutant à ajouter ces unités répétitives sur d'autres molécules. Ainsi, nous avons analysé l'activité des phosphatases acides sécrétées par les mutants $lpg l^{-r}$, de même que leur capacité à ajouter des Gal-Man-PO₄ sur ces molécules (Annexe II, Figure F). Tout comme les deux autres mutants et la forme sauvage de *L. donovani*, le mutant $lpg l^{-r}$ sécrète des phosphatases acides fonctionnelles (Annexe II, Figure Fa). De plus, le mutant $lpg l^{-r}$ sécrète des phosphatases acides qui arborent des unités répétitives disaccharides (Annexe II, Figure Fb), comme la forme sauvage de *L. donovani* (Lovelace and Gottlieb, 1986). Dans cette expérience, nous avons aussi confirmé que les mutants $lpg 2^{-r}$ et $lpg 3^{-r}$ n'avaient pas la capacité d'ajouter les Gal-Man-PO₄ à leurs phosphatases acides (Descoteaux *et al.*, 1995 ; Descoteaux *et al.*, soumis). Pour en apprendre d'avantage sur la quantité relative d'unités répétitives qui étaient ajoutées sur les phosphatases acides du mutant $lpg l^{-r}$, nous avons fait migré ces dernières dans un gel non-dénaturant, avant d'en révéler l'activité (Annexe II, Figure G). Dans ce type

d'expérience, la vitesse de migration est indirectement proportionnelle au nombre d'unités Gal-Man-PO₄ ajoutées aux phosphatases acides. Or, les résultats obtenus démontrent que le mutant $lpg1^{-t}$ additionne plus d'unités répétitives à ses phosphatases acides que la forme sauvage de *L. donovani*. Il est possible que le mutant $lpg1^{-t}$ compense sa défaillance à additionner les unités répétitives sur le LPG en ajoutant plus de Gal-Man-PO₄ sur d'autres types de molécules, dont les phosphatases acides. D'autre part, la vitesse de migration un peu plus lente des phosphatases acides du mutant $lpg3^{-t}$, comparativement à celles du mutant $lpg2^{-t}$, témoigne de la capacité du $lpg3^{-t}$ à ajouter le premier Man-PO₄ de la première unité répétitive à leurs phosphatases acides.

Pour mieux caractériser biochimiquement le mutant $lpg1^{-t}$, nous avons établi une collaboration avec S.J. Turco de l'Université du Kentucky. Ce dernier s'intéresse, entre autres, à l'activité galactosyl-transférase de l'enzyme LPG1. Le Dr Turco nous a confirmé que les résidus glucidiques de l'extrémité tronquée du LPG exprimé par le mutant $lpg1^{-t}$, correspondaient bien à la conformation prédite (Huang and Turco, 1993). De plus, un des membres de son laboratoire a réinsérer le gène *LPG1* dans le mutant $lpg1^{-t}$, rétablissant ainsi le phénotype de la forme sauvage de *L. donovani*. Nous avions nous même tenté de faire la même chose, mais sans succès. En effet, nous avons éprouvé des problèmes techniques, ce qui nous a empêché de mener à bien la construction d'un plasmide comprenant le gène *LPG1*. Les caractéristiques du mutant $lpg1^{-t}$, et en particulier sa capacité à ajouter des unités répétitives à ses phosphatases acides, a également permis d'établir une collaboration avec M. Desjardins de l'Université de Montréal. Ce chercheur s'intéresse au rôle du LPG dans l'inhibition de la fusion des phagosomes et des endosomes lors de l'infection des macrophages par *Leishmania*.

Avant de nous pencher sur l'activité des MAPKs et de NF-κB, nous avons jeté un coup d'œil du côté de la production de cytokines par les macrophages infectés par *L*. *donovani*. En effet, des études menées par Carrera *et al.* (1996) démontraient que des mutants de *L. donovani* déficients en unités répétitives, mais obtenus par mutagénèse

chimique, induisaient la transcription de quantités d'ARNm de TNF- α plus importantes que la forme sauvage, chez des macrophages (BMM) infectés par *L. donovani*. Nos trois mutants isogéniques de *L. donovani* déficients en unités répétitives étant bien caractérisés, nous avons pu nous en servir pour évaluer le rôle de ces dernières dans la modulation de la production d'autres cytokines chez les macrophages infectés. Ainsi, nous avons procédé à l'infection de macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris BALB/c avec les formes sauvages et mutantes de *L. donovani*. L'analyse par « Northern blot » a permis de confirmer que les mutants induisaient effectivement la transcription de plus d'ARNm de TNF- α par les macrophages. Toutefois, il n'a pas été possible de détecter la transcription d'autres cytokines, comme l'IL-1 et l'IP-10, que les macrophages aient été infectés par la forme sauvage ou les mutants de *L. donovani*.

N'ayant rien trouvé d'inédit quant au rôle du LPG dans la production de certaines cytokines par les macrophages infectés par L. donovani, nous nous sommes tourné du côté de la transduction des signaux intra-cellulaires. L'infection par L. donovani a pour effet d'inhiber, entre autres, la voie des Jak/Stat (Nandan and Reiner, 1995). Plus particulièrement, le LPG est impliqué dans l'inhibition de la PKC (Descoteaux and Turco, 1993), de même que dans l'inhibition de la production d'IL-1 (Hatzigeorgiou et al., 1996) et d'IL-12 (Piedrafita et al., 1999). Étant donné que les MAPKs et NF-κB sont impliquées dans la promotion de plusieurs gènes de cytokines pro-inflammatoires, nous avons décidé d'investiguer leur activité dans le contexte d'une infection par Leishmania. Mise à part une récente publication indiquant que des phosphoglycans synthétiques apparentés à ceux du LPG n'induisaient pas l'activation de NF- κ B chez la lignée de macrophages murins J774 (Piedrafita et al., 1999), rien n'était connu sur le sujet. Nos recherches ont permis de démontrer que la forme sauvage de L. donovani n'induisait pas significativement l'activation des voies de ERK, p38, JNK et NF-KB lors de la phase initiale de l'infection de macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris BALB/c. Ces résultats sont tout à fait cohérents avec le fait que L. donovani n'active pas le macrophage et que ceux-ci ne produisent pas de cytokines pro-inflammatoires lors de l'infection (Carrera et al., 1996). Par contre, les trois mutants lpg1^{-/-}, lpg2^{-/-} et lpg3^{-/-} ont tous induit une phosphorylation significative de ERK1/2, cinq minutes après le début de l'infection. Cette phosphorylation de ERK1/2 était accompagnée d'une augmentation de son activité et s'est avérée dépendante du contact initial entre les parasites et les macrophages. Collectivement, ces résultats suggèrent que les unités répétitives du LPG sont nécessaires aux promastigotes pour ne pas activer la voie de ERK1/2, au tout début de l'infection. Il est possible que cette activation de ERK1/2 soit reliée à la production de TNF- α de même qu'à la phagocytose d'un plus grand nombre de parasites observées lors de l'infection par les mutants, comparativement à l'infection par la forme sauvage de *L. donovani.* Peut-être existe-t-il aussi un lien entre l'activation de la voie de ERK1/2 et le fait que les mutants sont détruits par les macrophages.

Les macrophages pré-activés avec de l'IFN- γ ont la capacité de détruire Leishmania et produisent du NO, de l'IL-1 et du TNF- α lors de l'infection (Murray *et al.*, 1985; Reiner *et al.*, 1990). Chez les macrophages pré-activés à l'IFN- γ , nous avons démontré que *L. donovani* induisait une phosphorylation très rapide de p38 et que cette activation était soutenue durant toute la première heure d'infection. Lors de ces expériences, nous avons également remarqué une activation un peu plus tardive de ERK1/2 et NF- κ B, alors qu'aucune phosphorylation de JNK n'était observable. L'acquisition des capacités leishmanicides des macrophages pré-activés à l'IFN- γ semble donc dépendre, en partie du moins, de l'activation des voies de p38, ERK1/2 et NF- κ B.

Les macrophages infectés par *L. donovani* sont moins aptes à produire certaines cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 et l'IL-12, suite à une stimulation subséquente avec des sous-produits microbiens (Carrera *et al.*, 1996). Les MAPKs et NF- κ B étant impliqués dans l'expression de plusieurs gènes de cytokines, nous avons décidé de vérifier s'il était possible d'activer ces voies de signalisation avec du LPS, chez des macrophages qui avaient été préalablement infectés par *L. donovani*. Nous avons commencé par stimuler des macrophages qui avaient été infectés durant deux heures, avec 100 ng/ml de LPS. Ne décelant aucune défaillance dans l'activation des MAPKs et

de NF- κ B, nous avons répété le même type d'expérience en utilisant cette fois, 10 ng/ml de LPS, afin de s'assurer qu'une différence subtile entre l'activation de ces voies chez des macrophages infectés et non-infectés ne nous échappe pas. Ne trouvant toujours pas de défaut dans l'activation de ces voies de signalisation, nous avons prolongé la durée d'infection à 17 heures, toujours sans rien trouver. Les résultats obtenus indiquent que l'inhibition de la production de certaines cytokines chez les macrophages infectés par *L. donovani* ne peut être reliée à un dérèglement dans l'une ou l'autre des voies de signalisation étudiées. Il faudrait peut-être plutôt regarder du côté de la signalisation dépendante de la PKC, puisque cette dernière est inhibée lors de l'infection par *Leishmania* (Descoteaux and Turco, 1993).

Parallèlement à toutes les expériences portant sur les interactions entre les promastigotes (mutants et de type sauvage) de L. donovani et les macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris BALB/c, nous avons étudié l'effet de l'infection par la forme amastigote du parasite sur l'activité des MAPKs et de NF-kB chez le même type de macrophage. C'est sous la forme amastigote que Leishmania se propage d'un macrophage à l'autre, une fois l'infection établie chez le mammifère. Nous n'avons pas été en mesure de reproduire les expériences concernant la phosphorylation des trois MAPKs, induite par le LPS, chez des macrophages préalablement infectés par les amastigotes. Malgré tout, l'infection directe des macrophages naïfs par les amastigotes a révélé que ces derniers n'induisaient pas l'activation de ERK1/2 ni JNK, comme c'était le cas avec les promastigotes. Toutefois, les amastigotes ont induit une phosphorylation de la p38 significativement plus importante que celle qui avait été observée lors de l'infection par les promastigotes. D'autre part, chez les macrophages pré-activés à l'IFN- γ , les amastigotes ont induit une phosphorylation significative de ERK1/2 et de p38, de même qu'une dégradation d'IkB-a, semblables à celles observées lors de l'infection par les promastigotes. Cependant, la différence entre les niveaux de phosphorylation de la p38 observés chez les macrophages naïfs et pré-activés était plus subtile dans le cas des infections par les amastigotes.

Suite aux résultats que nous avons obtenus, il serait intéressant d'identifier la (les) molécule(s) exprimée(s) à la surface des mutants de *L. donovani* de même que le (les) récepteur(s) du macrophage impliqués dans la phosphorylation de ERK1/2 que nous avons pu observer lors du contact entre les deux antagonistes. Il serait également intéressant d'en apprendre d'avantage sur l'activité des différentes GTPases impliquées dans l'activation de chacune des trois voies des MAPKs, lors de l'infection des macrophages par *Leishmania*. Enfin, l'étude des facteurs de transcription situés en aval des MAPKs constitue la suite logique de ce projet.

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Albert Descoteaux, qui m'a permis de faire une maîtrise efficace et agréable. En plus de m'avoir appris à fonctionner dans un laboratoire, Albert m'a donné beaucoup de latitude quant au déroulement de mon projet.

Je remercie tous mes amis qui ont ensoleillé mon séjour à l'Institut et en particulier, Anik St-Denis qui m'a fait découvrir des techniques pour le moins inusitées...

Bibliographie

- Adams, D.O., and Hamilton, T.A. 1984. The cell biology of macrophage activation. Ann. Rev. Immunol. 2: 283-318.
- Allen, L.H., and Aderem, A. 1995. A role for MARCKS, the alpha isoenzyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. J. Exp. Med. 182 : 829-840.
- Baeuerle, P.A., and Henkel, T. 1994. Function and activation of NF-κB in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **12**: 141-179.
- Baldassare, J.J., Bi, Y., and Bellone, C.J. 1999. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 beta transcription. J. Immunol. 162: 5367-5373.
- Barral, A., Barral-Netto, M., Yong, E.C., Brownell, C.E., Twardzik, D.R., and Reed, S.G. 1993. Transforming growth factor β as a virulence mechanism for *Leishmania* braziliensis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 3442-3446.
- Barral-Netto, M., Barral, A., Brownell, C.E., Skeiky, Y.A.W., Ellingsworth, L.R., Twardzik, D.R., and Reed, S.G. 1992. Transforming growth factor-β in leismanial infection : a parasite escape mechanism. *Science*. **257** : 545-548.
- Bates, P.A., Hermes, I., and Dwyer, D.M. 1990. Golgi-mediated posttranscriptional processing of secretary acid phosphatase by *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 38: 247-256.
- Baeuerle, P.A., and Baltimore, D. 1988. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*. **242**: 540-546.
- Baeuerle, P.A., and Henkel, T. 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. Annu. Rev. Immunol. 12: 141-179.
- Belkaid, Y., Butcher, B., and Sacks, D.L. 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 : 1389-1400.
- Beverley, S.M., and Turco, S.J. 1998. Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. *Trends Microbiol.* **6**: 35-40.
- Beyaert, R., Cuenda, A., Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Lee, J.C., Haegeman, G., Cohen, P., and Fiers, W. 1996. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J.* 15 : 1914-1923.

- Blobe, G.C., Stribling, S., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. 1996. Protein kinase C isoenzymes: regulation and function. *In* Cancer Surveys. **27** : 213-218.
- Bogdan, C., Gessner, A., Solbach, W., and Röllinghoff, M. 1996. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 517-525.
- Bogdan C., Moll, H., Solbach, W., and Röllinghoff, M. 1990. Tumor necrosis factor- α in combination with interferon- γ , but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. *Eur. J. Immunol.* **20**: 1131-1135.
- Bogdan, C., and Nathan, C. 1993. Modulation of macrophage function by transforming growth factor-β, interleukin 4 and interleukin 10. *Ann. New York Acad. Sci.* **685** : 713-739.
- Bogdan, C., and Röllinghoff, M. 1999. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol. Today.* 15: 22-28.
- Boulton, T.G., and Cobb, M.H. 1991. Identification of multiple extracellular signalregulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul.* **2**: 357-371.
- Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H., and Yancopoulos, G.D. 1991.
 ERKs : a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell.* 65 : 663-675.
- Camargo, M.M., Andrade, A.C., Almeida, I.C., Travassos, L.R., and Gazzinelli, R.T. 1997. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide symthesis as well as microbicidal activity in IFN-γ-primed macrophages. J. Immunol. 159: 6131-6139.
- Carrera, L., Gazzinelli, R.T., Badolato, R., Hieny, S., Müller, W., Kühn, R., and Sacks, D.L. 1996. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J. Exp. Med.* 183 : 515-526.
- Carver, M.A., and Turco, S.J. 1991. Cell-free biosynthesis of lipophosphoglycan from Leishmania donovani. J. Biol. Chem. 266: 10974-10981.
- Chakaborty, R., Chakaborty, P., and Basu, M.K. 1998. Macrophage mannosyl fucosyl receptor : its role in invasion of virulent and avirulent *L. donovani* promastigotes. *Biosci. Rep.* 18 : 129-142.

- Chan, J., Fujiwara, T., Brennan, P., McNeil, M., Turco, S.J., Sibille, J.C., Snapper. M., Aisen, P., and Bloom, B.R. 1989. Microbial glycolipids : possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86 : 2453-2457.
- Chan, E.D., and Riches, D.W. 1998. Potential role of the JNK/SAPK signal transduction pathway in the induction of iNOS by TNF-alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253 : 790-796.
- Chan, E.D., Winston, B.W., Uh, S.T., Wynes, M.W., Rose, D.M., and Riches, D.W. 1999. Evaluation of the role of mitogen-activated protein kinases in the expression of inducible nitric oxide synthase by IFN-gamma and TNF-alpha in mouse macrophages. J. Immunol. 162: 415-422.
- Chang, K.P., and Dwyer, D.M. 1976. Multiplication of human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages *in vitro*. Science. **193**: 678-680.
- Chaudhuri, G., Chaudhuri, M., Pan, A., and Chang, K.-P. 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: 7483-7489.
- Chen, C.C., and Wang, J.K. 1999. p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. *Mol. Pharmacol.* 55 : 481-488.
- Cilliari, E., Dieli, M., Maltese, E., Milano, S., Salerno, A., and Liew, F.Y. Enhancement of macrophage IL-1 production by *Leishmania major* infection *in vitro* and its inhibition by IFN-γ. J. Immunol. 143: 2001-2005.
- Cobb, M.H., and Goldsmith, E.J. 1995. How MAP kinases are regulated. J. Biol. Chem. 270: 14843-14846.
- Collart, M.A., Belin, D., Vassali, J.-D., and Vassali, P. 1987. Modulation of functional activity in differentiated macrophages are accompanied by early and transient increase or decrease in c-fos gene transcription. J. Immunol. 139: 949-955.
- Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P., and Marshall, C.J. 1994. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell.* 77 : 841-852.
- Cox, M.E., and Parsons, S.J. 1997. Roles for protein kinase C and mitogen-activated protein kinase in nicotine-induced secretion from bovine adrenal chromaffin cells. J. Neurochem. 69: 1119-1130.

- Crawley, J.B., Rawlinson, L., Lali, F.V., Page, T.H., Saklatvala, J., and Foxwell, B.M. 1997. T cell proliferation in response to interleukins 2 and 7 requires p38MAP kinase activation. J. Biol. Chem. 272 : 15023-15027.
- Culley, F.J., Harris, R.A., Kaye, P.M., McAdam, K.P.W.J., and Raynes J.G. 1996. Creactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increase uptake into human macrophages. *J. Immunol.* **156** : 4691-4696.
- Das, S., Saha, A.K., Remaley, A.T., Glew, R.H., Dowling, J.N., Kajiyoshi, M., and Gottlieb, M. 1986. Hydrolysis of phosphoproteins and inositol phosphates by cell surface phosphatase of *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20: 143-153.
- DeFranco, A.L., Crowley, M.T., Finn, A., Hambleton, J., and Weinstein, S.L. 1998. The role of tyrosine kinases and MAP kinases in LPS-induced signaling. *Proc. Clin. Biol. Res.* 397 : 119-136.
- Dekker, L.V., and Parker, P.J. 1994. Protein kinase C: a question of specificity? *Trends Biochem. Sci.* 19: 73-77.
- Delfino, D., Chiofalo, M.S., Riggio, G., Angelici, M.C., Gramiccia, M., Gradoni, L., and Iannello, D. 1995. Induction of interleukin 1α in murine macrophages infected *in vitro* with different strains of *Leishmania*. *Microb. Pathog.* **18** : 73-80.
- Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J., and Davis, R.J. 1995. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science.* 267 : 682-685.
- Descoteaux, A., Avila, H.A., Mengeling, B.J., Ma, D., Turco, S.J., and Beverley, S.M. LPG3, a *Leishmania* homologue of mammalian GRP94, is required for repeating unit addition to the cell surface lipophosphoglycan. Soumis.
- Descoteaux, A., Garraway, L.A., Ryan, K.A., Garrity, L.K., Turco, S.J., and Beverley, S.M. 1994. Identification of genes by functional complementation in protozoan parasite *Leishmania*. *In* Molecular Microbiology Techniques. **3**: 22-48.
- Descoteaux, A., Luo, Y., Turco, S.J., and Beverley, S.M. 1995. A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. *Science*. **269** : 1869-1872.
- Descoteaux, A., and Matlashewski, G. 1989. C-fos and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 5223-5227.

- Descoteaux, A., Mengeling, B.J., Beverley, S.M., and Turco, S.J. 1998. Leishmania donovani has distinct mannosylphosphoryltransferases for the initiation and elongation phases of lipophosphoglycan repeating unit biosynthesis. Mol. Biochem. Parasitol. 94: 27-40.
- Descoteaux, A., and Turco, S.J. 1999. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochem. Biophys. Acta.* 1455 : 341-352.
- Descoteaux, A., and Turco, S.J. 1993. The lipophosphoglycan of *Leishmania* and macrophage protein kinase C. *Parasitol. Today.* **9**: 468-471.
- Desjardins, M. 1995. Biogenesis of phagolysosomes : the « kiss and run » hypothesis. *Trends Cell Biol.* **5** : 183-186.
- Desjardins, M., and Descoteaux, A. 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan. J. Exp. Med. 185: 2061-2068.
- Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G., and Griffiths, G. 1994. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with endocytic apparatus. J. Cell Biol. 124: 677-688.
- Dickens, M., Rogers, J.S., Cavanagh, J., Raitano, A., Xia, Z., Halpern, J.R., Greenberg, M.E., Sawyers, C.L., and Davis, R.J. 1997. A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science.* 277 : 693-696.
- DiDonato, J.A., Mercurio, F., and Karin, M. 1995. Phosphorylation of I kappa B alpha precedes but is not sufficient for its dissociation from NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol.* 15 : 1302-1311.
- Diefenbach, A., Schindler, H., Donhauser, N., Lorenz, E., Laskay, T., MacMicking, J., Rollinghoff, M., Gresser, I., and Bogdan, C. 1998. Type 1 interferon (IFNalpha/beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity*. 8: 77-87.
- Doering, T.L., Materson, W.J., Hart, G.W., and Englund, P.T. 1990. Biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol membrane anchors. J. Biol. Chem. 265: 611-614.
- Eilam, Y., El-On, J., and Spira, D.T. 1985. *Leishmania major*: excreted factor, calcium ions, and the survival of amastigotes. *Exp. Parasitol.* **59**: 161-168.
- Elhay, M., Kelleher, M., Bacic, A., McConville, M.J., Tolson, D.L., Pearson, T.W., and Handman, E. 1990. Lipophosphoglycan expression and virulence in ricinresistant variants of *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **40** : 255-267.

- El-On, J., Zvillich, M., and Sarov, I. 1990. *Leishmania major*: inhibition of the chemiluminescent response of human polymorphonuclear leukocytes by promastigotes and their excreted factors. *Parasite Immunol.* **12**: 285-295.
- Fan, X.-d., Goldberg, M., and Bloom, B.R. 1988. Interferon-γ-induced transcriptional activation is mediated by protein kinase C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 5122-5125.
- Fernandez-Botran, R., Sanders, V.M., Mosmann, T.R., and Vitetta, E.S. 1988. Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. J. Exp. Med. 168: 543-558.
- Fiorentino, D.F., Bond, M.W., and Mosmann, T.R. 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J. Exp. Med. 170: 2081-2095.
- Foreback, J.L., Sarma, V., Yeager, N.R., Younkin, E.M., Remick, D.G., and Ward, P.A. 1998. Blood mononuclear cell production of TNF-α and IL-8: engagement of different signal transduction pathways including the p42 MAP kinase pathway. J. Leuk. Biol. 64 : 124-133.
- Frankenburg, S., Leibovici, V., Mansbach, N., Turco, S.J., and Rosen, G. 1990. Effect of glycolipids of *Leishmania* parasites on human monocyte activity. J. Immunol. 145: 4284-4289.
- Garcia, J., Lemercier, B., Roman-Roman, S., and Rawadi, G. 1998. A *Mycoplasma fermentans*-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NF-kappaB activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways. J. Biol. Chem. 273: 34391-34398.
- Geng, Y., Zhang, B., and Lotz, M. 1993. Protein tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide induction of cytokines in human blood monocytes. J. Immunol. 151: 66292-66700.
- Geppert, T.D., Whitehurst, C.E., Thompson, P., and Beutler, B. 1994. Lipopolysaccharide signals activation of tumor necrosis factor biosynthesis through the ras/raf-1/MEK/MAPK pathway. *Mol. Med.* 1: 93-103.
- Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu. Rev. Immunol. 16: 225-260.
- Gille, H., Sharrocks, A., and Shaw, P.E. 1992. Phosphorylation of transcription factor p62^{TCF} by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature.* **358** :414-417.

- Giorgione, J.R., Turco, S.J., and Epand, R.M. 1996. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93** : 11634-11639.
- Glaser, K.B., Sung, A., Bauer, J., and Weichman, B.M. 1993. Regulation of cicosanoid biosynthesis in the macrophage : involvement of protein tyrosine phosphorylation and modulation by selective protein tyrosine kinase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 45 : 711-721.
- Greenberg, S. 1995. Signal transduction of phagocytosis. Trends Cell Biol. 5: 93-99.
- Greenlund, A.C., Farrar, M.A., Viviano, B.L., and Schreiber, R.D. 1994. Ligandinduced IFNγ receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J.* **13**: 1591-1600.
- Greis, K.D., Turco, S.J., Thomas, J.R., McConville, M.J., Homans, S.W., and Ferguson, M.A.J. 1992. Purification and characterization of an extracellular phosphoglycan from Leishmania donovani. J. Biol. Chem. 267: 5876-5881.
- Han, Z.S., Enslen, H., Hu, X., Meng, X., Wu, I.H., Barrett, T., Davis, R.J., and Ip, Y.T. 1998. A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates Drosophila immunity gene expression. *Mol. Cell Biol.* 18: 3527-3539.
- Handman, E., Greenblatt, C.L., and Goding J.W. 1984. An amphipathic sulphated glycoconjugate of Leishmania : characterization with monoclonal antibodies. *EMBO J.* 3 : 2301-2306.
- Handman, E., and Goding, J.W. 1985. The Leishmania receptor for macrophages is a lipid-contaning glycoconjugate. *EMBO J.* **4**: 329-336.
- Hatzigeorgiou, D.E., Geng, J., Zhu, B., Zhang, Y., Liu, K., Rom, W.N., Fenton, M.J., Turco, S.J., and Ho, J.L. 1996. Lipophosphoglycan from Leishmania suppresses agonist-induced interleukin 1β gene expression in human monocytes via a unique promoter sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93** : 14708-14713.
- Hobbie, S., Chen, L.M., Davis, RJ., and Galan, J.E. 1997. Involvement of mitogenactivated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by Salmonella typhimurium in cultured intestinal epithelial cells. J. Immunol. 159: 5550-5559.
- Homans, S.W., Melhert, A., and Turco, S.J. 1992. Solution structure of the lipophosphoglycan of Leishmania donovani. *Biochemistry*. **3**: 654-661.
- Huang, C., and Turco, S.J. 1993. Defective galactofuranose addition in lipophosphoglycan biosynthesis in a mutant of Leishmania donovani. J. Biol. Chem. 268: 24060-24066.

- Ilg, T., Overath, P., Ferguson, M.A.J., Rutherford, T., Campbell, D.G., and McConville, M.J. 1994. O- and N-glycosylation of the Leishmania mexicana-secreted acid phosphatase. J. Biol. Chem. 269: 24073-24081.
- Ilg, T., Stierhof, Y.-D., Craik, D., Simpson, R., Handman, E., and Bacic, A. 1996. Purification and structural characterization of a filamentous mucin-like proteophosphoglycan secreted by Leishmania parasites. J. Biol. Chem. 271 : 21583-21596.
- Ip, Y.T., and Davis, R.J. 1998. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK): from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **10**: 205-219.
- James, S.L. 1995. Role of nitric oxyide in parasitic infections. *Microbiol. Rev.* 59: 533-547.
- Joiner, K.A., Fuhrnam, S.A., Miettinen, H.M., Kasper, L.H., and Mellman, I. 1990. *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitiphorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science*. 249: 641-646.
- Karin, M. 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. J. Biol. Chem. 270: 16483-16486.
- Karin, M., and Hunter, T. 1995. Transcriptional control by protein phosphorylation : signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* **5** : 747-757.
- Katakura, K., and Kobayashi, A. 1988. Acid phosphatase activity of virulent and avirulent clones of *Leishmania donovani* promastigotes. *Infect. Immun.* 56 : 2856-2860.
- King, D.L., Chang, Y.D., and Turco, S.J. 1987. Cell surface lipophosphoglycan of Leishmania donovani. Mol. Biochem. Parasitol. 24: 47-53.
- Khokhlatchev, A.V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E., and Cobb, M.H. 1998. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell.* **93** : 605-615.
- Klegeris, A., Budd, T.C., and Greenfield, S.A. 1996. Acetylcholinesterase-induced respirarory burst in macrophages: evidence for the involvement of the macrophage mannose-fucose receptor. *Biochim. Biophys. Acta.* **1289**: 159-168.
- Klemke, R.L., Cai, S., Giannini, A.L., Gallagher, P.J., de Lanerolle, P., and Cheresh, D.A. 1997. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. J. Cell Biol. 137: 481-492.

- Kopp, E.B., and Ghosh, S. 1995. NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. Adv. Immunol. 58: 1-27.
- Krebs, E.G., and Beavo, J.A. 1979. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. Annu. Rev. Biochem. 48: 923-959.
- Kukita, M., Hirata, M., Koga, T. 1986. Requirement of Ca²⁺ for the production and degradation of inositol 1,4,5-trisphosphate in macrophages. *Biochim. Biophys.* Acta. 885 : 121-128.
- Lee, H., Ghose-Dastidar, J., Winawer, S., and Friedman, E. 1993. Signal transduction through extracellular signal-regulated kinase-like pp57 blocked in differentiated cells having low protein kinase C beta activity. J. Biol. Chem. 268: 5255-5263.
- Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., Strickler, J.E., McLaughlin, M.M., Siemens, I.R., Fisher, S.M., Livi, G.P., White, J.R., Adams, J.L., and Young, P.R. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 372: 739-746.
- Li, J.D., Feng, W., Gallup, M., Kim, J.H., Gum, J., Kim, Y., and Basbaum, C. 1998. Activation of NF-kappaB via a Src-dependent Ras-MAPK-pp90rsk pathway is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced mucin overproduction in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95 : 5718-5723.
- Liew, F.Y., Li, Y., Moss, D., Parkinson, C., Rogers, M.V., and Moncada, S. 1991. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxyde synthase in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* **21**: 3009-3014.
- Liew, F.Y., and O'Donnell, C.A. 1993. Immunology of Leishmaniasis. Adv. Parasitol. 32: 161-259.
- Liew, F.Y., Parkinson, C., Millott, S., Severn, A., and Carrier, M.J. 1990. Tumor necrosis factor (TNFα) in leishmaniasis. I. TNFα mediates host-protection against cutaneous leishmaniasis. *Immunology*. **69**: 570-573.
- Lovelace, J.K., and Gottlieb, M. 1986. Comparison of extracellular acid phosphatases from various isolates of *Leishmania*. Am. J. Trop. Med. Hyg. **35**: 1121-1128.
- Lowenstein, C.J., Alley, E.W., Raval, P, Snowman, A.M., Snyder, S.H., Russell, S.W., and Murphy, W.J. 1993. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **90** : 9730-9734.

- Lu, H.-T., Yang, D.D., Wysk, M., Gatti, E., Mellman, I., Davis, R.J., and Flavell, R.A. 1999. Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (*Mkk3*)-deficient mice. *EMBO J.* 18 : 1845-1857.
- Marth, T., and Kelsall, B.L. 1997. Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. J. Exp. Med. 185: 1987-1995.
- Martiny, A., Vannier-Santos, M.A., Borges, V.M., Meyer-Fernandes, J.R., Assreuy, J., Cunha e Silva, N.L., and de Souza, W. 1996. *Leishmania*-induced tyrosine phosphorylation in the host macrophage and its implication to infection. *Eur. J. Cell Biol.* **71** : 206-215.
- Maulik, N., Sato, M., Price, B.D., and Das, D.K. 1998. An essential role of NFkappaB in tyrosine kinase signaling of p38 MAP kinase regulation of myocardial adaptation to ischemia. *FEBS Lett.* **429** : 365-369.
- McConville, M.J., and Blackwell, J.M. 1991. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. J. Biol. Chem. **266**: 15170-15179.
- McConville, M.J., Collidge, T.A., Ferguson, M.A., and Schneider P. 1993. The glycoinositol phospholipids of *Leishmania mexicana* promastigotes. Evidence for the presence of three distinct pathways of glycolipid biosynthesis. J. Biol. Chem. 268: 15595-15604.
- McConville, M.J., and Ferguson, A.J. 1993. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem. J.* **294** : 305-324.
- McConville, M.J., Turco, S.J., Ferguson, M.A.J., and Sacks, D.L. 1992. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO. J.* **11**: 3593-3600.
- McMicking, J., Xie, Q.-w., and Nathan, C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. Ann. Rev. Immunol. 15: 323-350.
- McNeely, T.B., Rosen, G., Londner, M.V., and Turco, S.J. 1989. Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochem. J.* 259 : 601-604.
- McNeely, T.B., and Turco, S.J. 1987. Inhibition of protein kinase C activity by the Leishmania donovani lipophosphoglycan. Biochem. Biophys. Res. Comm. 148: 653-657.

- McNeely, T.B., and Turco, S.J. 1990. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. J. Immunol. 144: 2745-2750.
- Mengeling, B.J., Beverley, S.M., and Turco, S.J. 1997. Designing glycoconjugate biosynthesis for an insidious intent : phosphoglycan assembly in *Leishmania* parasites. *Glycobiology*. 7: 873-880.
- Miao, L., Stafford, A., Nir, S., Turco, S.J., Flanagan, T.D., and Epand, R,M. 1995. Potent inhibition of viral fusion by the lipophosphoglycan of *Leishmania* donovani. Biochemistry. 34: 4676-4683.
- Mizel, S.B. 1982. Interleukin 1 and T cell activation. Immunol. Rev. 63: 51-72.
- Moore, K.J., Labrecque, S., and Matlashewski, G. 1993. Alteration of *Leishmania* donovani infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction. J. Immunol. 150: 4457-4465.
- Moore, K.J., and Matlashewski, G. 1994. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. J. Immunol. 152: 2930-2937.
- Moore, K.J., Turco, S.J., and Matlashewski, G. 1994. Leishmania donovani infection enhances macrophage viability in the absence of exogenous growth factor. J. Leukoc. Biol. 55: 91-98.
- Mosser, D.M., and Rosenthal, L.A. 1993. Leishmania-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. Semin. Cell. Biol. 4: 315-322.
- Mukaida, N., Mahe, Y., and Matsushima, K. 1990. Cooperative interaction of NF-[kappa]B and C/EBP-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by proinflammatory cytokines. J. Biol. Chem. 265: 21128-21133.
- Murray, H.W., Spitalny, G.L., and Nathan, C.F. 1985. Activation of mouse peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo* by interferon-γ. J. Immunol. 134 : 1619-1622.
- Nadan, D., and Reiner, N.E. 1995. Attenuation on 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.
- Nakajima, T., Kinoshita, S., Sasagawa, T., Sasaki, K., Naruto, M., Kishimoto, T., and Akira, S. 1993. Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90** : 2207-2211.

- Nelson, B.J., Ralph, P., Green, S.J., and Nacy, C.A. 1991. Differential susceptibility of activated macrophage cytotoxic effector reactions to the suppressive effects of transforming growth factor-β1. J. Immunol. 146 : 1849-1857.
- Nick, J.A., Avdi, N.J., Young, S.K., Lehman, L.A., McDonald, P.P., Frasch, S.C., Billstrom, M.A., Henson, P.M., Johnson, G.L., and Worthen, G.S. 1999. Selective activation and functional significance of p38alpha mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils. J. Clin. Invest. 103: 851-858.
- Nishizuka., Y. 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature.* 334: 661-665.
- Olivier, M. 1996. Modulation of host cell intracellular Ca²⁺. *Parasitol. Today.* **12**: 145-150.
- Olivier, M., Baimbridge, K.G., and Reiner, N.E. 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: 1188-1196.
- Piedrafita, D., Proudfoot, L., Nikolaev, A.V., Xu, D., Sands, W., Feng, G.-j., Thomas, E., Brewer, J., Ferguson, M.A.J., Alexander, J, and Liew, F.Y. 1999. Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania* phosphoglycans. *Eur. J. Immunol.* 29: 235-244.
- Pimenta, P.F.P., Turco, S.J., McConville, M.J., Lawyer, P.G., Perkins, P.V., and Sacks, D.L. 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*. 256 : 1812-1815.
- Pimenta, P.F.P., Sariava, E.M.B., Rowton, E., Modi, G.B., Garraway, L.A., Beverley, S.M., Turco, S.J., and Sacks, D.L. 1994. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 9155-9159.
- Proodfoot, L., Nikolaev, A.V., Feng, G.-j., Wei, X.-q., Ferguson, A.J., Brimacombe, J.S., and Liew, F.Y. 1996. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 10984-10989.
- Puentes, S.M., da Silva, R.P., Sacks, D.L., Hammer, C.H., and Joiner, K.A. 1990. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. J. Immunol. 145: 4311-4316.

- Puentes, S.M., Dwyer, D.M., Bates, P.A., and Joiner, K.A. 1989. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. J. Immunol. 143: 3743-3749.
- Puentes, S.M., Sacks, D.L., da Silva, R.P., and Joiner, K.A. 1988. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. J. Exp. Med. 167: 887-902.
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., and Davis, R.J. 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: 7420-7426.
- Raingeaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Derijard, B., and Davis, R.J. 1996. MKK3and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell. Biol.* **16** : 1247-1255.
- 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**: 1919-1925.
- Reiner, N.E. 1994. Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. *Immunol. Today.* **15**: 374-381.
- Reiner, N.E., and Malumud, C.J. 1985. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani* : *in vitro* evidence for parasite induced alterations in cyclooxygenase and lipooxygenase pathways. J. *Immunol.* 134 : 556-563.
- Reiner, N.E., Ng, W., Ma, T., and McMaster, W.R. 1988. Kinetics of interferon-γ binding and MHC class II mRNA levels in *Leishmania*-infected macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 : 4330-4334.
- Reiner, N.E., Ng, W., Wilson, C.B., McMaster W.R., and Burchett, S.K. 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: 1914-1924.
- Rodrigues, V., da Silva, J.S., and Campos-Neto, A. 1998. Transforming growth factor β and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.* 66 : 1233-1236.

- Ruckdeschel, K., Machold, J., Roggenkamp, A., Schubert, S., Pierre, J., Zumbihl, R., Liautard, J.P., Heesemann, J., and Rouot, B. 1997. Yersinia enterocolitica promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1/2, p38, and c-Jun NH2-terminal kinase. Correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor-alpha production. J. Biol. Chem. 272: 15920-15927.
- Russell, D.G., and Talamas-Rohana, P. 1989. Leishmania and the macrophage : a marriage of inconveniance. Immunol. Today. 10 : 328-333.
- Ryan, K.A., Garraway, L.A., Descoteaux, A., Turco, S.J., and Beverley, S.M. 1993.
 Isolation of virulence genes directing surface glycosyl-phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 8609-8613.
- Ryter, A. 1985. Relationship between ultrastructure and specific functions of macrophages. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 8: 119-133.
- Sacks, D.L. 1989. Metacyclogenesis in Leishmania promastigotes. Exp. Parasitol. 69: 100-103.
- Sacks, D.L., Pimenta, P.F.P., McConville, M.J., Schneider, P., and Turco, S.J. 1995. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 181: 685-697.
- Sartori, A., Oliviera, M.A.P., Scott, P., and Trinchieri, G. 1997. Metacyclogenesis modulates the ability of *Leishmania* promastigotes to induce IL-12 production in human mononuclear cells. J. Immunol. 159: 2849-2857.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Riehemann, K., and Wesselborg, S. 1997. Regulation of NF-kappa B activation by MAP kinase cascades. *Immunobiology*. 198: 35-49.
- Schütze, S., Nottrott, S., Pfizenmaier, K., and Krönke, M. 1990. Tumor necrosis factor signal transduction. Cell-type-specific activation and translocation of protein kinase C. J. Immunol. 144: 2604-2608.
- Schwenger, P., Alpert, D., Skolnik, E.Y., and Vilcek, J. 1998. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by sodium salicylate leads to inhibition of tumor necrosis factor-induced IkappaB alpha phosphorylation and degradation. *Mol. Cell. Biol.* 18: 78-84.

- Scianimanico, S., Desrosiers, M., Dermine, J.-F., Méresse, S., Descoteaux, A., and Desjardins, M. 1999. Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania* promastigotes. *Cell. Microbiol.* 1: 19-32.
- Seay, M.B., Heard, P.L., and Chaudhuri, G. 1996. Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Infect. Immun.* **64** : 5129-5137.
- Sherry, B., and Cerami, A. 1988. Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine and autocrine control of inflammatory responses. J. Cell Biol. 107: 1269-1277.
- Small, P.L., Ramakrishnan, L., and Falkow, S. 1994. Remodeling schemes of intracellular pathogens. *Science*. 263: 637-639.
- Stenger, S., Solbach, W., Röllinghoff, M, and Bogdan, C. 1991. Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. II. Endogenous tumor necrosis factor- α production by macrophages is induced by the synergistic action of interferon (IFN)- γ and interleukin (IL) 4 and accounts for the antiparasitic effect mediated by l'IFN- γ and IL-4. *Eur. J. Immunol.* **21** : 1669-1675.
- Stenger, S., Thüring, H., Röllinghoff, M., and Bogdan, C. 1994. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major. J. Exp. Med.* 180 : 783-793.
- Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M., and Ben-Neriah, Y. 1994. JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell.* 77 : 727-736.
- Swantek, J.L., Cobb, M.H., and Geppert, T.D. 1997. Jun N-terminal kinase/stressactivated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-α) translation: glucocorticoids inhibit TNF-α translation by blocking JNK/SAPK. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 6274-6282.
- Tebo, J.M., and Mortensen, R.F. 1990. Characterization and isolation of a C-reactive protein receptor from the human monocytic cell line U-937. J. Immunol. 144: 231-238.
- Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptative immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 251-276.
- Turco, S.J., and Descoteaux, A. 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. Annu. Rev. Microbiol. 46: 65-94.

- Turco, S.J., and Sacks, D.L. 1991. Expression of stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **45** : 91-100.
- Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Boone, E., De Bosscher, K., Schmitz, M.L., Fiers, W., and Haegeman, G. 1998. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogenactivated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. J. Biol. Chem. 273 : 3285-3290.
- Van Lint, J., Agostinis, P., Vandevoorde, V., Haegeman, G., Fiers, W., Merlevede, W., and Vandenheede, J.R. 1992. Tumor necrosis factor stimulates multiple serine/threonine protein kinases in Swiss 3T3 and L929 cells. J. Biol. Chem. 267 : 25916-25921.
- Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D., and Miyamoto, S. 1995. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* 9: 2723-2735.
- Weber, M. 1999. Mitogen-activated protein kinase cascades. Upstate News and Views. Upstate Biotechnology.
- Wei, H., Wei, L., Frenkel, K., Bowen, R., and Barnes, S. 1993. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. *Nutr. Cancer.* 20: 1-11.
- Wei, X.-q., Charles, I.G., Smith, A., Ure, J., Feng, G.-j., Huang, F.-p., Xu, D., Muller, W., Moncada, S., and Liew, F.Y. 1995. Altered immune response in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature.* 375 : 408-411.
- Weinheber, N., Wolfram, M., Harbecke, D., and Aebischer, T. 1998. Phagocytosis of Leishmania mexicana amastigotes by macrophages leads to a sustained suppression of IL-12 production. Eur. J. Immunol. 28: 2467-2477.
- Wilson, E., Olcott, M.C., Bell, R.M., Merrill Jr., A.H., and Lambeth, J.D. 1986. Inhibition of the oxydative burst in human neutrophils by sphingoid long-chain bases. Role of protein kinase C in activation of burst. J. Biol. Chem. 261 : 12616-12623.
- Wright, S.D., and Silverstein, S.C. 1983. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. J. Exp. Med. 158: 2016-2023.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., and Greenberg, M.E. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. **270**: 1326-1331.

- Xie, Q. 1997. A novel lipopolysaccharide-response element contributes to induction of nitric oxide synthase. J. Biol. Chem. 272: 14867-14872.
- Zechner, D., Craig, R., Hanford, D.S., McDonough, P.M., Sabbadini, R.A., and Glembotski, C.C. 1998. MKK6 activates myocardial cell NF-kappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner. J. Biol. Chem. 273: 8232-8239.
- Zhang, Y., and Rom, W.N. 1993. Regulation of the interleukin-1β (IL-1β) gene by mycobacterial components and lipopolysaccharide is mediated by two nuclear factor IL-6 motifs. *Mol. Cell Biol.* **13**: 3831-3837.
- Zheng, Z.M., and Specter, S. 1996. Dynamic production of tumour necrosis factor- α (TNF- α) messenger RNA, intracellular and extracellular TNF- α by murine macrophages and possible association with protein tyrosine phosphorylation of STAT1 α and ERK2 as an early signal. *Immunol.* 87 : 544-550.
- Zilberstein, D., and Shapira, M. 1994. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **48** : 449-470.
Annexe I

FACSIMILE MESSAGE

TO: Dr. Albert Descoteaux (fax 450-686-5501)

FROM: The Journal of Immunology

DATE: August 27, 1999

NO. OF PAGES: 1

Dear Dr. Descoteaux:

This fax is to acknowledge receipt of the manuscript referenced below on 08/25/99. It has been sent out for review.

A further notice will follow as soon as a decision has been reached concerning publication of this paper. Please refer to the manuscript number in all inquires. For status questions, please contact The Journal of Immunology at (301) 530-7197.

Frank W. Fitch, M.D. Ph.D. Editor-in-Chief

RE: (IM992376Q) "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 macrophages", Charles Prive, Albert Descoteaux

* If you are not already an AAI member, please visit our website at "www.sciencexchange.com/aai" and fill-out a membership application. Annexe II



Figure D. Région du gène *lpg1* et construction de délétion du gène *lpg1*. A) Schéma de la région du gène *lpg1*. La région non-traduite en 5' (5' UTR) est représentée par un rectangle gris, la région non-traduite en 3' (3' UTR) est représentée par un rectangle hachuré et l'ORF du gène *lpg1* est représenté par un rectangle noir. Le fragment de 693 pb ayant servi de sonde lors des analyses par "Southern blot" est indiqué. B) Schéma de la construction de délétion du gène *lpg1*. Le gène de résistance à l'hygromycine (*hyg*) est représenté par un rectangle vide. Les sites de restriction *ClaI*, *SmaI*, *XbaI* et *NotI* ont été créés lors de l'amplification des régions homologues par PCR. Le fragment *XhoI/KpnI* (2,32 kb) a été utilisé pour éliminer le gène *lpg1*.



Figure E. Caractérisation par "Southern blot" des mutants de L. donovani déficients en unités répétitives disaccharides. L'ADN génomique des formes mutantes et sauvage a été digéré avec A) HindIII, B) EcoRV et C) NotI/AscI. La sonde lpg1 a été obtenue en amplifiant, par PCR, un fragment de 693 pb dans l'ORF du gène lpg1 (5'cgagatcTGGCGATATTCGTCCGTGTC3'-5'cgagatcTACGATATGGCAGCGAGGATG3'). Les deux autres sondes

S'cgagatcTACGATATGGCAGCGAGGATG3'). Les deux autres sondes ont été obtenues selon des méthodes déjà décrites (Scianimanico *et al.*, 1999; Descoteaux *et al.*, soumis).



Figure F. Analyse de l'activité des phosphatases acides sécrétées par la forme sauvage et les mutants lpg1^{-/-}, lpg2^{-/-} et lpg3^{-/-} de L. donovani. A) Activité totale. B) Activité des PA arborant des unités répétitives Gal-Man-PO₄ (Méthode décrite dans Katakura and Kobayashi, 1988).



Figure G. Gel d'activité des phosphatases acides sécrétées par la forme sauvage et les mutants *lpg1^{-/-}*, *lpg2^{-/-}* et *lpg3^{-/-}* de *L. donovani* (Méthode décrite dans Katakura and Kobayashi, 1988).