

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

RÉÉVALUATION DES SUBSTRATS DE LA MÉTALLOPROTÉASE GP63 DU PARASITE *LEISHMANIA*

Par

Marie-Michèle Guay-Vincent

Mémoire ou thèse présenté(e) pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
en Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation

Présidente du jury et
Examinatrice interne

Maritza Jaramillo Patino
INRS - Centre Armand-Frappier
Santé Biotechnologie

Examinatrice externe

Barbara Papadopoulou
Département de microbiologie-
infectiologie et d'immunologie, Faculté
de médecine. CR-CHUL

Directeur de recherche

Albert Descoteaux
INRS - Centre Armand-Frappier
Santé Biotechnologie

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon superviseur et mentor, Dr. Albert Descoteaux, grâce à qui mon expérience en recherche a été des plus instructive et stimulante. Je suis très reconnaissante de son support, de ses conseils judicieux et de la confiance qu'il m'a accordé tout au long de mon cheminement. J'ai d'ailleurs bien hâte d'entreprendre de nouveaux défis professionnels à ses côtés dans le futur.

Merci à tous mes collègues et anciens collègues de laboratoire, qui ont rendu ces années de maîtrise encore plus spéciales. Leur support a été essentiel à ma réussite, mais leur amitié est ce que j'en retire de plus important. Leurs personnalités uniques rendaient l'ambiance au laboratoire tout sauf monotone. Je pense tout particulièrement à Roman et ses excentricités, les chantonnements d'Ana et la douceur d'Ilona. Merci aussi à Kevin, Olivier, Guillermo et Nebai qui ont su me donner des conseils judicieux. Un merci spécial à celles qui avaient commencé ce projet de recherche avant moi, soit Anne-Marie, mais surtout Christine, qui m'a grandement aidée à mener à bien ce projet. Je m'ennuierai de nos pause-café. J'ai également eu la chance d'avoir un grand support moral de Felipe, en présentiel ou à distance, dont je serai toujours reconnaissante.

Merci à toute ma famille, mais spécialement à mes parents, Christine et Ray, et mon frère Tom, qui ont toujours été là inconditionnellement dans tout ce cheminement, mais également ma sœur Virginie avec qui je célèbre tous mes succès, ma tante et mon cousin Sam. J'aimerais remercier aussi mon parrain pour son support dans mes études et dans la vie, sans qui je n'aurais pu écrire ce mémoire puisqu'entre autres, il m'a offert mon ordinateur. Merci également à mes amis, Fernando, Andrés, Stéphanie, Jadaen, Émilie, Sam et Liz qui ont contribué de près ou de loin à mon succès. À mes amis de l'UdeM, Matheus, Émilie, Karolane, Francis, Richard, Terrie, Aléhandra, Alexandrine et Alex, ces années de maîtrise n'auraient également pas été les mêmes sans votre support moral et votre humour. Sénescence est gravé dans mon cœur pour la vie, merci d'exister. Finalement, je suis éternellement reconnaissante envers mon partenaire dans tout, Hamlet, sans qui je n'aurais pas eu autant de succès. Son aide, son expérience, ses conseils, sa présence et son amour ont été indispensables et incommensurable.

RÉSUMÉ

L'interaction initiale entre le parasite *Leishmania* et la cellule cible est médiée par des molécules de surface, dont la métalloprotéase GP63, qui influence la physiologie du macrophage infecté en clivant plusieurs protéines. Plusieurs de ces substrats ont auparavant été identifiés par différentes équipes de chercheurs. Cependant, ces recherches ne mentionnent pas l'utilisation d'un inhibiteur spécifique aux métalloprotéases lors de l'extraction des protéines. Après la lyse, elle peut alors effectuer des clivages sur des protéines qui n'auraient pas été en contact avec celle-ci dans une cellule intacte. Des tests par Western Blot ont donc été effectués en comparant les profils protéiques provenant de macrophages infectés par *Leishmania* et en ajoutant ou non dans le tampon de lyse un inhibiteur de métalloprotéase, la 1,10-Phénantroline. Cet inhibiteur chélate les ions de zinc et empêche donc toute action de clivage par le site actif. Selon les résultats obtenus, seulement 3 parmi les 10 substrats étudiés sont des substrats avérés de GP63. Ces résultats mènent à un questionnement quant au(x) rôle(s) proposé(s) de GP63 lors de l'infection et le besoin de le(s) rectifier.

Mots-clés : *Leishmania* ; GP63 ; leishmanolysin ; métalloprotéase ; 1,10-phénanthroline ; facteur de virulence

ABSTRACT

The initial interaction between the *Leishmania* parasite and the target cell is mediated by surface molecules, including the metalloprotease GP63, which influences the physiology of the infected macrophage by cleaving several proteins. These substrates have previously been identified by different teams of researchers. However, those researches do not mention the use of a specific metalloprotease inhibitor during protein extraction. After lysis, GP63 could still cleave some proteins that would not have been in contact with in an intact cell. Western blot tests were therefore made to compare the profiles of the extracted proteins from macrophages infected with *Leishmania* and by adding or not to the lysis buffer a metalloprotease inhibitor, 1,10-Phenanthroline. This inhibitor chelates zinc ions and therefore prevents any cleavage action by the active site. According to the results obtained, only 3 among the 10 substrates studied are true substrates of GP63. These results lead to questioning as to the proposed role(s) of GP63 during infection but also highlight the need to re-evaluate the other published substrates.

Mots-clés : *Leishmania* ; GP63 ; leishmanolysin ; metalloprotease ; 1,10-phenanthroline ; virulence factor

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	I
RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT.....	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XI
1 INTRODUCTION	1
1.1 LEISHMANIOSE	1
1.2 DECLINAISON DES SYMPTOMES	2
1.2.1 Viscérale	2
1.2.2 Muco-cutanée	2
1.2.3 Cutanée	3
1.3 CYCLE DE VIE DE <i>LEISHMANIA</i>	4
1.4 FACTEURS DE VIRULENCE	6
1.5 GP63	7
1.6 PARASITES MUTANTS POUR GP63.....	10
1.7 SUBSTRATS CONNUS DE GP63	12
1.8 1,10-PHENANTHROLINE	14
2 HYPOTHESE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	16
3 MATERIELS ET METHODES	17
3.1 DECLARATION D'ETHIQUE.....	17
3.2 CULTURE DE MACROPHAGES DERIVES DE LA MOELLE OSSEUSE MURINE	17
3.3 CULTURE DES PARASITES	18
3.4 INFECTION DE MACROPHAGES DERIVES DE LA MOELLE OSSEUSE MURINE PAR <i>LEISHMANIA</i>	18
3.5 LYSE CELLULAIRE	20
3.6 QUANTIFICATION DE PROTEINES	20
3.7 ÉLECTROPHORESE SDS-PAGE ET IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN.....	20
3.8 IMMUNOFLUORESCENCE ET MICROSCOPIE	21
3.9 STATISTIQUES	21
3.10 ANTICORPS	22
4 RÉSULTATS	23
4.1 DYNAMIQUE DE GP63 AU COURS DE L'INFECTION PAR <i>L. MAJOR</i> , <i>L. MAJOR</i> Δ GP63 ET <i>L. MAJOR</i> Δ GP63+GP63	23

4.2	SAPK/JNK, N'ETANT PAS UN SUBSTRAT CONNU DE GP63, N'EST PAS CLIVE MEME EN ABSENCE DE 1,10-PHENANTHROLINE	24
4.3	MTOR ET NLRP3 NE SONT PAS CLIVES PAR GP63	25
4.4	LES PROTEINES TYROSINE PHOSPHATASES N'ONT PAS LE MEME PROFIL DE CLIVAGE LORSQUE GP63 EST INHIBEE LORS DE LA LYSE CELLULAIRE.....	27
4.5	LES SOUS-UNITES DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION NF-KB ET AP-1 NE SONT PAS CLIVEES PAR GP63	29
4.6	REEVALUATION DU CLIVAGE DES SNARES VAMP3 ET VAMP8.....	31
4.7	L'INTENSITE DE FLUORESCENCE SPECIFIQUE A VAMP8 EST DIMINUEE DE FAÇON GP63-DEPENDANTE.....	33
5	DISCUSSION	39
6	CONCLUSION.....	47
7	BIBLIOGRAPHIE	49

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: TAXONOMIE DE <i>LEISHMANIA</i>	1
FIGURE 2 : ENDEMICITE DE LA LEISHMANIOSE CUTANEE A TRAVERS LE MONDE.	3
FIGURE 3: CYCLE DE VIE DE LEISHMANIA	5
FIGURE 4: FACTEURS DE VIRULENCE DE <i>LEISHMANIA</i>	6
FIGURE 5 : CRYSTAL DE GP63.....	7
FIGURE 6 : EXPRESSION DE MOLECULES DE SURFACE DE <i>LEISHMANIA MAJOR</i>	8
FIGURE 7: DISSEMINATION DE GP63 DANS UNE CELLULE INFECTEE	9
FIGURE 8 : GENES DE GP63 RETIRES DU GENOME DE <i>L. MAJOR</i>	11
FIGURE 9 : PLASMIDE (PROCURANT UNE RESISTANCE A LA NEOMYCINE) PRESENT DANS LA SOUCHE <i>L. MAJOR</i> <i>ΔGP63+GP63</i>	12
FIGURE 10 : MTOR LORS D'INFECTION PAR <i>L. MAJOR ΔGP63+GP63</i> , LORS D'UNE LYSE SIMULTANEE DES PARASITES AVEC LES CELLULES ET LORS D'UNE CO-INCUBATION DE LYSATS.....	14
FIGURE 11 : 1,10-PHENANTHROLINE LIANT UN ION DE ZINC ²⁺	15
FIGURE 12: ISOLATION DE PARASITES METACYCLIQUES A L'AIDE D'UN GRADIENT DE FICOLL.....	19
FIGURE 13 : DYNAMIQUE DE GP63 LORS D'INFECTIONS PAR <i>L. MAJOR</i> SAUVAGE (WT), <i>L. MAJOR ΔGP63</i> (KO) ET <i>L. MAJOR ΔGP63+GP63</i> (RES) A 2H, 6H ET 24H POST-INFECTION	24
FIGURE 14 : SAPK/JNK, N'ÉTANT PAS UN SUBSTRAT CONNU DE GP63, N'EST PAS CLIVÉ MÊME EN ABSENCE DE 1,10-PHÉNANTHROLINE	25
FIGURE 15 : MTOR ET NLRP3 NE SONT PAS CLIVES PAR GP63 LORSQUE LA 1,10-PHENANTHROLINE EST AJOUTEE LORS DE LA LYSE CELLULAIRE.....	26
FIGURE 16 : LES PROTEINES TYROSINE PHOSPHATASES N'ONT PAS LE MEME PROFIL DE CLIVAGE LORSQUE LA 1,10- PHENANTHROLINE EST AJOUTEE AU TAMPON DE LYSE.....	28
FIGURE 17 : LES SOUS-UNITES DES FACTEURS DE TRANSCRIPTIONS NK-KB ET AP-1 NE SONT PAS CLIVES LORSQUE LA 1,10-PHENANTHROLINE EST PRESENTE DANS LE TAMPON DE LYSE	30
FIGURE 18: RE-EXAMINATION DU CLIVAGE DES SNARES VAMP3 ET VAMP8.....	32
FIGURE 19 : L'INTENSITÉ DE FLUORESCENCE SPÉCIFIQUE À VAMP8 EST DIMINUÉE DE FAÇON GP63 DÉPENDANTE	35
FIGURE 20 : STX5 EST UN SUBSTRAT CONFIRME DE GP63	38

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : SUBSTRATS CONNUS DE GP63 DANS LA LITTERATURE (LISTE NON EXHAUSTIVE)	13
TABLEAU 2 : ANTICORPS UTILISES	22

LISTE DES ABRÉVIATIONS

APS : Ammonium persulfate

BMDM ou BMM : bone marrow derived macrophages

BSA : Bovine serum albumin

CP : protéases cystéine

CPB : cysteine protease B

DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium

GIPL : glycosylinositolphospholipides

GP63 : Glycoprotein63

GPI : glycoposphatidyinositol

HBSS : Hank balanced salt solution

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

JNK : Jun amino-terminal kinases

kDa : kilodalton

LCM : L929 conditioned medium

LPG : lipophosphoglycane

M : molaire

mL : millilitres

mM : millimolaire

mTOR : mechanistic target of rapamycin

NLRP3 : NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3

PBS : Phosphate-buffered saline

PKC : protéine kinase c

PPG : protéophosphoglycanes

RE : reticulum endoplasmique

ROS : Reactive oxygen species

SAP : phosphatases acides sécrétées

SAPK : Stress-activated protein kinases

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor

SVF : Sérum de veau foetal

SVF : sérum de veau foetal

TBS : Tris-buffered saline

VAMP3 : Vesicle-associated membrane protein 3

VAMP8 : Vesicle-associated membrane protein 8

1 INTRODUCTION

1.1 Leishmaniose

La leishmaniose est une maladie parasitaire menaçant plus de 350 millions d'individus à travers 98 pays d'Afrique, du Moyen-Orient, d'Asie et d'Amérique du Sud et centrale (CDC 2020; Inceboz 2019). Environ 12 millions de personnes sont infectées dans le monde, avec une augmentation de 1.5 à 2 millions chaque année (Torres-Guerrero et al. 2017). L'agent étiologique est le parasite intracellulaire *Leishmania*, dont plus de 20 espèces infectent l'humain (Torres-Guerrero et al. 2017; Inceboz 2019) (Figure 1).

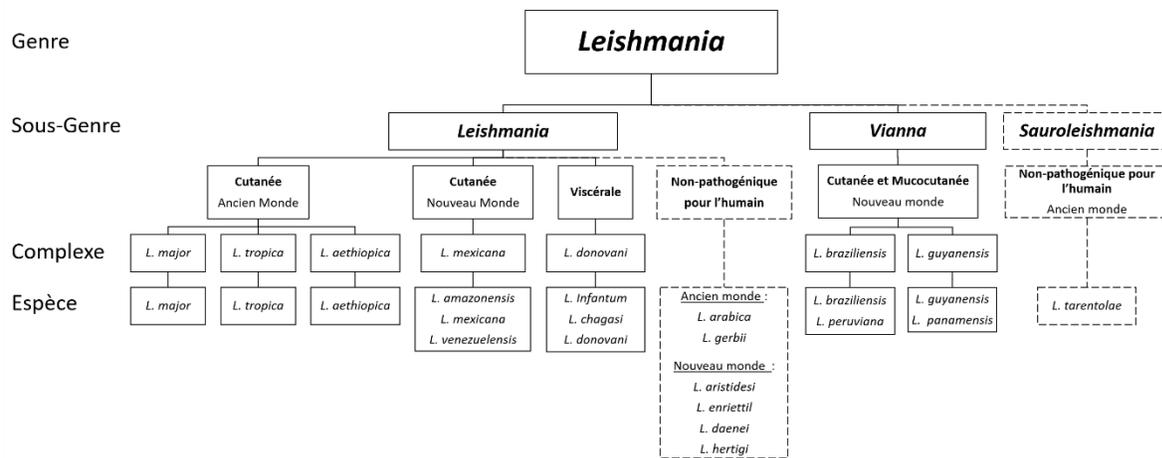


Figure 1: Taxonomie de *Leishmania*.

Inspirée de Inceboz (2019) et Bates (2007)

Ces parasites sont transmis lors d'un repas sanguin pris par des mouches de sable femelles du genre *Phlebotomus*, présentes dans les pays de « l'Ancien monde » soit au Moyen-Orient, Afrique, Asie, Inde et Europe de l'est, ou du genre *Lutzomyia* présent dans les pays du « nouveau monde », soit l'Amérique du Sud ou centrale (Eiras, Kirkman, and Murray 2015; Akhoundi et al. 2016). D'origine zoonotique, plus de 70 espèces animales sont connues comme étant des réservoirs naturels de *Leishmania*, incluant l'humain, les canidés, les rongeurs, les marsupiaux, les primates et bien d'autres (Roque and Jansen 2014). L'épidémiologie de la maladie et les manifestations cliniques dépendent grandement de l'espèce et de la souche de *Leishmania* impliquées, du genre et de l'espèce du vecteur, les caractéristiques du lieu de transmission, l'exposition présente ou passée de la population visée mais également du comportement de la population (WHO 2021).

En effet, la transmission du parasite est dépendante de la présence et de la reproduction du vecteur. Environ 90 espèces de mouches de sable sont connues pour leur capacité à transmettre les parasites (WHO 2021). Des changements climatiques/environnementaux peuvent favoriser le cycle de vie des mouches de sable, grandement affecté par les fluctuations de chaleur et d'humidité, et ainsi potentiellement augmenter les risques de transmission. Le réchauffement climatique mène donc également à de possibles migrations du vecteur vers des régions auparavant non-endémiques, infectant par le fait même des populations n'ayant jamais été exposées. À l'opposé, une incursion forestière ou un déplacement de population vers une zone préalablement inhabitée où un cycle de transmission est déjà présent mène également à de nouvelles infections. Les conditions socioéconomiques, plus particulièrement la pauvreté, augmentent aussi la probabilité d'installation d'un cycle de transmission. En effet, des habitations mal construites, de mauvaises conditions sanitaires dans les villes, l'absence de moustiquaire et des gens qui dorment à l'extérieur augmentent grandement l'accès aux repas de sang pour le vecteur. La malnutrition entraîne également davantage de risque de développer des symptômes plus sévères de la maladie (WHO 2021). Les gens habitant dans les pays en voie de développement sont donc les plus touchés considérant tous ces facteurs aggravants.

1.2 Déclinaison des symptômes

Les symptômes de la maladie se déclinent sous trois formes principales, selon la souche contractée :

1.2.1 Viscérale

Aussi connue sous le nom de kala-azar (signifie fièvre noire en Hindou), la forme viscérale de la leishmaniose est la plus mortelle. En effet, elle est fatale dans 95% des cas si non-traitée. Comme caractéristiques principales, les personnes infectées ont une fièvre, de l'anémie mais surtout la rate et le foie inflammés, ce qui fait gonfler l'abdomen (Chappuis et al. 2007). En 2019, 90% des nouveaux cas rapportés à l'Organisation Mondiale de la Santé se retrouvaient principalement dans 10 pays, mais surtout au Brésil et en Inde (WHO 2021). Les espèces connues pour engendrer ces manifestations cliniques sont *L. donovani*, *L. infantum* et *L. chagasi*.

1.2.2 Muco-cutanée

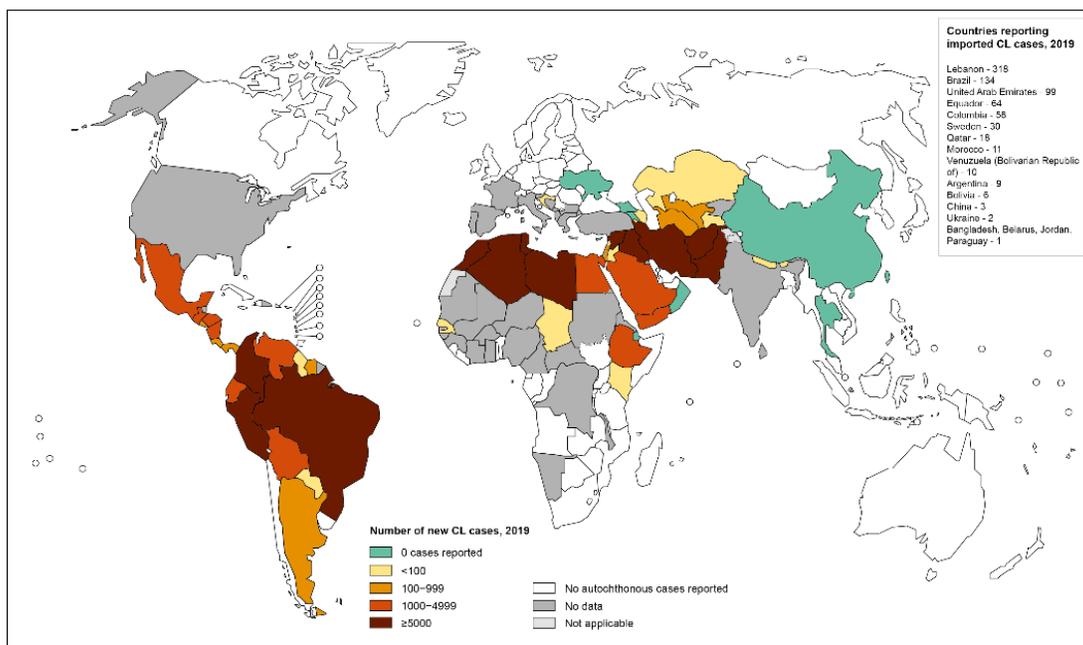
Caractérisée par une destruction partielle ou totale de la muqueuse nasale/buccale affectée, cette forme de la maladie n'est pas mortelle mais douloureuse pour les personnes infectées. Cette

forme étant plus rare, 90% des cas rapportés occurrent dans un nombre limité de pays, soit en Bolivie, au Brésil, au Pérou et en Éthiopie. (WHO 2021) L'espèce étiologique principale est *L. brasiliensis* (Chappuis et al. 2007).

1.2.3 Cutanée

Causée entre autres par l'espèce d'intérêt pour ce projet, *L. major*, mais aussi par *L. mexicana* et *L. tropica*, cette forme de la maladie est la plus communément retrouvée à travers le monde. En effet, 90% des cas rapportés sont localisés en Afghanistan, en Algérie, au Brésil, en Colombie, en Iran, Iraq, Libye, Pakistan, en Syrie et en Tunisie (Eiras, Kirkman, and Murray 2015) (Figure 2) Les symptômes se manifestent sous forme d'ulcères cutanés chroniques. Sans être mortelles, ces lésions peuvent laisser des cicatrices à vie et stigmatisent ceux qui les ont (WHO 2021). Il est estimé qu'il y a 600 000 à 1 million de nouvelles infections par année à travers le monde (Figure 2).

Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2019



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2021. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figure 2 : Endémicité de la leishmaniose cutanée à travers le monde. (WHO 2021)

1.3 Cycle de vie de *Leishmania*

Les parasites du genre *Leishmania* sont des organismes biphasiques, ce qui signifie que leur cycle de vie nécessite deux hôtes. Tel que mentionné auparavant, une partie du cycle de vie dépend de la mouche de sable. Lors de cette partie du cycle, le parasite est extracellulaire et sa morphologie appelée promastigote est caractérisée par une forme allongée arborant un flagelle motile. Les promastigotes se multiplient dans le tractus digestif de l'arthropode. Dans l'hôte mammifère, le cycle est exclusivement intracellulaire. Les parasites ont alors une forme arrondie et compacte sans flagelle qu'on appelle amastigote. Les cibles cellulaires de prédilection sont les phagocytes, tels que les macrophages mais également les cellules dendritiques, les monocytes et les neutrophiles peuvent également être infectés. Il y a plusieurs étapes intermédiaires entre la forme amastigote hautement résistante et la forme promastigote métacyclique ultra infectieuse (Sacks and Kamhawi 2001). Premièrement, la mouche prend un repas de sang contenant des amastigotes en piquant un animal infecté. Le sang est emmené à l'intestin et est retenu à l'intérieur d'une membrane péritrophique. La transformation des amastigotes en promastigotes procycliques s'y produit sur une durée de 12 h à 18 h. Cette forme plutôt ovoïde et légèrement mobile se reproduit cependant à une vitesse fulgurante dans les heures qui s'ensuivent, de 18 h à 24 h. Pendant 36 h à 60 h, la multiplication rapide au sein du repas de sang en digestion se poursuit et une seconde différenciation survient, de la forme promastigote procyclique à nectomonade. Cette forme est plus mince, longue et plus mobile que sa prédécesseuse. Après 60 h à 72 h, localisés à la partie antérieure de l'intestin, les nectomonades sont présents en très grand nombre et sont pour la plupart attachés aux microvillosités par l'entremise de leur flagelle. Après une semaine, la digestion du repas de sang est terminée et les parasites migrent vers la région du cardia et de la valve stomodéale et s'y accumulent. Cet événement est synchronisé avec la transformation des nectomonades en promastigotes métacycliques ne se divisant plus. Ils sont de forme courte, mince et sont extrêmement actifs avec un flagelle environ deux fois plus long que le corps cellulaire. Les métacycliques migrent ensuite au-delà de la valve pour attendre l'œsophage, le pharynx et la trompe. Les parasites y produisent un protéophosphoglycan (PPG) qui, tel un gel, crée un bouchon bloquant le tractus. Afin de pouvoir ingurgiter le prochain repas de sang, ce gel devra être expulsé, entraînant par le fait même les parasites vers leur prochain hôte (Bates 2007) et stimulant l'inflammation menant au recrutement de macrophages au site de l'infection (Podinovskaia and Descoteaux 2015).

Leishmania infantum

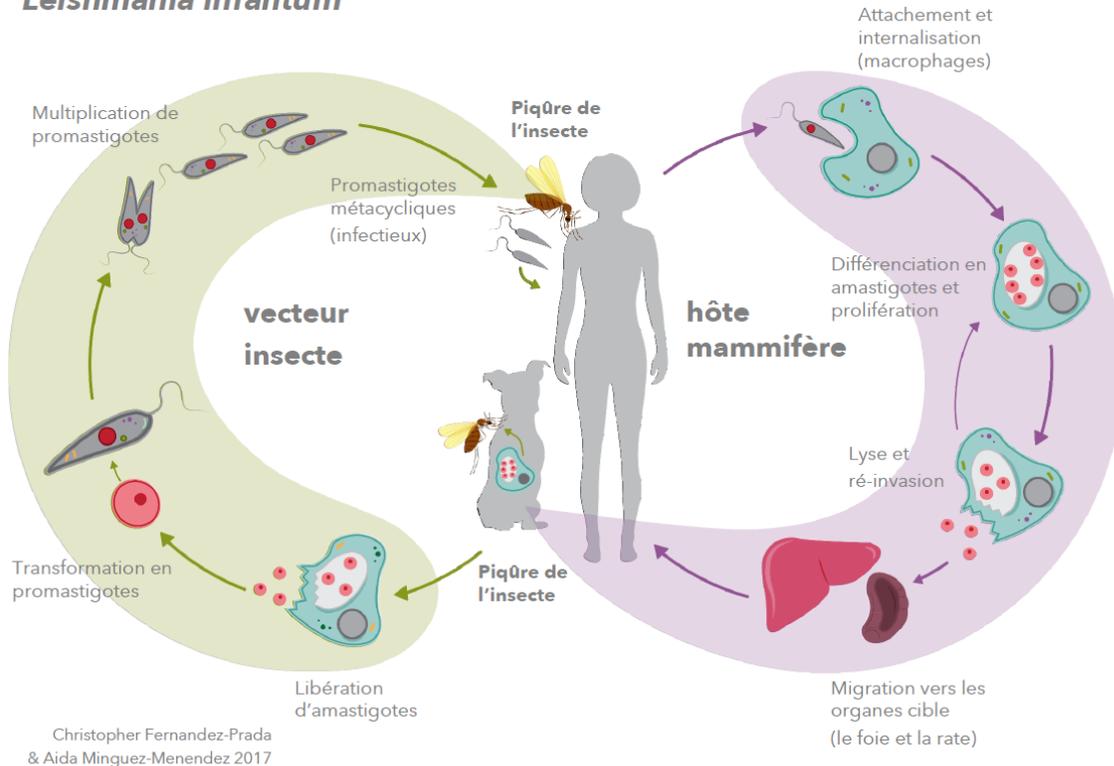


Figure 3: Cycle de vie de Leishmania

(Provenant du cours de Pr. Fernandez-Prada, 2017, avec son aimable autorisation)

Le cycle se transporte alors chez l'hôte mammifère. Les promastigotes métacycliques infectieux inoculés se retrouvent alors dans la circulation sanguine. Ils sont à ce moment-là en contact avec les facteurs du complément et seront opsonisés. Ceci favorisera l'attachement au macrophage par l'entremise du récepteur 3 du complément (Russell and Wright 1988; Guy and Belosevic 1993; Mosser and Edelson 1985) mais également par les récepteurs du fragment Fc des immunoglobulines (Kima et al. 2000). Une fois internalisés, les parasites passent à travers 4 stades majeurs de différenciation dans le phagosome (Rosenzweig et al. 2008). De 0 à 4 h, les promastigotes reçoivent et traitent les signaux de différenciation, déclenchés par la baisse de pH, la hausse de température et l'augmentation de l'absorption des ions Fe^{2+} (Podinovskaia and Descoteaux 2015). Ensuite de 5 h à 9 h, ils forment un agrégat et arrêtent leur mouvement. De 10 h à 24 h après l'internalisation, les promastigotes prennent la forme caractéristique des amastigotes, mais c'est seulement entre 25 h à 120 h que la maturation en amastigote est complétée. Les amastigotes résistent et se multiplient dans une vacuole parasitophore présentant les mêmes caractéristiques hostiles qu'un phagolysosome, soit un pH acide d'environ 5,5. La

multiplication des amastigotes à l'intérieur de la cellule finira par la faire éclater, libérant par le fait même les parasites qui sont maintenant disponibles pour infecter les cellules avoisinantes. Après cette étape, selon la souche de *Leishmania* contractée, le cycle peut être légèrement différent. Si la souche cause la forme cutanée, les parasites resteront plus ou moins au site de l'inoculation primaire, ou dans le cas de la forme muco-cutanée, migrera légèrement aux muqueuses avoisinantes. Lors d'une infection par une souche causant la forme viscérale de la maladie, l'infection ne reste pas locale mais devient systémique. Les parasites migrent donc aux organes péritonéaux, infectant principalement le foie et la rate (Figure 3). Le cycle se complètera et se continuera lorsqu'une nouvelle mouche de sable prendra un repas de sang de ce mammifère infecté.

1.4 Facteurs de virulence

Tout au long du cycle de vie, les parasites *Leishmania* exprimeront différents facteurs de virulence à leur surface à niveau variable selon leur forme. Ceux-ci sont vitaux pour leur survie, servant à échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Les parasites réussissent donc à éviter les dommages oxydatifs, les facteurs d'inflammation et la reconnaissance immunitaire.

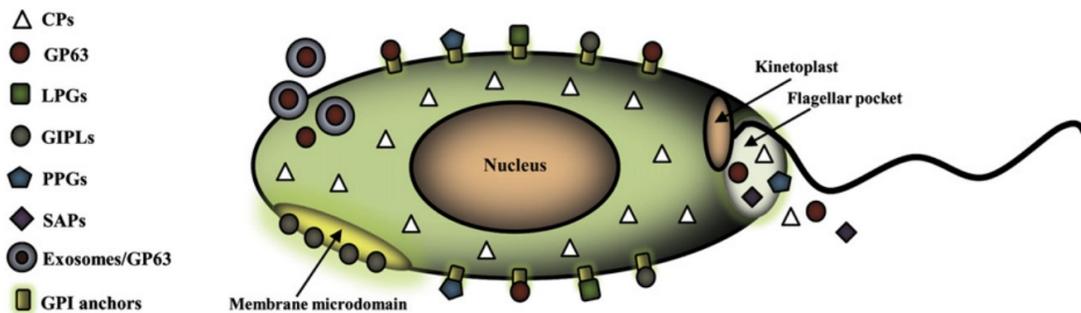


Figure 4: Facteurs de virulence de *Leishmania* (Olivier et al. 2012)

Le lipophosphoglycan (LPG) présent à la surface de *Leishmania* (Figure 4) empêche entre autre l'assemblage du complexe NOX2 permettant l'acidification du phagosome en perturbant les radeaux lipidiques (Podinovskaia and Descoteaux 2015). Ce facteur de virulence est l'un des mieux connus dans la littérature. Aussi, les protéophosphoglycans (PPGs) font partie d'un autre groupe de glycoconjugués permettant la formation du bouchon dans la mouche de sable et favorise par le fait même le recrutement des macrophages au site de l'infection(Olivier et al. 2012;

Rogers et al. 2004). D'autres molécules, moins étudiées, sont aussi présentes à la surface ou sécrétées par les promastigotes (telles que les glycosylinositolphospholipides (GIPLs), protéases cystéine (CPs), phosphatases acides sécrétées (SAPs) et d'autres) et sont également impliquées dans la modulation des facteurs anti-microbiens du macrophage (Olivier et al. 2012). Les CPBs (cysteine protease B) sont quant à elles importantes pour la régulation de l'expression de la Glycoprotéine 63 (GP63) (Casgrain et al. 2016), un autre facteur de virulence très étudié et qui est le focus de la prochaine section.

1.5 GP63

L'un des plus abondants facteurs de virulence du parasite sous sa forme promastigote est la métalloprotéase GlycoProtéine 63 (GP63). Nommée ainsi à cause de son poids moléculaire de 63 kDa, elle a aussi eu plusieurs autres noms tel que leishmanolysine, à cause de ses capacités à cliver des substrats tels que la gélatine, l'albumine, l'hémoglobine et le fibrinogène (Yao, Donelson, and Wilson 2003). Son site actif contient une séquence de liaison (HExxHxxGxxH) capable de lier un ion de Zinc²⁺ qui servira de nucléophile lors de réaction de protéolyse. Ce motif est essentiel à la liaison de l'ion et le retrait d'un de ces résidus histidines mène à la dégradation de GP63 (McGwire and Chang 1996). Les trois résidus histidines séparés ainsi stabilisent l'énergie servant à coordonner l'ion de zinc et sont impliqués dans la maturation vers la conformation active (Vallee and Auld 1990).

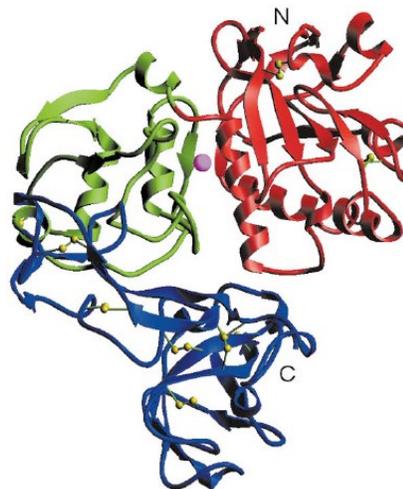


Figure 5 : Cristal de GP63

Domaine N-terminal en rouge, le domaine central en vert et le domaine C-terminal en bleu. L'ion de zinc est représenté par la sphère rose. Les ponts disulfures sont en jaune. (Schlagenhauf, Etges, and Metcalf 1998)

Le domaine C-terminal (Figure 5) contient un site de jonction pour l'ancrage d'une molécule de glycoposphatidyinositol (GPI). En effet, GP63 est présente sous trois formes : ancrée à la membrane cellulaire par une ancre de glycoposphatidyinositol (GPI), sécrétée sous forme soluble par la pochette flagellaire et sécrétée dans des exosomes (Silverman et al. 2010) (Figure 4, (Olivier et al. 2012)). Il a également été démontré que la glycosylation de GP63 non-ancrée par GPI est nécessaire pour la sécrétion de la protéase (Ellis et al. 2002).

Le degré d'expression de GP63 change beaucoup selon la forme du parasite (Figure 6). En effet, il est possible de voir que l'expression de GP63 chez *L. major* est fortement diminuée lorsque le parasite est sous forme amastigote comparativement à la forme promastigote nectomonade ou métacyclique (Inbar et al. 2017).

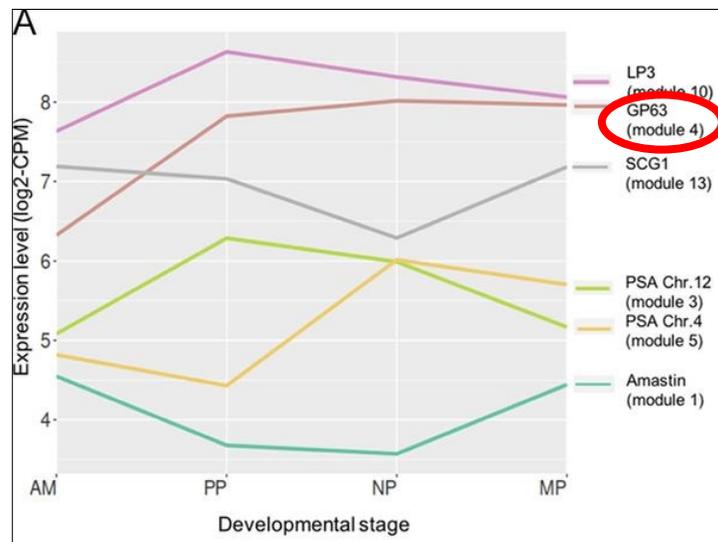


Figure 6 : Expression de molécules de surface de *Leishmania major*

Selon le stade de développement du parasite, où GP63 est mise en évidence. AM : amastigotes, PP : promastigotes procycliques, NP : promastigotes nectomonades, MP : promastigotes métacycliques. Adapté de Inbar et al. (2017)

En effet, GP63 est importante pour l'initiation de l'infection chez l'hôte mammifère. Avant même d'être phagocyté, le parasite, par l'entremise de GP63, est impliqué dans le clivage du composant du complément C3b en iC3b (Russell and Wright 1988; Mosser and Edelson 1985; Brittingham et al. 1995). En effet, le clivage de cette molécule facilite la phagocytose par l'intermédiaire du récepteur du complément de type 3 (CR3) et échappe à la lyse médiée par le complément. GP63 est même connue pour se disséminer dans la cellule infectée et pas seulement être localisée à la vacuole parasitophore (Figure 7)(Matte and Descoteaux 2016). En effet, GP63 est métabolisée via le RE et 1,5% y est d'ailleurs retrouvé (Ellis et al. 2002; Yao et al. 2002; McGwire et al. 2002; Isnard, Shio, and Olivier 2012). Le reste est localisé à la surface du parasite (75%) ou sécrété.

GP63 sous sa forme sécrétée peut varier grandement en poids moléculaire. Ceci varie en fonction de l'état de glycosylation (important pour la sécrétion) mais aussi de la présence de l'ancre GPI (Ellis et al. 2002). La libération de GP63 de son ancrage GPI est indépendante de la glycosylation, mais dépend de l'auto-protéolyse. Si un chélateur de zinc, la 1,10-Phénanthroline, est ajouté ou une mutation du motif de liaison au zinc est présente, le niveau de sécrétion de GP63 se trouve complètement diminué (McGwire et al. 2002; Isnard, Shio, and Olivier 2012). L'exact mécanisme pour disséminer GP63 n'a pas été confirmé, mais plusieurs hypothèses ont été émises. L'une d'elles est que GP63 pourrait être relâchée par l'entremise de fusions entre les exosomes et les cellules hôtes. Les exosomes peuvent également, à l'intérieur des cellules, se fusionner avec les endosomes et passer à travers le trafic trans Golgi/ER de façon rétrograde (Gomez and Olivier 2010). Aussi, GPI-GP63 pourrait être transloqué par des transporteurs protéiques, des radeaux lipidiques ou par renversement des protéines (Descoteaux, Moradin, and Arango Duque 2013; Ghosh et al. 2013). GP63 pourrait donc rejoindre des substrats potentiels à l'extérieur de la vacuole parasitophore.

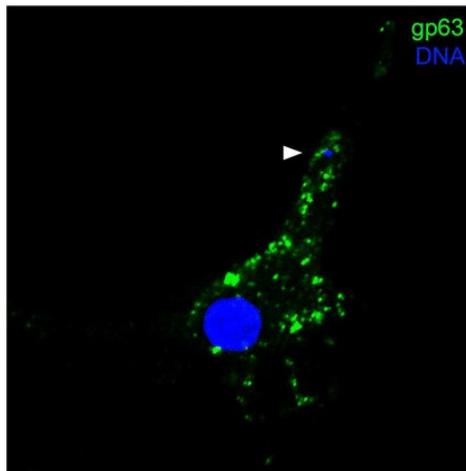


Figure 7: Dissémination de GP63 dans une cellule infectée
(Matte and Descoteaux 2016)

En effet, la voie de signalisation impliquant les protéines MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate) ainsi que les protéines associées à MARCKS (MRP) sont ciblées par *Leishmania* de façon précoce, et ont été montrées comme étant des cibles de GP63 (Corradin, Mauel, et al. 1999; Corradin, Ransijn, et al. 1999). Les macrophages infectés par *L. major* présentaient une réduction significative des MRP, celles-ci étant un substrat majeur pour la protéine kinase c (PKC). Cette kinase est entre autres impliquée dans la signalisation menant à la production de ROS (reactive oxygen species), une molécule importante dans la réponse immunitaire innée (Corradin, Ransijn, et al. 1999). Étant l'une des premières études démontrant

un phénotype GP63-dépendant, l'étude subséquente de nouvelles cibles de la métalloprotéase nécessitait un outil supplémentaire, soit la disponibilité d'un knock-out de GP63, afin de confirmer la dépendance des clivages.

1.6 Parasites mutants pour GP63

Des mutants de *L. major* déficients pour GP63 ont été largement utilisés pour identifier les substrats de GP63 (Tableau 1). En effet, *L. major* a été sélectionné pour la création de ces mutants parmi d'autres espèces de *Leishmania* pour la faisabilité des expériences. Les gènes de GP63 de *L. major* étaient connus pour être constitués de 7 homologues disposés en tandem sur un seul chromosome, le chromosome 10 (Button et al. 1989). Les autres espèces de *Leishmania* présentent quant à elles des gènes de GP63 différemment arrangés sur plusieurs chromosomes et souvent en très grand nombre. En effet, *L. braziliensis* par exemple, peut posséder jusqu'à 39 gènes *GP63* répartis sur 2 chromosomes dépendamment de la souche (Castro Neto et al. 2019). *L. guyanensis* possède au moins 22 gènes *GP63* (Yao, Donelson, and Wilson 2003; Steinkraus et al. 1993). *L. mexicana* et *L. donovani* ont dix gènes *GP63*, mais dans leur cas, ils sont répartis sur plusieurs chromosomes différents (Medina-Acosta, Beverley, and Russell 1993; Yao, Donelson, and Wilson 2003; Webb, Button, and McMaster 1991). Générer un mutant de GP63 avec ces espèces aurait donc été beaucoup plus fastidieux qu'avec *L. major*, ayant l'arrangement de gène de GP63 le plus simple connu (Yao, Donelson, and Wilson 2003). L'expression des gènes *GP63* chez *L. major* est déterminée par le stade du cycle de vie du parasite (Joshi et al. 2002). Les gènes 1 à 5 sont fortement exprimés chez les promastigotes en général. Le numéro 6 est exprimé à de faibles niveaux autant chez les promastigotes et les amastigotes. Finalement, le gène 7 est exprimé uniquement chez les promastigotes métacycliques et les amastigotes (Voth et al. 1998; Joshi et al. 2002). Chaque gène mesure environ 1,3 kilobases de long dans la séquence codante, avec des régions intergéniques de 1,8 kilobases entre les gènes 1 à 5 et les gènes 6 et 7. Afin de faciliter l'étude de ce facteur de virulence et confirmer la dépendance à GP63 de ces clivages (Tableau 1), l'équipe de Robert McMaster a développé des mutants de *L. major* (Joshi et al. 1995; Joshi et al. 1998; Joshi et al. 2002). Ils ont tout d'abord créé le mutant *L. major* $\Delta gp63$. La région complète de 20 kilobases contenant les gènes *GP63* a donc été retirée à l'aide de deux rondes de sélection par résistance aux antibiotiques, soit l'hygromycine B (*HYG*) et la nourseathricine (*SAT*)(Figure 8).

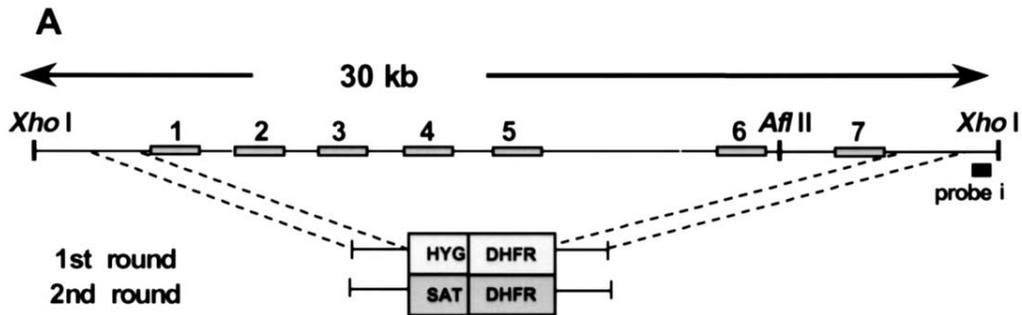


Figure 8 : Gènes de GP63 retirés du génome de *L. major* par sélection à l'aide de gènes de résistance à des antibiotiques. (Joshi et al. 2002)

Avec la souche mutante knock-out pour *GP63* créée, l'expression et l'activité de la métalloprotéase ont été rétablies à l'aide du plasmide pLEXNEO-*GP63* gene 1 (Figure 9). Ce plasmide arbore un gène de résistance pour l'Hygromycine B et également le gène numéro 1 de *GP63*. Leur analyse en cytométrie en flux leur a permis de confirmer que l'expression de *GP63* en surface du parasite rescapé était comparable à l'expression de *GP63* de la souche sauvage.

Ils ont observé que *GP63* était importante pour le parasite afin de résister à la lyse par le complément. Les parasites $\Delta gp63$ ont atteint 100 % de lyse à 2 % de sérum humain, tandis que les parasites de type sauvage ont atteint 100 % de lyse à 11 % de sérum humain (Joshi et al. 2002). La résistance à la lyse a été significativement améliorée chez les parasites $\Delta gp63+GP63$. Également, ils ont observé que le développement des lésions cutanées chez les souris infectées est présent peu importe la souche utilisée. Par contre, l'infection avec les parasites $\Delta gp63$ a montré un délai supplémentaire significatif dans le développement des lésions. En effet, afin que les lésions atteignent 3 mm, il y avait un délai de 3,5 à 4 semaines par rapport à la souche sauvage. La rapidité du développement de la lésion a été amélioré suite à la réintroduction d'un gène. Une fois la maladie établie, les taux de progression des lésions pour les trois souches étaient similaires (Joshi et al. 2002).

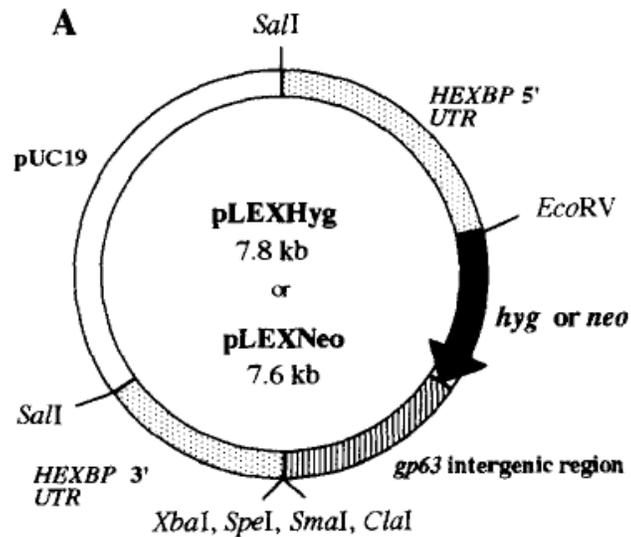


Figure 9 : Plasmide (procurant une résistance à la néomycine) présent dans la souche *L. major* Δ gp63+GP63
(Joshi et al. 1995; Joshi et al. 2002)

1.7 Substrats connus de GP63

Lors de recherches subséquentes, GP63 a été tenue responsable de clivages de bien d'autres molécules (Tableau 1), permettant l'établissement de l'infection et la réplication du parasite à l'intérieur du macrophage. Ultimement, grâce ces clivages, GP63 facilite la liaison du parasite, favorise la survie dans le phagosome, permet la migration du parasite à travers la matrice extracellulaire et module stratégiquement les voies de signalisation cellulaires.

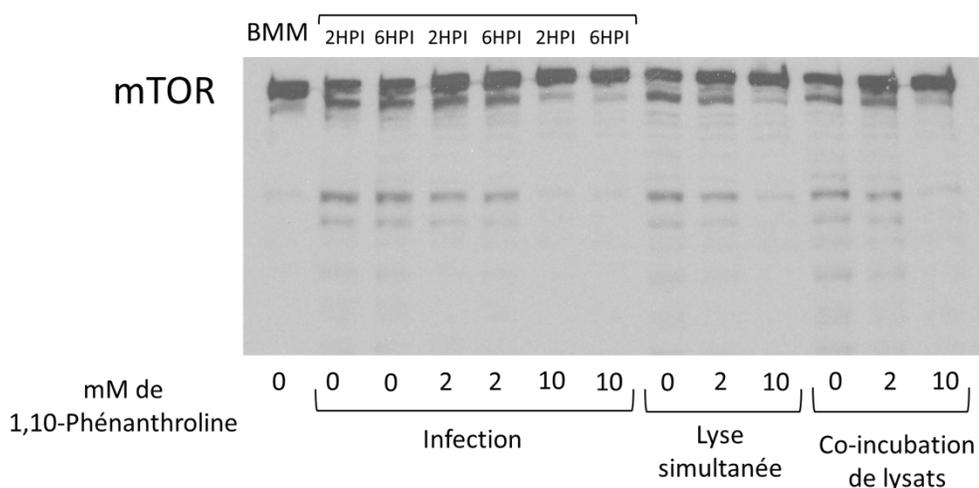
Tableau 1 : Substrats connus de GP63 dans la littérature (Liste non exhaustive)

Processus cellulaire	Substrats précédemment identifiés	Protéolyse rapportée	Références
Protéines Tyrosine phosphatases	p130cas	Clivage	Hallé and al. 2009
	PTP-PEST	Dégradation	Hallé and al. 2009
	SHP-1	Clivage	Gomez and al. 2009
	PTP1B	Clivage	Gomez and al. 2009
	TC-PTP	Clivage	Gomez and al. 2009, Hallé and al. 2009
Facteurs de transcription	p65relA (NF-kB)	Clivage	Gregory and al. 2008
	C-JUN	Clivage	Contreras and al. 2010
	C-fos	Dégradation	Contreras and al. 2010
	Jun B	Clivage	Contreras and al. 2010
	Fra 1	Clivage	Contreras and al. 2010
	Fra 2	Clivage	Contreras and al. 2010
Signalisation intracellulaire	mTor	Clivage	Jaramillo and al. 2011
	NLRP3	Clivage	Shio and al. 2015
	TXNIP	Clivage	Shio and al. 2015
	Pro-IL-1 β	Clivage	Shio and al. 2015
	Cortactin	Dégradation	Hallé and al. 2009
	Caspase-3	Clivage	Hallé and al. 2009
	TAB1	Clivage	Hallé and al. 2009
	MRP	Clivage	Corradin and al. 1999
Transport vésiculaire	Synaptotagmin XI	Clivage	Arango Duque and al. 2014
	Syntaxin 5	Clivage	da Silva Vieira and al. 2019
	VAMP3	Clivage	Matheoud and al. 2013
	VAMP8	Clivage	Matheoud and al. 2013, Matte and al. 2016, da Silva Vieira and al. 2019

En effectuant des Western blot pour l'étude des cibles de GP63 au laboratoire Descoteaux, des résultats inattendus se sont présentés. En effet, il y avait un clivage de presque toutes les protéines, incluant la protéine utilisée normalement à l'époque comme contrôle de charge. La question suivante s'est donc posée : GP63 est-elle vraiment inhibée suite à la lyse cellulaire ?

Pour répondre à cette question, davantage de tests ont été effectués. Une infection de BMMs avec des parasites *L. major* $\Delta gp63+GP63$ a tout d'abord été faite. Les cellules infectées ont été lysées et récoltées à 2 h et 6 h post-infection. Des cellules non-infectées et des parasites ont également été incubés ensemble et immédiatement lysés, ce qui est appelé à la Figure 1, la lyse simultanée. Finalement, des parasites et des cellules non-infectées ont été lysés séparément et ensuite co-incubés. Un chélateur d'ion de zinc à différentes concentrations, la 1,10-Phénanthroline, a été ajouté ou non au tampon de lyse à des fins de comparaison pour voir si un changement serait apparent. L'action de cet inhibiteur est détaillée à la prochaine section.

En effet, il est possible de voir que même les échantillons provenant des lysats co-incubés montrent du clivage pour mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin), ce qui ne devrait pas être observé si GP63 était inactivée lors de la lyse. De plus, sans 1,10-Phénanthroline, il est possible de voir du clivage dans tous les échantillons. Cependant, lorsque 10 mM 1,10-Phénanthroline est ajouté au tampon de lyse, la bande de clivage n'est plus observable et le profil protéique est identique à l'échantillon provenant du contrôle non-infecté. Bien qu'ayant légèrement diminué le niveau de clivage, 2 mM 1,10-Phénanthroline n'était pas suffisant pour inhiber complètement la métalloprotéase.



59

Figure 10 : mTOR lors d'infection par *L. major* $\Delta gp63+GP63$, lors d'une lyse simultanée des parasites avec les cellules et lors d'une co-incubation de lysats.

Un chélateur de zinc, la 1,10-Phénanthroline, a été testé comme inhibiteur de la métalloprotéase (Matte et Descoteaux, non-publié)

1.8 1,10-Phénanthroline

La 1,10-Phénanthroline est un composé organique formé de trois cycles aromatiques ayant la conformation d'un phénanthrène (Merck 1989) de formule chimique C₁₂H₈N₂. Le benzène du centre offre une stabilité à la molécule, permettant de rester plane, les atomes N toujours alignés (Sammes and Yahioğlu 1994). D'ailleurs, contenant chacun un atome d'azote, les deux cycles opposés sont ceux formant rapidement de forts complexes avec des ions métalliques tels que le fer ferreux (Fe²⁺), le Zn²⁺ (Figure 11), le Cu²⁺, le Mg²⁺ et d'autres cations (Brandt, Dwyer, and Gyrfas 1954).

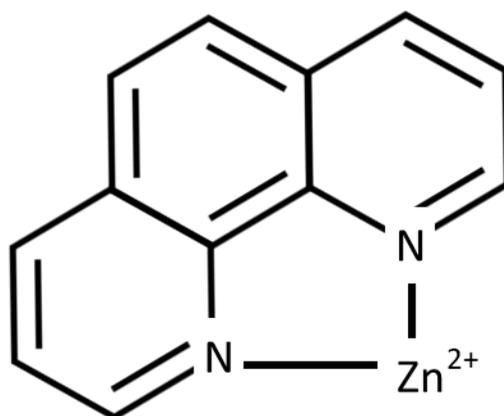


Figure 11 : 1,10-Phénanthroline liant un ion de Zn^{2+}

Redessinée à partir de : [Zinc phenanthroline complex supplier | CasNO.16561-55-0 \(lookchem.com\)](#)

Cette liaison est communément appelée chélation. La forte affinité des cations métalliques avec ce ligand rend ces cations indisponibles dans le milieu et est même arraché aux sites actifs de certaines enzymes (Sammes and Yahioğlu 1994; de Jesus et al. 2019; Felber, Coombs, and Vallee 1962). La 1,10-Phénanthroline a d'ailleurs été utilisée dans le passé comme inhibiteur de d'autres métalloprotéases avec succès afin d'éviter des clivages artéfactuels *in vitro*. La première publication à ce sujet était à propos du travail de Felber, Coombs, and Vallee (1962), montrant l'inhibition de la carboxypeptidase A par la 1,10-Phénanthroline. Plus récemment, de Jesus et al. (2019) ont utilisé la 1,10-Phénanthroline afin d'inhiber la co-chaperone liant le zinc Ydj1. Pour GP63, il a été montré que, parmi d'autres chélateur, la 1,10-Phénanthroline était la plus efficace pour chélater le Zn^{2+} s'y liant. En effet, Chaudhuri et al. (1989) a montré que l'activité de GP63 était à 0,9% lors de l'addition de la 1,10-Phénanthroline. Le plus proche compétiteur était le 2,2'-Bipyridyl, qui permettait une activité de GP63 de 2.8%. L'EDTA et l'EGTA, d'autre chélateur de cations divalents, étaient nettement moins performants, laissant une activité de 6,4% et 8,7% respectivement. L'activité de GP63 peut être rétablie simplement en ajoutant du Zn^{2+} dans le milieu, ce qui veut dire que l'inhibition est réversible (Chaudhuri et al. 1989). Par la suite, plusieurs études ont utilisés la 1,10-Phénanthroline afin d'inhiber GP63 dans différents contextes, dont l'étude de sa sécrétion dépendante de l'auto-protéolyse (McGwire et al. 2002).

2 Hypothèse et objectifs de recherche

Les résultats présentés à la Figure 10 ont mené à des questionnements sérieux. Si le clivage de mTOR est en fait un artéfact, les autres substrats identifiés précédemment le seraient-ils également ? Qu'en est-il des déductions et conclusions qui ont été faites entourant ces clivages ? Les rôles de GP63 lors de l'infection sont-ils bel et bien ceux que l'on croyait avoir découverts ?

Par Western blot, si GP63 n'est pas inhibée lors l'extraction de protéine, il est impossible de savoir si un clivage observé est dû au fait que GP63 était réellement en contact avec le substrat potentiel dans une cellule infectée intacte. En effet, les barrières cellulaires rompues permettent à GP63 d'avoir accès à toutes les protéines cellulaires sans restriction.

L'hypothèse de recherche suivante a donc été émise :

L'absence d'un inhibiteur de métalloprotéase a mené à l'identification de substrats artéfactuels de GP63.

Afin de répondre à cette hypothèse, ce projet de recherche a été divisé en deux objectifs principaux :

1. Identifier les véritables substrats de GP63, en déterminant si ceux précédemment identifiés sont affectés de la même manière lorsqu'un inhibiteur de métalloprotéase (1,10-Phénantroline) est ajouté lors de la lyse des cellules infectées.
2. Confirmer que ces clivages sont spécifiques à GP63 en utilisant, en plus des souches sauvages, des souches mutantes $\Delta gp63$ et $\Delta gp63+GP63$.

En résumé, ce qui a été précédemment publié doit être réévalué.

3 Matériels et Méthodes

3.1 Déclaration d'éthique

Le travail effectué à l'aide de souris a été fait conformément au protocole 1706-06, qui a été approuvé par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux de l'INRS-Centre Armand-Frappier Santé et Biotechnologie. Ce protocole respecte les procédures sur la pratique animale promulguées par le Conseil canadien de protection des animaux, décrites dans le Guide sur le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire.

3.2 Culture de macrophages dérivés de la moelle osseuse murine

Des macrophages dérivés de moelle osseuse (BMDM) ont été différenciées à partir de cellules souches provenant de la moelle osseuse de souris femelles 129 BL/6 âgées d'environ 8 à 12 semaines. Les souris sont euthanasiées par asphyxie au CO₂ suivi d'une dislocation cervicale. Les os des pattes arrière (fémur et tibia) sont récoltés, transférés dans un tube où ils seront submergés par du HBSS et conservés sur glace. La moelle osseuse est alors recueillie en rinçant l'intérieur des os en injectant, à l'aide d'une aiguille et d'une seringue, du HBSS. Les cellules de la moelle sont ensuite récoltées par centrifugation. Les érythrocytes sont subséquemment détruits à l'aide de NH₄Cl. Les cellules restantes sont donc suspendues dans un milieu DMEM et inoculées dans un pétri qui adhèrera les cellules matures, laissant en suspensions les cellules naïves pouvant être différenciées. Un pétri doit être utilisé par tranche de deux souris utilisées pour la collecte de moelle. Le DMEM doit aussi contenir 15% de LCM, permettant la différenciation en macrophage. Les cellules sont incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂.

La différenciation des cellules naïves en macrophage se fait sur 8 jours (le premier étant celui de la récolte de la moelle). La journée suivante (le jour 2), le surnageant contenant les cellules naïves est récolté et divisé équitablement dans des pétris non-adhérents. Le nombre de pétri dépendra du nombre de souris dont la moelle provient. La règle est : nombre de pétri = (nombre de souris x 2) + 1. Par exemple, si la moelle collectée provient d'une seule souris, trois pétris seront utilisés. L'équivalent de 15% de LCM est également ajouté au milieu. Au jour 3, 15% de LCM est à nouveau ajouté. Finalement, au jour 5 et 7, 15% de LCM est ajouté à nouveau. Au jour 8, les cellules adhérentes sont des macrophages matures. Ceux-ci sont récoltés à l'aide d'un grattoir en silicone, suspendus dans du HBSS et collectés par centrifugation. Ensuite, les cellules sont re-suspendues avec du DMEM, cette fois sans LCM puisque les cellules doivent être quiescentes. Les cellules sont comptées, et le nombre désiré de cellules est inoculé dans des puits de plaques

multi-puits. Le nombre de puits et de cellules est variable selon les besoins de l'expérience. Pour une infection qui devra ultimement être une lyse cellulaire afin de récolter les protéines, une plaque de 6 puits à raison de 2,2 millions de cellules par puit sera utilisée. Si le but de la manipulation est de faire un marquage par immunofluorescence, une plaque de 24 puits sera utilisée et 270 000 cellules y seront déposées. Chaque puit contiendra une lamelle circulaire où les cellules seront adhérentes. Les cellules seront remises en incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂ jusqu'au lendemain. C'est au jour 9 qu'il sera possible de procéder au traitement ou à l'infection par les parasites.

3.3 Culture des parasites

Les promastigotes de *L. major* Seidman (MHOM/SN/74/Seidman) NIH clone A2 (type sauvage, $\Delta gp63$ et $\Delta gp63+GP63$), *L. donovani* LV9 (MHOM/ET/67/Hu3:LV9), *L. mexicana* (MNYC/BZ/62/M379) et *L. brasiliensis* M15991 (MHOM/BR/1996/M15991) (da Silva Vieira et al. 2019) sont cultivés dans un milieu M199-1X (Sigma) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé par la chaleur, 40 mM d'HEPES à pH 7,4, 100 M d'hypoxanthine, 5 M d'hémine, 3 M de biotéine, 1 M de biotine et de pénicilline/streptomycine. Ils sont conservés dans un incubateur à 26°C. Des promastigotes fraîchement différenciés en phase stationnaire tardive sont utilisés pour les infections. Pour les obtenir, ceux-ci doivent être environ 5 jours en culture et avoir une confluence de plus de 50×10^6 promastigotes/ml. Les parasites sont conservés jusqu'à maximum 5 à 6 passages afin de ne pas perdre leur virulence.

3.4 Infection de macrophages dérivés de la moelle osseuse murine par *Leishmania*

1- Isolation de parasites promastigotes métacycliques

Les parasites sont récoltés dans un tube, centrifugés à 2000 g pour 7min, et lavés deux fois avec du PBS. Pendant ce temps, un gradient de Ficoll est préparé (Figure 12). 1,5mL de Ficoll 40% est déposé au fond d'un tube de 15mL. Au-dessus, du Ficoll 10% est déposé très délicatement pour éviter de mélanger les deux phases. Finalement, les parasites sont suspendus dans du DMEM ne contenant pas de sérum de veau fœtal et est déposé au-dessus du gradient. Le tout est centrifugé à 600-675 g pendant 10 minutes. L'interphase, contenant les parasites métacycliques, est récupérée. Les parasites sont ensuite lavés avec du PBS 1x deux fois en centrifugeant 7 minutes à 2000 g.

2- Opsonisation

Les parasites sont ensuite opsonisés 30 minutes à 37°C à l'aide de sérum de souris. Une concentration de 10% est utilisée, diluée avec du HBSS. Ils sont suspendus à un ratio de 1uL de solution utilisée par million de parasites. Par exemple, 200 µL (20uL de serum + 180uL HBSS) sera utilisé pour opsoniser 200 millions de parasites. Dès l'incubation terminée, du HBSS est ajouté au sérum 10% et le tout est centrifugé 7 minutes à 2000 g. Les parasites seront finalement lavés deux fois avec du PBS 1x et re-suspendus dans 1mL de DMEM complet (incluant SVF).

3- Infection

Les parasites fraîchement lavés sont comptés à l'aide d'un hémacytomètre et de dilutions en série. Selon le nombre de parasites par cellule désiré pour l'infection (5:1, 7:1, 10:1), du DMEM complet contenant le nombre de parasites désiré sera préparé. Le volume final doit être suffisant pour l'incubation des cellules dans la plaque multi-puits (2ml pour un puit d'une plaque 6 puits, 0.5mL pour un puit d'une plaque de 24).

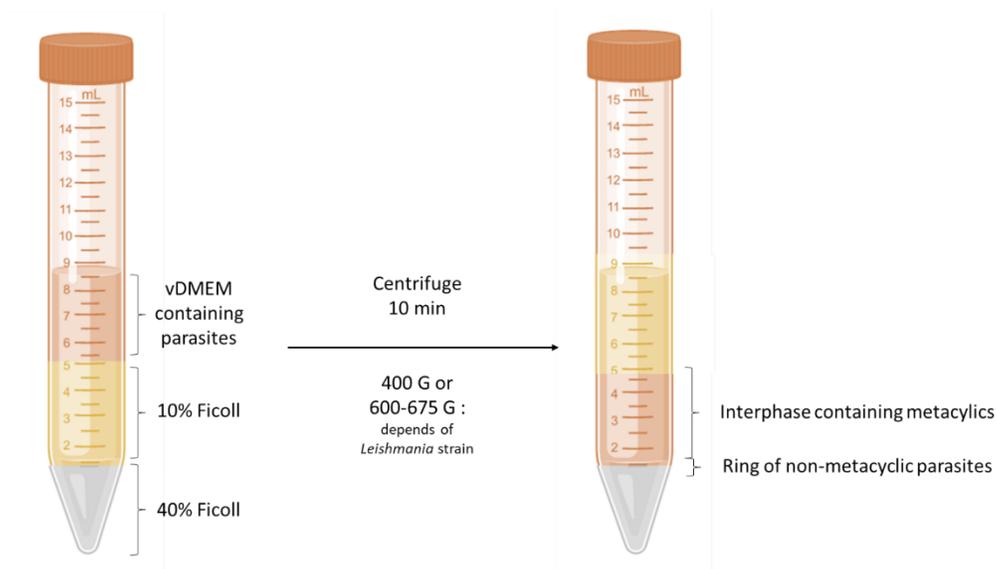


Figure 12: Isolation de parasites métacycliques à l'aide d'un gradient de Ficoll

Ayant adhéré les cellules dans les plaques multi-puits appropriées la veille, les cellules seront lavées avec du HBSS une fois, puis recouvertes du DMEM contenant le nombre de parasites désiré. Pour optimiser le contact entre les cellules et les parasites, la plaque est centrifugée pour 2 minutes à 300 g. Le tout est ensuite incubé selon le temps post-infection requis. Après 3 à 4h d'incubation, les parasites non-intériorisés sont lavés avec du HBSS et du milieu DMEM complet frais est ajouté de nouveau pour la suite de l'incubation.

3.5 Lyse cellulaire

Les cellules sont lavées avec du PBS froid contenant 1 mM de Na_3VO_4 (Sigma), avec ou sans 10 mM de 1,10-phénanthroline (Sigma). Les cellules sont ensuite lysées dans 100 μL d'une solution composée de : 1% de NP-40, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH8), 1,5 mM EGTA, 1 mM Na_3VO_4 , 50 mM NaF, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 10 mM de 1,10-Phénanthroline (Sigma) et un mélange d'inhibiteurs de protéases (Roche). Un racleur en silicone est ensuite utilisé pour aider à déloger les cellules adhérentes. Le lysat est récolté dans un microtube et est incubé sur glace 10-15 minutes. Les lysats sont ensuite conservés à -70°C .

3.6 Quantification de protéines

Après incubation à -70°C , les lysats sont dégelés et centrifugés à 12000 g pendant 15 min pour éliminer les matières insolubles. Le surnageant est transféré dans de nouveaux microtubes. La quantification des protéines est faite à l'aide de l'ensemble de réactifs *Pierce® BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, #23227) selon le protocole fourni par le fabricant. Après quantification des protéines, les échantillons sont préparés dans un tampon Laemmli 1x à concentration désiré, soit 1 μg de protéine par μL . Juste avant d'être déposé dans un gel, les échantillons sont bouillis (100°C) pendant 5 minutes. Pour préparer 10 mL de tampon Laemmli 6x, nous utilisons 7mL de 4x TRIS-HCl/SDS, pH 6.8 (0.5M de tris bas, 0.4% de SDS), 17 mg de bleu de bromophénol, 3mL de glycérol, 0.93g de DTT et 1 g de SDS. Le tout est aliquoté et gardé à -20°C .

3.7 Électrophorèse SDS-PAGE et Immunobuvardage de type Western

Les échantillons de protéines préparés précédemment sont migrés à travers des gels SDS-PAGE. La concentration de bis-acrylamide utilisée pour le gel sera différente selon les protéines étudiées (de 6% à 20%). Une fois l'électrophorèse terminée, les protéines sont transférées sur membranes HybondECL (Amersham Biosciences, 10600003). Les membranes sont ensuite bloquées pendant au moins 1 heure avec du TBS 1X - 0,1% Tween-20 contenant 5% BSA. Les

membranes sont ensuite incubées avec des anticorps primaires (Tableau 2)(dilués dans la solution de TBS 1X-0,1% Tween-20 contenant 5% BSA) pendant une nuit à 4°C ou au moins 4 heures à température pièce. Trois lavages sont par la suite effectués avec du TBS 1x 0.1% - Tween-20. Finalement, les membranes sont incubées avec des anticorps secondaires appropriés (selon l'hôte de l'anticorps primaire utilisé) conjugués à la peroxydase de raifort (Sigma) pendant 1 heure à température ambiante. L'anticorps secondaire est dilué dans du TBS 1X-0,1% Tween-20 contenant 5% BSA de nouveau. Les membranes sont finalement lavées quatre fois avec du TBS 1x – 0.01% Tween-20. Les membranes lavées sont incubées dans du ECL (GE Healthcare, RPN2106). La révélation des bandes a été réalisée par chimiluminescence.

3.8 Immunofluorescence et microscopie

Les cellules sur lamelles ont été fixées avec du paraformaldéhyde à 3.8 % (Thermo Scientific, 28906) pendant 30 min à 37°C. Du NH₄Cl est ensuite utilisé pour éliminer les radicaux libres dans les cellules pendant 10 min. Les cellules sont ensuite perméabilisées pendant 5 min avec une solution de 0,5 % de Triton X-100. Elles sont par la suite bloquées 1 h à 37°C avec du PBS contenant 5% de SVF. L'anticorps primaire est ajouté à la concentration nécessaire (Tableau 1) Une solution contenant les anticorps secondaires appropriés liés à AlexaFluor 488 (dilué 1:500) et DAPI (1:20000, Molecular Probes, D3571) dans du PBS + 5% SVF est préparée. Les lamelles sont incubées 1h à 37°C dans cette solution. Les lamelles ont été lavées trois fois avec du PBS 1x entre chaque étape. Les lamelles ont été montées sur des lames de verre (Fisher) avec du Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates, 010001). Les images des cellules ont été capturées grâce à l'objectif 63X d'un microscope confocal LSM780 (Carl Zeiss Microimaging). Les marquages témoins n'ont révélé aucune réactivité croisée ou bruit de fond. Les images ont été prises en mode de numérisation séquentielle via le logiciel ZEN. Les images ont été analysées avec Icy Software de l'Institut Pasteur (de Chaumont et al. 2012).

3.9 Statistiques

Les données ont été analysées avec le logiciel GraphPad. La moyenne des données \pm SEM de trois expériences indépendantes a été analysé. La significativité est représentée par *** P<0,001, ** P<0.01 selon une ANOVA unidirectionnelle avec un test de comparaison multiple de Tukey (Figure 19D)

3.10 Anticorps

Tableau 2 : Anticorps utilisés

Anticorps utilisés	Fournisseur	Numéro de produit	Dilution utilisée	Utilisé pour :
p65relA	Cell Signaling	L8F6	1/1000	Western Blot
C-Jun	Santa cruz Biotechnology	sc-1694	1/1000	Western Blot
SHP-1	AbCam	ab3254	1/1000	Western Blot
PTP-PEST	Halle et al. (2007) Cote et al. (2002)	2530	1/1000	Western Blot
mTOR	Cell Signaling	7C10, 2983	1/1000	Western Blot
NLRP3	AdipoGen Life Sciences	AG-20B- 0014-C100	1/500	Western Blot
VAMP3	Synaptic Systems	104302	1/100	Western Blot
VAMP8	Synaptic Systems	104 303	1/1000 ou 1/200	Western Blot et Immunofluorescence
Stx5	Synaptic Systems	10053	1/1000 ou 1/200	Western Blot et Immunofluorescence
SAPK-JNK	New England Biolab	9252	1/1000	Western Blot
B-actin	Cell Signaling	4967S	1/2000	Western Blot
GP63	Button et al. (1993) Macdonald, Morrison, and McMaster (1995)	235	1/10	Western Blot
Anti-lapin + peroxydase	Sigma Aldrich	A0545	1/5000	Western Blot
Anti-souris + peroxydase	Sigma Aldrich	A4416	1/5000	Western blot
Anti-lapin + alexa fluor 488	Invitrogen - Molecular probe	A11008	1/500	Immunofluorescence

4 RÉSULTATS

4.1 Dynamique de GP63 au cours de l'infection par *L. major*, *L. major* $\Delta gp63$ et *L. major* $\Delta gp63+GP63$

Afin de s'assurer de l'intégrité de GP63 au cours de l'infection et suite à la lyse avec ou sans 1,10-Phénanthroline, un immunobuvardage de type western a été effectué à l'aide d'anticorps anti-GP63. Ce Western blot, ainsi que tous les autres effectués au cours de ce projet, ont été analysés suivant ce même protocole : des cellules BMMs non-infectées et infectées par des parasites métacycliques de *L. major* sauvage (WT), *L. major* $\Delta gp63$ (KO) et *L. major* $\Delta gp63+GP63$ (RES) ont été récoltées à 2 h, 6 h et 24 h post-infection. Afin de comparer et de reproduire ce qui avait été publié, ces cellules ont été lysées avec un tampon de lyse sans addition de 1,10-Phénanthroline. En parallèle, des cellules cultivées dans les mêmes conditions ont été lysées dans un tampon de lyse contenant l'inhibiteur de métalloprotéase. Ces lysats ont été migrés sur SDS-PAGE et un immunobuvardage de type western avec les anticorps appropriés (voir Tableau 2 : Anticorps utilisés).

À la Figure 13, il est donc possible d'observer que GP63 est présente dans les lysats provenant des infections par *L. major* et *L. major* $\Delta gp63+GP63$ tout au long de l'infection, mais plus particulièrement à 2 h et 6 h post-infection. En effet, à 24 h post-infection, la vaste majorité des parasites est maintenant sous forme amastigote, qui a un niveau de GP63 nettement moindre. Il est également possible de voir les deux formes de GP63, soit la forme complète et sa forme métabolisée (Macdonald, Morrison, and McMaster 1995). Pour les échantillons provenant de cellules infectées par *L. major* $\Delta gp63$, il n'y a pas de bandes significativement observables et sont comparables aux échantillons provenant de cellules non-infectées à tous les temps post-infection. En comparant les échantillons lysés avec ou sans 1,10-Phénanthroline, il est donc été montré que ni la présence ni le niveau de GP63 n'est pas affecté par cette variable.

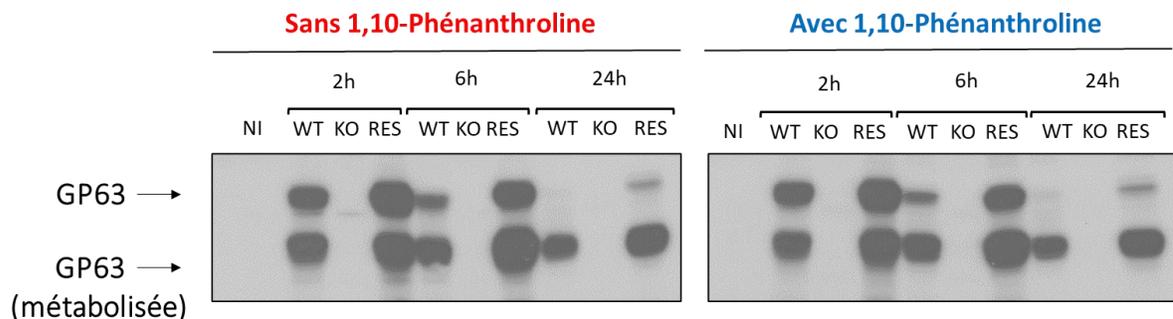


Figure 13 : Dynamique de GP63 lors d'infections par *L. major* sauvage (WT), *L. major* $\Delta gp63$ (KO) et *L. major* $\Delta gp63+GP63$ (RES) à 2h, 6h et 24h post-infection

Les lysats analysés proviennent de cellules BMMs infectées (à un ratio parasite/cellule de 10:1) par des parasites métacycliques de *L. major* sauvage (WT), *L. major* $\Delta gp63$ (KO) et *L. major* $\Delta gp63+GP63$ (RES) à 2 h, 6 h et 24 h post-infection. Un échantillon provenant de cellules non-infectées (NI) a été utilisé comme contrôle. Ces échantillons ont été traités dans les mêmes conditions, en parallèle, avec comme seule distinction l'addition de 1,10-Phénanthroline au tampon de lyse lors de l'extraction des protéines. Les protéines ont été séparées par migration sur SDS-PAGE et analysés par immunobuvardage de type Western à l'aide d'anticorps reconnaissant GP63 (Tableau 2). Les résultats sont représentatifs d'au moins trois différentes expériences.

4.2 SAPK/JNK, n'étant pas un substrat connu de GP63, n'est pas clivé même en absence de 1,10-Phénanthroline

GP63 est capable de cliver une panoplie de substrats différents. Par contre, une certaine spécificité est présente et pas toutes les protéines ont le potentiel d'être clivées ou dégradées. En effet, les Stress-activated protein kinases (SAPK)/Jun amino-terminal kinases (JNK) ne sont pas connus comme étant des substrats de GP63. Ceci dit, on observe à la Figure 14 que tant en présence qu'en absence de 1,10-Phénanthroline, les protéines restent intactes lors d'infections par *L. major*, *L. major* $\Delta gp63$ et *L. major* $\Delta gp63+GP63$ comme dans les échantillons de cellules non-infectées. Ces résultats démontrent que GP63 clive avec spécificité certaines protéines et qu'elles ne sont pas toutes des cibles potentielles même post-lyse cellulaire.

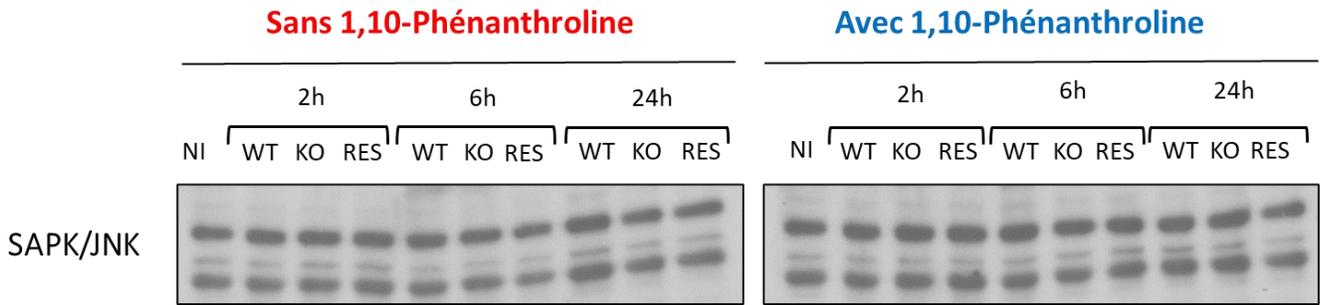


Figure 14 : SAPK/JNK, n'étant pas un substrat connu de GP63, n'est pas clivé même en absence de 1,10-Phénanthroline

Les lysats analysés proviennent de cellules BMMs infectées (à un ratio parasite/cellule de 10:1) par des parasites métacycliques de *L. major* sauvage (WT), *L. major Δgp63* (KO) et *L. major Δgp63+GP63* (RES) à 2h, 6h et 24h post-infection. Un échantillon provenant de cellules non-infectées (NI) a été utilisé comme contrôle négatif. Ces échantillons ont été traités dans les mêmes conditions, en parallèle, avec comme seule distinction l'addition de 1,10-Phénanthroline au tampon de lyse lors de l'extraction des protéines. Les protéines ont été séparées par migration sur SDS-PAGE et analysés par immunobuvardage de type Western à l'aide d'anticorps reconnaissant SAPK/JNK.

4.3 mTOR et NLRP3 ne sont pas clivés par GP63

L'étude publiée attestant du clivage de mTOR ne mentionne également pas l'utilisation d'un inhibiteur de protéase dans le tampon de lyse (Jaramillo et al. 2011). Les clivages observés peuvent donc avoir eu lieu lors de l'extraction de protéines et non au courant de l'infection. Tel qu'attendu, il est possible d'observer un clivage de mTOR lorsque la 1,10-Phénanthroline est absente du tampon de lyse. En effet, à tous les temps post-infection, une bande de clivage est observable au niveau des échantillons provenant des cellules infectées par *L. major* et *L. major Δgp63+GP63*. (Figure 15A) Ce clivage est bel et bien GP63-dépendant, car la bande présente dans les échantillons provenant des cellules infectées par *L. major Δgp63* est intacte (comme l'échantillon non-infecté). Par contre, lorsque la 1,10-Phénanthroline est ajoutée lors de la lyse, cette bande de clivage n'est plus visible, peu importe le temps post-infection ou la souche de *L. major* utilisée. Ces résultats nous montrent que mTOR n'est pas clivé lorsque GP63 est inhibé post-lyse cellulaire. Dans le même ordre d'idée, NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3) a également été identifié comme étant un substrat lors de l'infection par *Leishmania* (Shio et al. 2015). En suivant le même protocole que celui mentionné ci-haut, un immunobuvardage de type western a été effectué mais cette fois-ci, avec un anticorps anti-NLRP3. Sans 1,10-Phénanthroline ajoutée dans le tampon de lyse, tel qu'observé dans la littérature, il est possible de voir une dégradation de la protéine lors d'infection par *L. major* et *L. major Δgp63+GP63* à tous les temps post-infection. En additionnant la 1,10-Phénanthroline, cette dégradation n'est plus observable (Figure 15B). GP63 a la capacité de cliver mTOR et NLRP3, mais, selon ces résultats, ne les clive pas lorsque l'intégrité cellulaire est préservée.

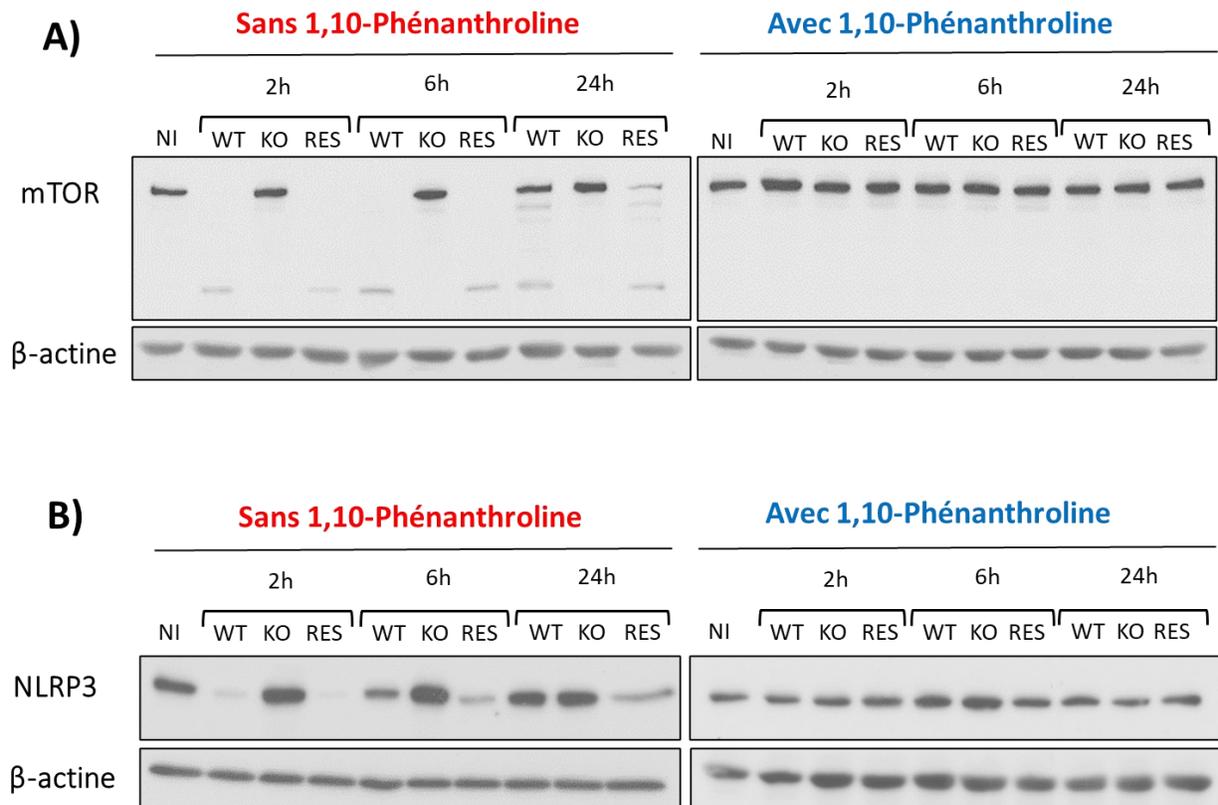


Figure 15 : mTOR et NLRP3 ne sont pas clivés par GP63 lorsque la 1,10-Phénanthroline est ajoutée lors de la lyse cellulaire

Les lysats analysés proviennent de cellules BMMs infectées (à un ratio parasite/cellule de 10:1) par des parasites métacycliques de *L. major* sauvage (WT), *L. major Δgp63* (KO) et *L. major Δgp63+GP63* (RES) à 2h, 6h et 24h post-infection. Un échantillon provenant de cellules non-infectées (NI) a été utilisé comme contrôle. Ces échantillons ont été traités dans les mêmes conditions, en parallèle, avec comme seule distinction l'addition de 1,10-Phénanthroline au tampon de lyse lors de l'extraction des protéines. Les protéines ont été séparées par migration sur SDS-PAGE et analysées par immunobuvardage de type Western à l'aide d'anticorps reconnaissant mTOR et NLRP3. La β-actine est utilisée comme contrôle de charge. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois différentes expériences.

4.4 Les protéines tyrosine phosphatases n'ont pas le même profil de clivage lorsque GP63 est inhibée lors de la lyse cellulaire.

Plusieurs protéines tyrosine phosphatases ont été également identifiées comme étant des cibles de GP63 (Gomez et al. 2012; Gomez et al. 2009; Halle et al. 2009). Deux de ces protéines ont ici été étudiées, soit SHP-1 et PTP-PEST. SHP-1, lorsqu'activé, est un inhibiteur de plusieurs voies de signalisation cellulaire pro-inflammatoire (Olivier et al. 2012; Gomez et al. 2009; Gomez et al. 2012). PTP-PEST joue un rôle dans le remaniement des filaments d'actine (Olivier et al. 2012; Halle et al. 2009).

Il est possible d'observer à la Figure 16A, PTP-PEST est dégradé dans les échantillons provenant de cellules infectées par *L. major* et *L. major Δgp63+GP63* en absence de 1,10-Phénanthroline. Il n'y a pas de dégradation au niveau des échantillons provenant des cellules infectées par *L. major Δgp63* tel qu'attendu. C'est ce qui avait été observé dans la littérature (Halle et al. 2009). Cependant, lorsque la 1,10-Phénanthroline est présente lors de l'extraction des protéines, la dégradation observée précédemment n'est plus observée. En effet, l'intensité des bandes spécifiques pour PTP-PEST est la même pour les échantillons infectés par *L. major* et *L. major Δgp63+GP63* comparativement aux échantillons infectés par *L. major Δgp63* (Figure 16A). Ces résultats suggèrent que PTP-PEST serait dégradé post-lyse et non durant l'infection.

Dans le cas de SHP-1, les résultats observés dans la littérature ont pu être reproduits lorsque la 1,10-Phénanthroline est absente du tampon de lyse (Figure 16B). Lorsque l'inhibiteur est ajouté, il est tout de même possible d'observer un clivage. Celui-ci est par contre beaucoup plus discret que ce qui avait été rapporté. Le film a dû être exposé beaucoup plus longtemps pour que la bande de clivage soit visible, soit 20 minutes comparativement à 2 minutes pour les échantillons sans 1,10-Phénanthroline. De plus, ce clivage est bien GP63-dépendant, puisqu'il n'est observable qu'au niveau des échantillons provenant de cellules infectées par *L. major* et *L. major Δgp63+GP63*, mais pas lors d'infections par *L. major Δgp63* (Figure 16B). Malgré que ces clivages ne soient pas de la même intensité que ceux rapportés dans la littérature (Gomez et al. 2009), ces résultats nous démontrent que SHP-1 est tout de même clivé lorsque GP63 est inhibée lors de la lyse cellulaire et que cette protéine serait une cible réelle de la métalloprotéase.

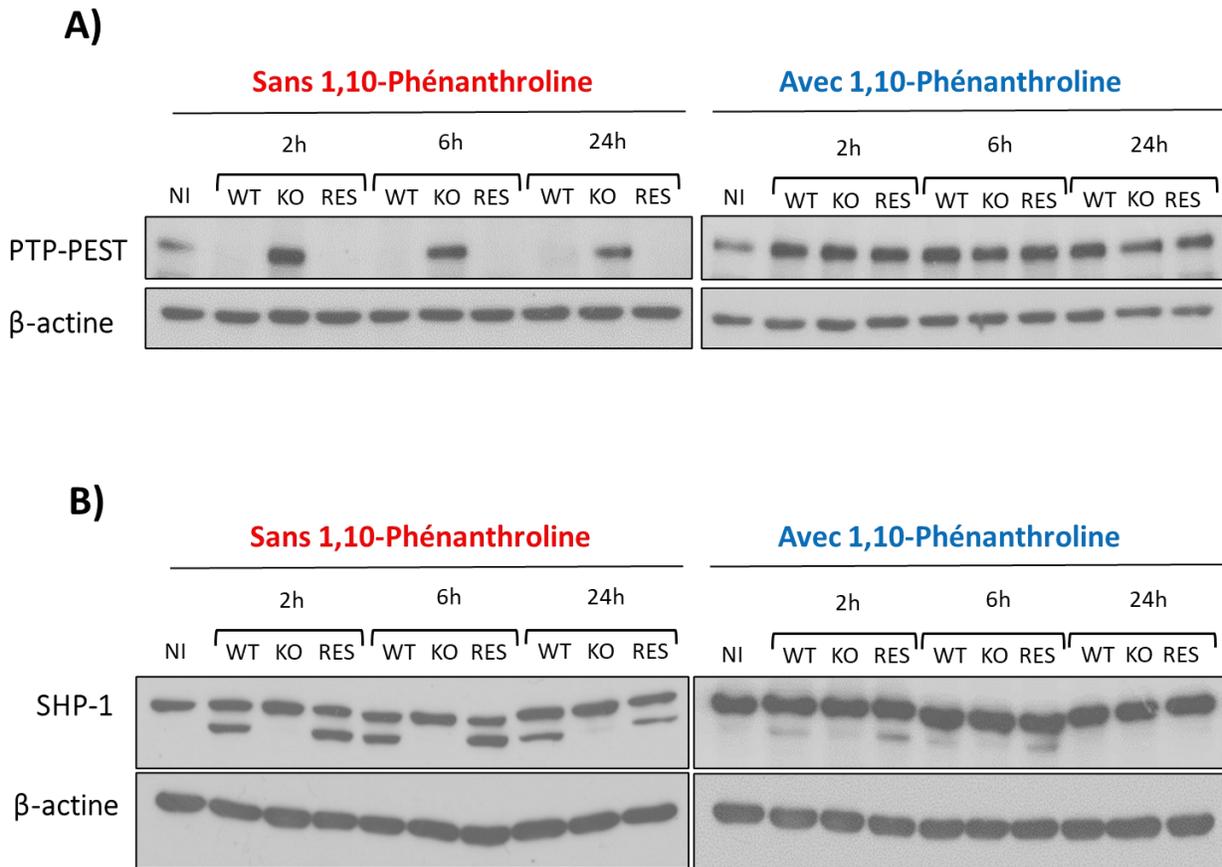


Figure 16 : Les protéines tyrosine phosphatases n'ont pas le même profil de clivage lorsque la 1,10-Phénanthroline est ajoutée au tampon de lyse.

Les lysats analysés proviennent de cellules BMMs infectées (à un ratio parasite/cellule de 10:1) par des parasites métacycliques de *L. major* sauvage (WT), *L. major Δgp63* (KO) et *L. major Δgp63+GP63* (RES) à 2h, 6h et 24h post-infection. Un échantillon provenant de cellules non-infectées (NI) a été utilisé comme contrôle négatif. Ces échantillons ont été traités dans les mêmes conditions, en parallèle, avec comme seule distinction l'addition de 1,10-Phénanthroline au tampon de lyse lors de l'extraction des protéines. Les protéines ont été séparées par migration sur SDS-PAGE et analysés par immunobuvardage de type Western à l'aide d'anticorps reconnaissant SHP-1 et PTP-PEST. L'image montrant les bandes spécifiques pour SHP-1 avec 1,10-Phénanthroline a été prise avec une longue exposition au ECL comparativement aux autres. La β-actine est utilisée comme contrôle de charge. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois différentes expériences.

4.5 Les sous-unités des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 ne sont pas clivées par GP63

En plus des molécules de signalisation mentionnées, les facteurs de transcription ont aussi été identifiés comme des cibles de GP63. Plus précisément, GP63 cliverait p65relA, la sous-unité de NF- κ B (Gregory et al. 2008). Selon les résultats obtenus, ce ne serait pas le cas. En effet, les résultats publiés dans la littérature ont pu être reproduits lorsque la 1,10-Phénanthroline n'était pas présente dans le tampon de lyse. Il était possible d'observer du clivage au niveau des échantillons provenant de cellules infectées par *L. major* et *L. major* Δ gp63+GP63, mais pas lors d'infections par *L. major* Δ gp63 tout comme l'échantillon provenant de cellules non-infectées. Par contre, lors de l'addition de l'inhibiteur de métalloprotéase lors de la lyse cellulaire, aucun clivage n'a pu être observé (Figure 17A). C-Jun, faisant partie du complexe AP-1, avait également été identifiée comme un substrat de GP63. Tout comme p65relA, il a été possible de reproduire le clivage GP63-dépendant observé dans la littérature (Contreras et al. 2010) en omettant la 1,10-Phénanthroline lors de la lyse des cellules infectées. En ajoutant l'inhibiteur dans le tampon de lyse, la dégradation n'est plus observée (Figure 17B). Ces deux résultats suggèrent que GP63 a la capacité de cliver C-Jun et p65relA lorsqu'elles sont en contact, mais ne clive pas ces deux protéines dans un contexte d'infection.

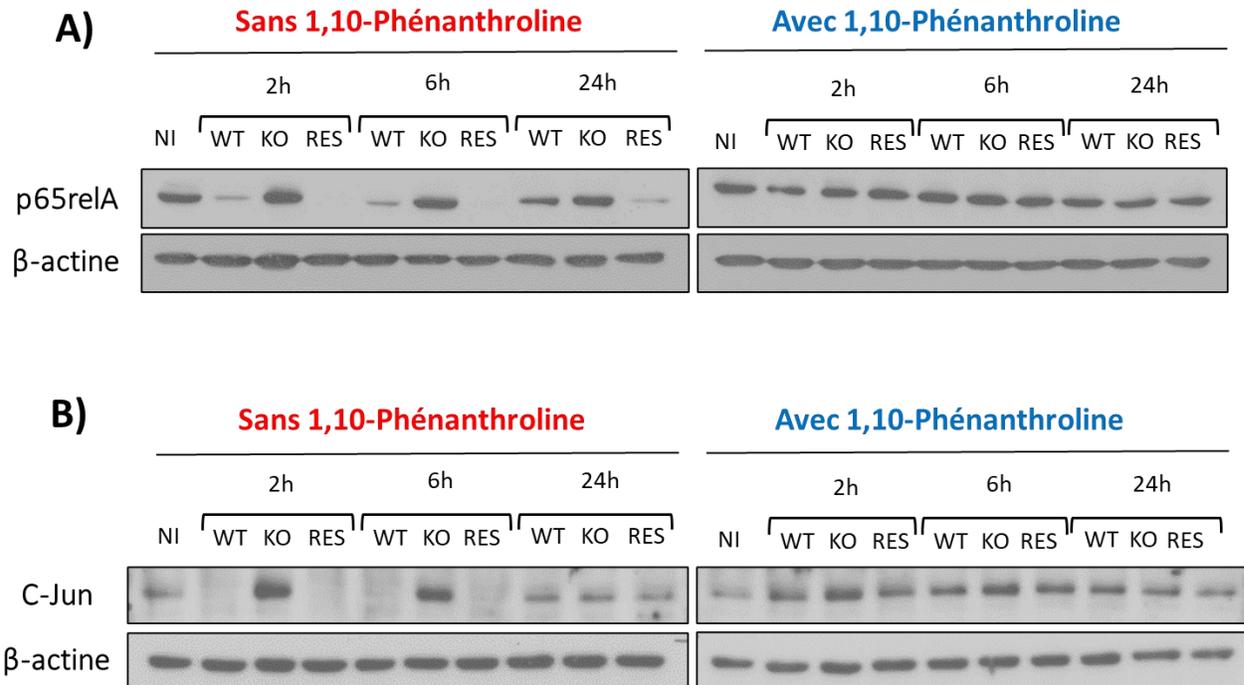


Figure 17 : Les sous-unités des facteurs de transcriptions NK- κ B et AP-1 ne sont pas clivés lorsque la 1,10-Phénanthroline est présente dans le tampon de lyse

Les lysats analysés proviennent de cellules BMMs infectées (à un ratio parasite/cellule de 10:1) par des parasites métacycliques de *L. major* sauvage (WT), *L. major* Δ gp63 (KO) et *L. major* Δ gp63+GP63 (RES) à 2h, 6h et 24h post-infection. Un échantillon provenant de cellules non-infectées (NI) a été utilisé comme contrôle négatif. Ces échantillons ont été traités dans les mêmes conditions, en parallèle, avec comme seule distinction l'addition de 1,10-Phénanthroline au tampon de lyse lors de l'extraction des protéines. Les protéines ont été séparées par migration sur SDS-PAGE et analysés par immunobuvardage de type Western à l'aide d'anticorps reconnaissant p65relA et C-Jun. La β -actine est utilisée comme contrôle de charge. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois différentes expériences.

4.6 Réévaluation du clivage des SNAREs VAMP3 et VAMP8

Les protéines VAMP3 et VAMP8 sont des « soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors » (SNAREs) qui servent à moduler le transport vésiculaire (Matte and Descoteaux 2016). Ces deux protéines avaient été identifiées comme étant des substrats de GP63 lors d'infections par différentes souches de *Leishmania* (Matheoud et al. 2013; Matte, Casgrain, Séguin, et al. 2016; da Silva Vieira et al. 2019). Par contre, c'est avec la souche de *L. major* qu'il était possible de confirmer que le clivage était GP63-dépendant, puisque la souche mutante était disponible.

Pour commencer, VAMP3 a été analysée. Sans l'inhibiteur, il est possible d'observer la dégradation de la protéine au niveau des échantillons de cellules infectées par *L. major* et *L. major Δgp63+GP63*, mais pas lors d'infections par *L. major Δgp63*, tout comme l'échantillon provenant de cellules non-infectées (Figure 18A). Lorsque la 1,10-Phénanthroline est ajoutée, la dégradation n'est plus observable. VAMP3 n'est donc pas clivée par GP63 lorsque la 1,10-Phénanthroline est présente pour inhiber la métalloprotéase post-lyse.

VAMP8 a été étudiée dans les mêmes conditions que VAMP3. Par contre, des infections avec d'autres souches de *Leishmania* ont été effectuées en plus des infections par le trio de *L. major*, puisque d'autres souches avaient été utilisées pour identifier cette cible en particulier (da Silva Vieira et al. 2019). En absence de 1,10-Phénanthroline lors de la lyse cellulaire, il est possible d'observer que GP63 est clivée par les souches *L. major* et *L. major Δgp63+GP63*, mais également par *L. braziliensis* M15991 et *L. mexicana* à 2 h et 6 h post-infection. Avec l'addition de 1,10-Phénanthroline, il était tout de même possible d'observer un clivage plus léger par ces mêmes souches. Par ailleurs, aucun clivage n'a été observé lors d'infections par *L. major Δgp63* et *L. donovani* LV9 qu'il y ait de la 1,10-Phénanthroline ou non dans le tampon de lyse. D'après ces résultats (Figure 18B), il est juste de déduire que VAMP8 est bien clivée par GP63, mais le clivage n'est pas aussi marqué qu'observé dans la littérature lorsque la 1,10-Phénanthroline est ajoutée lors de la lyse cellulaire.

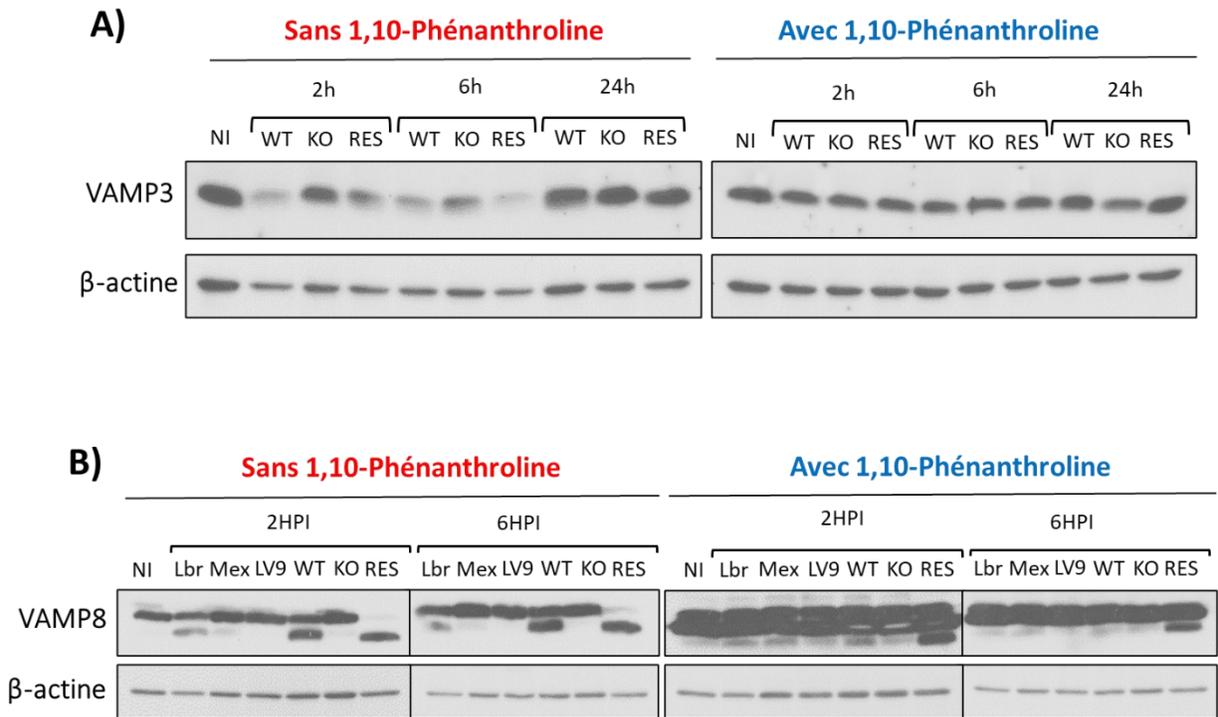


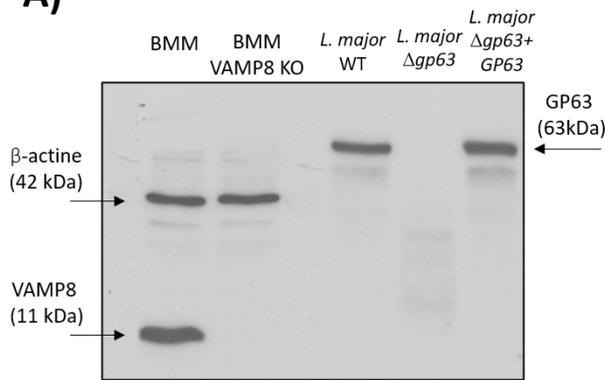
Figure 18: Re-examination du clivage des SNAREs VAMP3 et VAMP8

Les lysats analysés proviennent de cellules BMMs infectées (à un ratio parasite/cellule de 10:1) par des parasites métacycliques de *L. major* sauvage (WT), *L. major Δgp63* (KO), *L. major Δgp63+GP63* (RES), *L. braziliensis* M15991 (Lbr), *L. mexicana* (Mex) et *L. donovani* LV9 (LV9) à 2h, 6h ou 24h post-infection. Un échantillon provenant de cellules non-infectées (NI) a été utilisé comme contrôle négatif. Ces échantillons ont été traités dans les mêmes conditions, en parallèle, avec comme seule distinction l'addition de 1,10-Phénanthroline au tampon de lyse lors de l'extraction des protéines. Les protéines ont été séparées par migration sur SDS-PAGE et analysés par immunobuvardage de type Western à l'aide d'anticorps reconnaissant VAMP3 et VAMP8. La β-actine est utilisée comme contrôle de charge. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois différentes expériences.

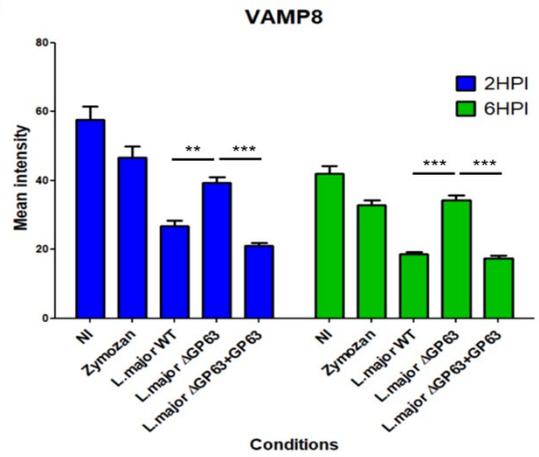
4.7 L'intensité de fluorescence spécifique à VAMP8 est diminuée de façon GP63-dépendante

Afin de confirmer l'action de GP63 spécifiquement sur VAMP8 dans une cellule intacte, une immunofluorescence spécifique a été effectuée. Pour s'assurer de cette spécificité, un immunobuvardage de type Western a été fait afin de détecter VAMP8 dans les cellules, mais également pour confirmer la génétique des parasites du trio de *L. major* utilisé. Tel que présenté à la Figure 19A, les cellules exprimaient bel et bien VAMP8. Des cellules mutantes pour le gène VAMP8 ont été utilisées comme contrôle négatif afin de confirmer la spécificité de l'anticorps. Également, le trio de *L. major* a été testé afin de confirmer si GP63 était présente ou pas. Tel qu'attendu, *L. major* et *L. major* $\Delta gp63+GP63$ expriment GP63, mais pas *L. major* $\Delta gp63$ (Figure 19A). Toujours comme témoin, des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMM) non-infectés, des BMMs déficients en VAMP8 et des BMMs ayant phagocytés des particules de zymozan ont été marqués par les anticorps fluorescents. L'intensité de fluorescence spécifique à VAMP8 est similaire pour les cellules non-infectées et les cellules ayant phagocytées les particules de zymozan (Figure 19B). La fluorescence est presque inexistante pour les cellules mutantes pour VAMP8, ce qui confirme la spécificité de l'anticorps utilisé pour cette protéine (Figure 19B). En comparant l'intensité de fluorescence des cellules infectées par le trio de *L. major* (Figure 19C), il est possible d'observer une différence notable entre les souches. En effet, les cellules infectées par *L. major* et *L. major* $\Delta gp63+GP63$ montrent une fluorescence moins forte que les cellules infectées par *L. major* $\Delta gp63$, et ce, autant à 2 h qu'à 6 h post-infection. De plus, il est possible de voir une différence dans l'intensité de fluorescence même entre les cellules infectées ou non par *L. major* et *L. major* $\Delta gp63+GP63$ (Figure 19C). Cette différence d'intensité s'est avérée significative entre *L. major* et *L. major* $\Delta gp63+GP63$ par rapport à *L. major* $\Delta gp63$. Ces résultats sont une confirmation supplémentaire nous permettant de dire que VAMP8 est bel et bien clivée par GP63.

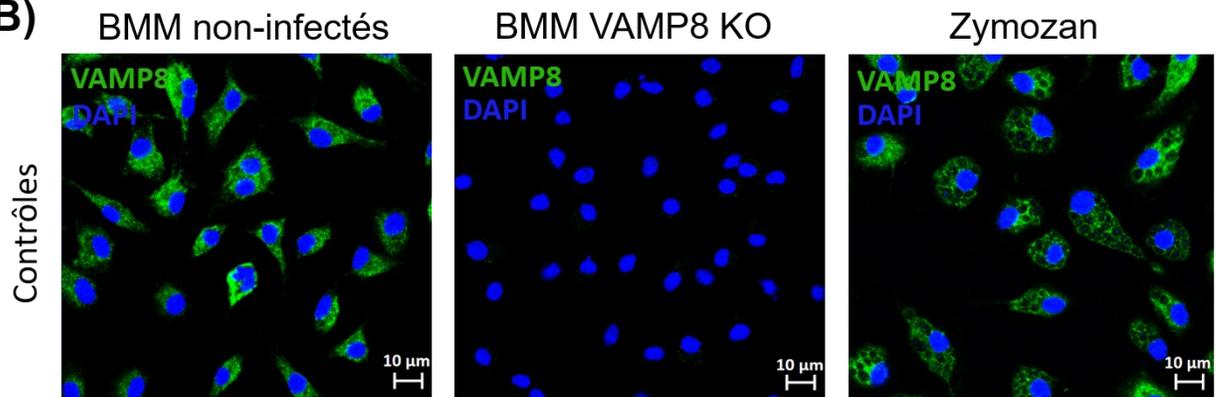
A)



D)



B)



C)

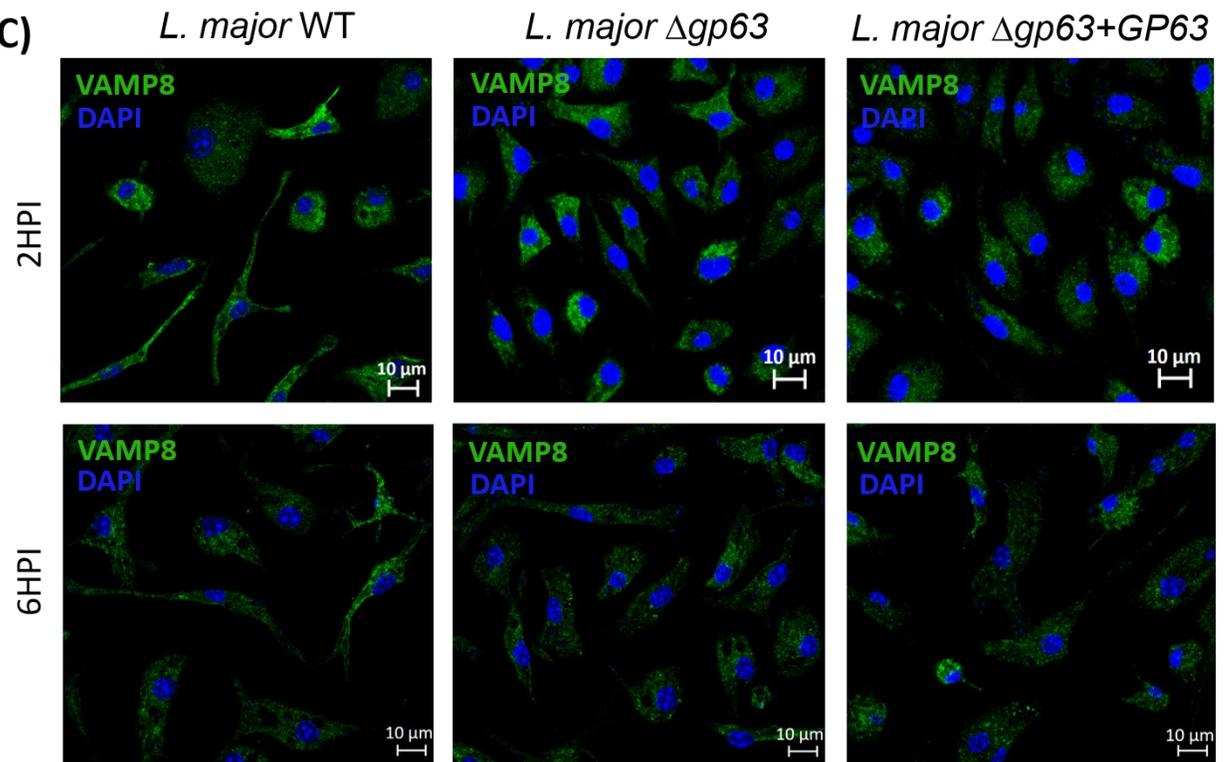


Figure 19 : L'intensité de fluorescence spécifique à VAMP8 est diminuée de façon GP63 dépendante

A) Les lysats analysés proviennent de cellules BMMs sauvage et VAMP8 KO non-infectées et de parasites métacycliques de *L. major* sauvage (WT), *L. major Δgp63* (KO) et *L. major Δgp63+GP63* (RES) Les protéines ont été séparées par migration sur SDS-PAGE et analysés par immunobuvardage de type Western à l'aide d'anticorps reconnaissant VAMP8 et GP63. La β-actine est utilisée comme contrôle de charge. **B)** Et **C)** BMMs infectées (à un ratio parasite/cellule de 10:1) par des parasites métacycliques de *L. major* sauvage, *L. major Δgp63* et *L. major Δgp63+GP63* à 2h et 6h post-infection. Un échantillon provenant de cellules WT et de cellules VAMP8 KO non-infectées (NI) ainsi que des cellules ayant phagocyté des particules de zymozan ont été utilisées comme contrôles. Les cellules ont été fixées et marquées avec le marqueur d'ADN DAPI ainsi qu'avec un anticorps primaire anti-VAMP8 couplé à un anticorps secondaire Alexa Fluor 488 pour la détection en microscopie confocale, tel que décrit dans la section Méthode. Les résultats sont représentatifs de trois différentes expériences. **D)** L'intensité de fluorescence a été mesurée à l'aide du logiciel ICY de l'Institut Pasteur (de Chaumont et al. 2012). Les données ont été analysées avec le logiciel GraphPad. La moyenne des données ±SEM de trois expériences indépendantes a été analysé. La significativité est représentée par *** P<0,001, ** P<0.01 selon une ANOVA unidirectionnelle avec un test de comparaison multiple de Tukey.

STX5 est un substrat confirmé de GP63

La dernière protéine étudiée était Syntaxin 5. Tout comme VAMP3 et VAMP8, celle-ci fait partie de la catégorie des SNAREs et est particulièrement importante pour le transport entre le réticulum endoplasmique et le Golgi (Linders et al. 2019). Dans un contexte d'infection par *Leishmania*, il a été rapporté que le parasite se servirait de cette protéine pour détourner des vacuoles provenant du réticulum endoplasmique vers la vacuole parasitophore afin de s'approvisionner en membrane plasmique (Podinovskaia and Descoteaux 2015). Il avait été montré que cette protéine était clivée par GP63 (da Silva Vieira et al. 2019), mais pas dans un contexte de comparaison avec les mutants *L. major* $\Delta gp63$ et *L. major* $\Delta gp63+GP63$. Il est possible de voir en Western blot les deux formes de Syntaxin 5 (Figure 20A), soit la forme longue associée au réticulum endoplasmique (RE) et la forme plus courte associée au Golgi. Lorsque la 1,10-Phénanthroline est absente du tampon de lyse, les deux formes sont clivées. Par contre, avec l'inhibiteur, seul la forme longue associée au RE est clivée. Ce clivage est bel et bien GP63-dépendant, puisque l'échantillon provenant des cellules infectées par *L. major* $\Delta gp63$ ne montrent aucun clivage, tel que l'échantillon de cellules non-infectées.

Malgré les connaissances déjà publiées à propos de l'impact de *Leishmania* sur STX5 (Canton and Kima 2012; da Silva Vieira et al. 2019; Podinovskaia and Descoteaux 2015), une immunofluorescence montrant Syntaxin 5 dans un contexte GP63-dépendant n'avait jamais été publiée. À la Figure 20B et C, il est possible d'observer la différence entre les cellules non-infectées, les cellules ayant phagocytées des particules de zymozan et des cellules infectées par le trio de *L. major* à 2 h et 6 h post-infection. L'intensité de fluorescence dans le cytoplasme de la cellule, ce que nous pensons être spécifique pour la forme longue de STX5 associée au RE, semble grandement diminuer lors d'infection par *L. major* et *L. major* $\Delta gp63+GP63$ comparativement aux cellules infectées par *L. major* $\Delta gp63$ et aux contrôles à la Figure 8B. Cette diminution est encore plus marquée à 2 h post-infection. Par contre, un amas de signal est présent. Ceci est vraisemblablement la forme courte de STX5 associée au Golgi. Celle-ci semble rester plus ou moins à la même intensité de fluorescence. Ceci nous suggère que la forme associée au Golgi reste intacte comparativement à la forme longue, comme nous avons pu observer en Western blot (Figure 20A). De ces résultats, il est possible de déduire que Syntaxin 5 est définitivement clivée par GP63, plus particulièrement sa forme longue associée au RE.

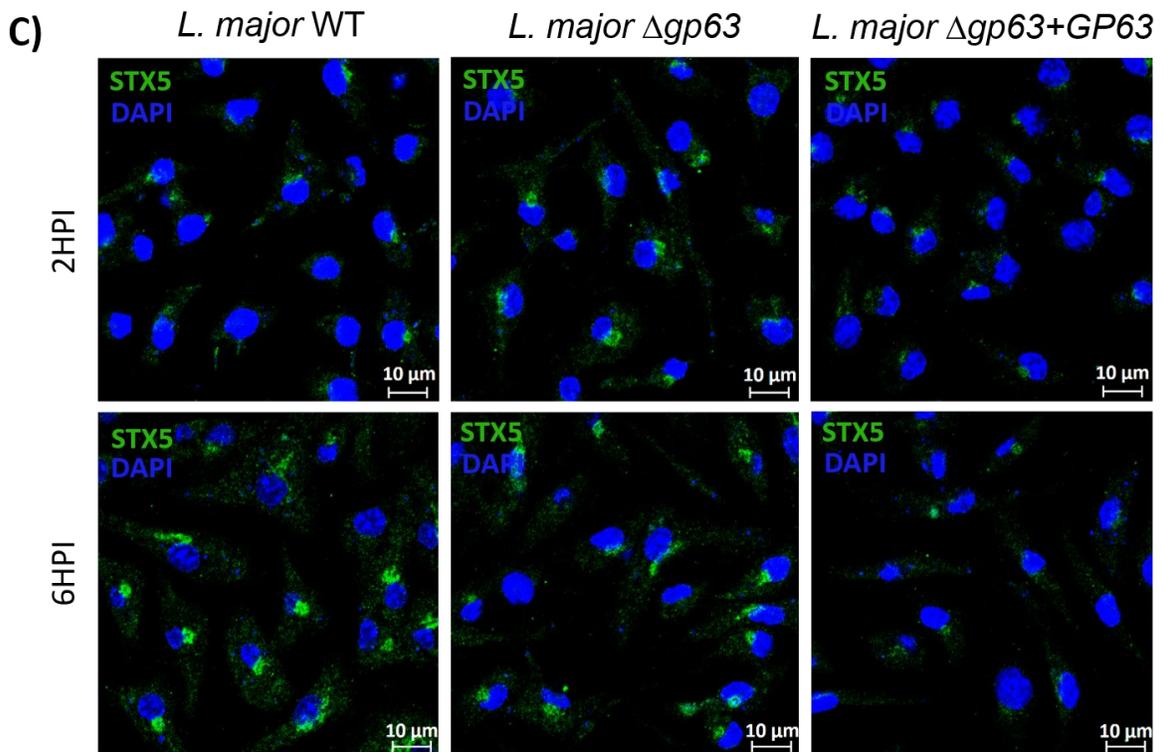
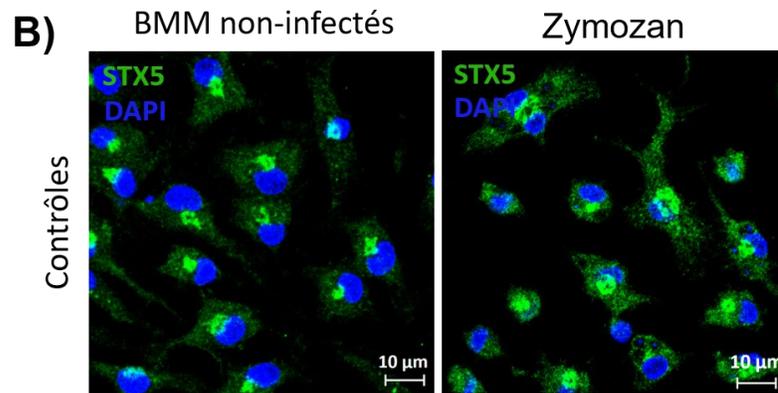
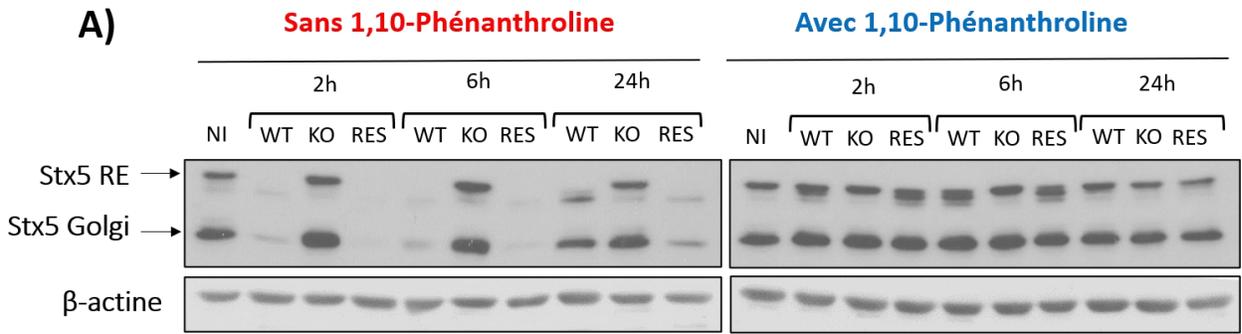


Figure 20 : STX5 est un substrat confirmé de GP63

A) Les lysats analysés proviennent de cellules BMMs infectées (à un ratio parasite/cellule de 10:1) par des parasites métacycliques de *L. major* sauvage (WT), *L. major* Δ gp63 (KO) et *L. major* Δ gp63+GP63 (RES) à 2h, 6h et 24h post-infection. Un échantillon provenant de cellules non-infectées (NI) a été utilisé comme contrôle. Ces échantillons ont été traités dans les mêmes conditions, en parallèle, avec comme seule distinction l'addition de 1,10-Phénanthroline au tampon de lyse lors de l'extraction des protéines. Les protéines ont été séparées par migration sur SDS-PAGE et analysés par immunobuvardage de type Western à l'aide d'anticorps reconnaissant STX5. La β -actine est utilisée comme contrôle de charge. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois différentes expériences.

B) et C) BMMs infectées (à un ratio parasite/cellule de 10:1) par des parasites métacycliques de *L. major* sauvage, *L. major* Δ gp63 et *L. major* Δ gp63+GP63 à 2h et 6h post-infection. Un échantillon provenant de cellules non-infectées (NI) ainsi que des cellules ayant phagocytées des particules de Zymozan ont été utilisés comme contrôles. Les cellules ont été fixées et marquées avec le marqueur d'ADN DAPI ainsi qu'avec un anticorps primaire anti-STX5 couplé à un anticorps secondaire Alexa Fluor 488 pour la détection en microscopie confocale, tel que décrit dans la section Méthodes. Les résultats sont représentatifs de trois différentes expériences.

5 Discussion

La réévaluation de certains des substrats de la métalloprotéase GP63 de *Leishmania* a été faite au cours de ce projet. Plus précisément, dix cibles publiées ont été analysées, choisies selon leur importance dans différentes catégories de fonctions cellulaires. Puisque la technique la plus utilisée pour identifier ces substrats de GP63 a été l'immunobuvardage de type Western, c'est sur cette technique qu'est le focus de ce projet. La problématique soulevée est en lien directe avec cette méthode, nécessitant l'extraction des protéines et donc la lyse des parois cellulaires. Notre équipe a découvert que GP63 n'était pas inhibée par les inhibiteurs de protéases ou les chélateurs utilisés traditionnellement (Figure 10). En effet, même en co-incubant des lysats de parasites et de cellules non-infectées, il était possible d'observer du clivage. Ce ne serait pas la première fois que des erreurs de ce genre se produisent. L'équipe de Chen et al. (2012) ont publié une étude portant sur CPAF, une protéase jugée importante comme facteur de virulence lors d'une infection par la bactérie *Chlamydia*. Ils ont découvert que 11 des substrats précédemment identifiés n'était en fait pas réellement clivés, puisque CPAF n'était pas inhibé lors de la lyse cellulaire. Inspirés par cette étude et tentant de reproduire les résultats obtenus dans la littérature à propos de GP63, nous avons démontré que seulement trois des cibles précédemment identifiées et analysés pour ce projet de recherche sont des substrats authentiques de GP63 (Tableau 1). Il est important de noter que ces protéines confirmées n'étaient toutefois pas dégradées/clivées autant que ce qui avait été rapporté dans la littérature ou ce qui est observé sans l'addition de 1,10-Phénanthroline. D'autant plus convaincant, il était possible de reproduire ces résultats publiés auparavant en procédant à l'extraction de protéines en utilisant un tampon de lyse traditionnel sans addition de 1,10-Phénanthroline. En ajoutant simplement l'inhibiteur de métalloprotéase qui chélate les ions de zinc, GP63 est incapable de remplir ses fonctions protéolytiques et il est donc possible de voir le profil protéique représentatif de ce qui se passe lors de l'infection d'une cellule intacte, non biaisé par de potentiels clivages/dégradations post-lyse cellulaire. Ces résultats surprenants ont mené à un questionnement sérieux quant à l'identification des cibles de GP63, mais surtout à son rôle pendant l'infection.

Avant toute chose, nous avons vérifié la dynamique de GP63 au cours de l'infection en utilisant le trio de *L. major* (*L. major* sauvage, *L. major* $\Delta gp63$ et *L. major* $\Delta gp63+GP63$) pour infecter des BMMs. Tel qu'attendu, nous avons pu constater que GP63 est présent dans les cellules infectées par *L. major* et *L. major* $\Delta gp63+GP63$, contrairement aux cellules infectées par *L. major* $\Delta gp63$. L'expression de GP63 est plus forte au début de l'infection, à 2 h et 6 h post-infection, coïncidant

avec le moment où les parasites sont toujours sous forme promastigote et expriment le plus GP63 (Inbar et al. 2017; Rosenzweig et al. 2008). En effet, leur forme amastigote exprime beaucoup moins GP63 (Inbar et al. 2017). Après avoir atteint 24h post infection, la majorité des parasites sont sous cette forme dans le macrophage infecté (Rosenzweig et al. 2008), ce qui explique la diminution marquée à ce temps (Figure 13). Également, il est possible d'observer que le niveau de GP63 produit par *L. major* et *L. major Δgp63+GP63* est légèrement différent (Figure 13). En effet, ce mutant a été créé en transfectant des parasites mutants pour GP63 avec un plasmide exprimant l'un des 7 gènes *GP63* de *L. major* (Joshi et al. 1995; Joshi et al. 2002) (

Figure 8), plus précisément le gène numéro 1. La régulation du gène au cours de l'infection n'est donc pas la même, puisque les gènes 1 à 7 sont régulés différemment au cours de la différenciation du parasite, alors que le gène sur le plasmide est constitutivement exprimé. Conséquemment, il y a plus de GP63 produit par la souche *L. major Δgp63+GP63*, donc plus de clivage ou de dégradation observée lors de l'infection. Il est également possible d'observer deux formes de GP63, une de 63 kDa et une d'un poids moléculaire légèrement moindre (~42 kDa) (Figure 13). La forme complète inactive et la forme mature métabolisée. En effet, la séquence peptidique prédite de GP63 chez *L. major* contient un peptide signal (KDEL) servant à être mobilisé au réticulum endoplasmique de la cellule infectée et y être mûré. Un pro-peptide immature est aussi présent et sera retiré lors du processus de maturation (Macdonald, Morrison, and McMaster 1995). Cette forme mature de GP63, réduite en termes de peptides, réduit donc la taille de la protéine et c'est ce qu'on peut observer tout au long des premières heures de l'infection. Il est possible de voir également que la quantité de GP63 métabolisée est très similaire au cours de l'infection, et c'est ce qui avait été observé par Arango Duque et al. (2019). En effet, la présence de GP63 détectée par Western blot ne veut pas nécessairement dire que la métalloprotéase est active. L'activité des trois souches du trio de *L. major* a été attestée par zymographie par Arango Duque et al. (2019). Dans cette étude, la comparaison avait même été faite avec une souche exprimant une forme de GP63 catalytiquement inactive. Il avait été démontré avec l'aide de cette souche que GP63 sera métabolisée par la cellule qu'elle soit active ou non. La présence de GP63 métabolisée ne signifie donc pas qu'elle soit encore catalytiquement active et il a d'ailleurs été démontré que, même si GP63 est originellement active, l'activité est malgré tout diminuée à 24h post-infection (Arango Duque et al. 2019). Il est également possible de voir que les GP63 de la souche *L. major Δgp63+GP63* sont non seulement présentes en plus grande quantité que celles de la souche sauvage, mais sont également proportionnellement actives. Il n'est donc pas surprenant de voir un clivage ou une dégradation plus marquée des protéines provenant des BMMs infectées par *L. major Δgp63+GP63*. Il est

important de noter que GP63, même en ayant un large spectre de possibilité de clivage et une haute activité protéolytique, est tout de même spécifique à certains substrats. En effet, à la Figure 14, il est montré que même en absence de 1,10-Phénanthroline, SAPK/JNK ne sont pas clivés par GP63.

La protéine suivante analysée était mTOR. C'est aussi grâce à des résultats obtenus précédemment au laboratoire Descoteaux lors de l'analyse de cette protéine que ces recherches ont débutées. En effet, à la Figure 10 de l'introduction, un SDS-PAGE suivi par un Western Blot avait été fait avec plusieurs échantillons provenant d'infections par *L. major* Δ GP63+GP63, de lyses simultanées des BMMs avec les parasites et de co-incubation de lysats. Même une co-incubation de lysats menait à un clivage. Par contre, en ajoutant 10mM de 1,10-Phénanthroline, le profil de clivage était identique au profil des protéines provenant des cellules non-infectées. En gardant ceci en tête, à la Figure 15A, il a été montré que la protéine n'est pas clivée lorsque 10mM de 1,10-Phénanthroline est ajoutée lors de la lyse. Le clivage est visible seulement si l'inhibiteur n'est pas présent, tout comme dans la littérature (Jaramillo et al. 2011). Dans ce papier, il avait été montré que, d'une façon GP63 dépendante, *Leishmania* active les 4E-BPs afin de réduire la traduction CAP-dépendante de protéines dans la cellule, ce qui menait à une meilleure survie du parasite. Lorsqu'activé, mTOR est un répresseur de 4E-BPs. Le clivage observé était donc une conclusion évidente pour expliquer le phénomène. Par contre, selon nos résultats, il semblerait que le clivage de mTOR soit le résultat d'un artéfact. D'autres études devront être faites afin de découvrir quelle est réellement la cause de ces observations.

Dans la même optique, NLRP3 avait été identifiée comme étant un substrat de GP63 (Shio et al. 2015). En effet, il avait été découvert que, de façon GP63-dépendante, *Leishmania* diminuait le niveau de sécrétion d'IL-1 β et qu'également la production de ROS était inhibée (normalement activée par NLRP3). Les clivages de cette protéine, ainsi que d'autres protéines associées à l'inflammasome, ont donc été une conclusion évidente pour expliquer la diminution de ROS. Selon les résultats obtenus avec l'addition de 1,10-Phénanthroline dans le cadre de ce projet de recherche, aucun clivage de NLRP3 n'a pu être observé (Figure 15B). N'ayant testé que NLRP3 parmi les autres protéines identifiées comme étant des substrats, d'autres seront à reconfirmer. Par exemple, TXNIP, connue pour faciliter l'activation de l'inflammasome, a été rapportée comme étant clivée par GP63 (Shio et al. 2015). Ceci devra être confirmé ultérieurement en utilisant l'inhibiteur de métalloprotéase lors de la lyse cellulaire. Les résultats de ce papier démontrent tout de même l'implication de GP63, puisque des surnageants de cultures cellulaires ont été analysés et pas seulement des lysats de cellules infectées. La chaîne de signalisation de l'inflammasome

étant très complexe, davantage de recherches devront être faites afin d'éclaircir le rôle exact de GP63 dans l'altération de ces mécanismes cellulaires lors d'infection par *Leishmania*.

L'effet de GP63 sur les protéines tyrosine phosphatases a été très bien décrit dans la littérature (Garton, Flint, and Tonks 1996; Halle et al. 2007; Gomez et al. 2009; Gomez and Olivier 2010; Isnard, Shio, and Olivier 2012; Halle et al. 2009). Plusieurs avaient été identifiées comme étant des substrats de GP63 (Tableau 1). Dans le cadre de ce projet, deux ont été testées, soit PTP-PEST et SHP-1. Étant entre autres impliquée dans la modulation des filaments d'actine, PTP-PEST a été identifiée comme étant une cible de GP63 lors de l'infection par *Leishmania* (Halle et al. 2007; Olivier et al. 2012). Selon nos résultats (Figure 16A), en présence du chélateur de zinc lors de la lyse cellulaire, aucune dégradation de PTP-PEST n'a été observée. Ceci suggère que cette protéine n'était pas un vrai substrat de GP63. SHP-1, une autre protéine tyrosine phosphatase, a également été identifiée (Gomez et al. 2009; Gomez et al. 2012). Cette protéine est normalement inactive lors d'infections, puisqu'elle sert de répresseur des voies de signalisation d'activation des fonctions microbicides du macrophage. En effet, l'activation de SHP-1 mène à l'inhibition des voies JAK/STATs, MAPKs et IRAK1 (Olivier et al. 2012; Gomez et al. 2012; Gomez et al. 2009). Il a donc été rapporté que GP63 clive SHP-1 et l'active par le fait même pour bloquer ces voies de signalisation. En omettant la 1,10-Phénanthroline dans le tampon de lyse, il est possible de reproduire les résultats observés dans la littérature (Gomez et al. 2009). En ajoutant l'inhibiteur, un léger clivage est tout de même observable. Par contre, celui-ci est beaucoup plus discret et la membrane lors de la révélation par chimiluminescence doit être longuement exposée (Figure 16B). Il est donc important de noter que malgré la véracité de ce résultat, il n'était pas exactement le même qu'observé précédemment et que l'addition ou non de l'inhibiteur de protéase peut avoir un impact majeur sur le niveau de clivage. Ces résultats nous confirment que SHP-1 est un substrat authentique de GP63 et que les conclusions tirées quant à son implication lors de l'infection par *Leishmania major* sont encore valables.

Les facteurs de transcription des voies de signalisations mentionnées ci-haut ont aussi été identifiés comme cibles de GP63. La sous-unité de NF- κ B, p65relA, est l'une d'entre elles (Gregory et al. 2008). En effet, p65relA serait clivée, ce qui empêcherait la translocation au noyau de NF- κ B afin de stimuler la transcription de gènes pro-inflammatoires (TNF- α , IL-12, iNOS). Aussi, le clivage de p65 devait résulter en un fragment nouveau, nommé p35. Celui-ci, associé avec les autres sous-unités de NF- κ B, pouvait induire la transcription de chimiokines telles que CXCL2/MIP-2, CCL4/MIP-1 β et d'autres. Selon nos résultats (Figure 17A), avec l'addition de 1,10-Phénanthroline au tampon de lyse, aucun clivage de p65relA n'a pu être détecté. Ceci

suggère que GP63 ne clive pas p65relA dans un contexte d'infection de cellule intacte, même si la capacité de le faire est là. Nous avons d'ailleurs pu reproduire les résultats observés dans la littérature en omettant l'inhibiteur de métalloprotéase dans le tampon de lyse (Figure 17A). Le complexe AP-1 a également été rapporté comme étant affecté par GP63 (Contreras et al. 2010). Tel NF- κ B, AP-1 est connu comme étant un facteur stimulant la transcription de molécules pro-inflammatoires comme TNF- α , IL-12 et iNOS. L'inactivation de ce facteur par clivage serait donc avantageuse pour la survie du parasite. Plus précisément, C-Jun et C-Fos ont été identifiées comme étant des substrats de GP63 (Contreras et al. 2010). Dans le cadre de cette étude, uniquement C-Jun a été testée. Selon nos résultats (Figure 17B), C-Jun n'est pas clivée par GP63 si la 1,10-Phénanthroline est présente lors de la lyse cellulaire alors que le clivage est présent si l'inhibiteur est absent. Tous ces résultats démontrent que les clivages de ces sous-unités de facteurs de transcription étaient artéfactuels et que les phénomènes observés étaient également dus à une autre altération cellulaire causée par le parasite, peut-être en amont de la chaîne de signalisation, qui nous est pour l'instant inconnue.

Finalement, nous avons étudié une dernière famille de protéines étant connue pour être altérée par GP63. En effet, considérant le besoin de remodeler les compartiments cellulaires, des molécules clés servant au mouvement des vésicules sont clivées ou détournées à l'avantage de la survie et de la prolifération du parasite. Les SNAREs VAMP3 et VAMP8 avaient entre autres été identifiées comme substrats (Matheoud et al. 2013; Matte, Casgrain, Seguin, et al. 2016). VAMP3 est principalement impliquée à faciliter l'exocytose des endosomes de recyclage et la sécrétion de cytokines (Matte and Descoteaux 2016). En clivant VAMP3 avec GP63, l'infection par *Leishmania* empêcherait ces fonctions. Selon nos résultats, sans l'addition de 1,10-Phénanthroline, VAMP3 n'est pas dégradée par GP63 (Figure 18A). Ceci démontre que VAMP3 ne serait pas une réelle cible de GP63 durant l'infection. Quant à VAMP8, il a été montré que cette protéine était essentielle pour le recrutement du complexe NOX-2, pour la présentation croisée, mais également pour la phagocytose associée à LC3 (Matheoud et al. 2013; Matte, Casgrain, Seguin, et al. 2016; Dingjan et al. 2017; Matte and Descoteaux 2016; da Silva Vieira et al. 2019). Le clivage de VAMP8 par GP63 a été étudié chez plusieurs espèces de *Leishmania*, incluant des souches de *L. braziliensis* provenant de différents échantillons cliniques (da Silva Vieira et al. 2019). Nous avons donc vérifié la présence de clivage au niveau de cette protéine de façon GP63-dépendante lors d'infections par le trio de *L. major* et lors d'infections par différentes souches de *Leishmania* (Figure 18B). Sans l'addition de l'inhibiteur de métalloprotéase lors de la lyse, le clivage était marqué, particulièrement pour *L. major*, *L. braziliensis* et *L. mexicana*. Avec l'addition de 1,10-Phénanthroline, le clivage était présent mais beaucoup plus faible. En effet, tel

qu'avec SHP-1, l'exposition pour la révélation par chimiluminescence nécessitait d'être plus longue afin de détecter les bandes. En résumé, il a été possible de confirmer que VAMP3 n'était pas un vrai substrat mais que VAMP8, malgré que ce ne soit pas aussi marqué que dans la littérature, est bel et bien un substrat confirmé de GP63. Afin de doublement confirmer ce dernier fait, nous avons effectué une immunofluorescence spécifique pour VAMP8 (Figure 19). Ces résultats ont permis de confirmer que la quantité de VAMP8 est significativement diminuée de façon GP63-dépendante dans des cellules infectées intactes (Figure 19D). Ces expériences pourraient également être complétées dans le futur par l'image flow cytometry en utilisant l'ImageStreamX.

En dernier lieu, nous avons étudié une autre SNARE, cette fois-ci responsable de faciliter le trafic vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et le Golgi (Matte and Descoteaux 2016). Syntaxin 5 avait déjà été étudiée (da Silva Vieira et al. 2019; Arango Duque et al. 2019), mais pas dans un contexte GP63-dépendant. Il est important de noter que STX5 existe sous deux formes. La forme courte, de 35 kDa, est localisée au Golgi (Hui et al. 1997; Linders et al. 2019), alors que la forme longue de 42 kDa est associée au réticulum endoplasmique et contient une séquence supplémentaire double-arginine de rétention au RE (Linders et al. 2019; Hui et al. 1997). En clivant STX5, *Leishmania* détournerait le trafic de vésicule en partance du RE pour l'emmener vers la vacuole parasitophore afin de s'approvisionner en membrane plasmique. En comparant le profil protéique par Western blot suite à la lyse cellulaire de cellules infectées avec ou sans 1,10-Phénanthroline, une grande différence est observable (Figure 20A). Sans l'inhibiteur, les deux formes sont dégradées tandis qu'avec l'inhibiteur, seule la forme associée au RE est clivée. Ceci montre encore une fois que, malgré le fait que STX5 est un vrai substrat de GP63, ne pas utiliser de 1,10-Phénanthroline lors de la lyse cellulaire peut mener à de fausses conclusions puisqu'une seule des deux formes est clivée et pas les deux.

N'ayant jamais été observé dans la littérature, nous avons donc procédé à une immunofluorescence spécifique de STX5 de façon GP63-dépendante. Après comparaison entre des cellules infectées par les parasites du trio de *L. major*, il a été possible de voir qu'il y avait deux signaux distincts. Un agrégat près du noyau et du signal distribué dans le cytoplasme. Nous avons émis l'hypothèse que l'amas de signal serait associé avec la forme golgienne et le signal diffus avec la forme du RE, malgré la nécessité de procéder à des tests ultérieurs pour le confirmer. Ce qui est fort intéressant de ces images, c'est le fait que seul le signal de la forme cytoplasmique semble diminuer d'intensité comparativement aux cellules infectées par *L. major* $\Delta gp63$, avec zymozan et aux non-infectées (Figure 20B et C). Ceci concorde avec ce que nous

avons observé en Western blot, soit que seule la forme associée au RE soit clivée (Figure 20A). Il sera pertinent dans le cadre d'expériences futures d'effectuer d'autres immunofluorescences afin de confirmer la co-localisation de STX5 et le RE/golgi en utilisant en plus des marqueurs spécifiques pour ces organelles. Additionnellement, si la technologie ImageStreamX était utilisée, ces données seraient d'autant plus précises. Globalement, ces résultats emmènent tout de même des questionnements fort intéressants quant au rôle de GP63 dans l'acquisition de membrane du RE et éclairent un tant soit peu la complexité de l'interaction entre les parasites *Leishmania* et leurs hôtes.

6 CONCLUSION

Ce travail a tout d'abord permis de confirmer ou infirmer l'identification de certains des substrats identifiés de GP63. En effet, les seuls substrats de GP63 que nous avons étudiés qui se sont avérés confirmés sont SHP-1, VAMP8 et Stx5. Il est possible d'observer par Western blot un clivage de ces protéines avec ou sans la présence de la 1,10-Phénanthroline dans le tampon de lyse. Par contre, les profils de clivage étaient beaucoup plus discrets que ce qui avait été rapporté. En comparant avec des lysats provenant de cellules non-infectées et d'autres provenant de cellules infectées par différentes souches de *Leishmania* (*L. major* sauvage, *L. major* Δ gp63 et *L. major* Δ gp63+GP63), il a été possible de confirmer que ces clivages étaient bel et bien GP63-dépendants. Toutes les autres protéines évaluées, soient PTP-PEST, mTOR, p65relA, C-Jun, VAMP3, et NLRP3, dans ces mêmes conditions, ne présentaient pas de clivages détectables lors de l'analyse par Western blot lorsque la 1,10-Phénanthroline est présente dans le tampon de lyse lors de l'extraction des protéines. Par contre, nous n'excluons pas la possibilité qu'il y ait un clivage, mais au-delà des limites de détection d'un Western Blot. Ces résultats mettent également en lumière l'importance de ré-évaluer les autres substrats précédemment identifiés par l'entremise d'un Western blot qui n'ont pas été étudiés dans ce projet.

Également, l'importance d'utiliser un inhibiteur de métalloprotéase pour l'extraction de protéines de cellules infectées a été mise en évidence. GP63 n'est pas la seule métalloprotéase dépendante du zinc, il y a également d'autres métalloprotéases, par exemple de la cellule hôte, qui pourraient être toujours actives suite à la lyse et fausser des résultats. Ce n'est pas la première fois que des erreurs de la sorte arrivent, par exemple avec la protéase CPAF de *Chlamydia* (Chen et al. 2012).

Finalement, d'autant plus important, cette étude a permis de mettre les bases afin de commencer à rectifier le rôle de GP63 durant l'infection par *Leishmania*.

7 BIBLIOGRAPHIE

- Akhoundi, M., K. Kuhls, A. Cannet, J. Votypka, P. Marty, P. Delaunay, and D. Sereno. 2016. 'A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies', *PLoS Negl Trop Dis*, 10: e0004349.
- Arango Duque, G., A. Jardim, E. Gagnon, M. Fukuda, and A. Descoteaux. 2019. 'The host cell secretory pathway mediates the export of Leishmania virulence factors out of the parasitophorous vacuole', *PLoS Pathog*, 15: e1007982.
- Bates, P. A. 2007. 'Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies', *Int J Parasitol*, 37: 1097-106.
- Brandt, Warren W., Francis P. Dwyer, and Eleanora C. Gyarfás. 1954. 'Chelate Complexes of 1,10-Phenanthroline and related compounds', *Chemical Reviews*.
- Brittingham, A., C. J. Morrison, W. R. McMaster, B. S. McGwire, K. P. Chang, and D. M. Mosser. 1995. 'Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis', *J Immunol*, 155: 3102-11.
- Button, L. L., D. G. Russell, H. L. Klein, E. Medina-Acosta, R. E. Karess, and W. R. McMaster. 1989. 'Genes encoding the major surface glycoprotein in Leishmania are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed', *Mol Biochem Parasitol*, 32: 271-83.
- Button, L. L., G. Wilson, C. R. Astell, and W. R. McMaster. 1993. 'Recombinant Leishmania surface glycoprotein GP63 is secreted in the baculovirus expression system as a latent metalloproteinase', *Gene*, 134: 75-81.
- Canton, J., and P. E. Kima. 2012. 'Targeting host syntaxin-5 preferentially blocks Leishmania parasitophorous vacuole development in infected cells and limits experimental Leishmania infections', *Am J Pathol*, 181: 1348-55.
- Casgrain, Pierre André, Caroline Martel, W. Robert McMaster, Jeremy C. Mottram, Martin Olivier, and Albert Descoteaux. 2016. 'Cysteine Peptidase B Regulates Leishmania mexicana Virulence through the Modulation of GP63 Expression', *PLoS Pathogens*, 12: 1-17.
- Castro Neto, A. L., Analm Brito, A. M. Rezende, F. B. Magalhaes, and O. P. de Melo Neto. 2019. 'In silico characterization of multiple genes encoding the GP63 virulence protein from Leishmania braziliensis: identification of sources of variation and putative roles in immune evasion', *BMC Genomics*, 20: 118.
- CDC. 2020. 'Leishmaniasis', Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html>.
- Chappuis, F., S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R. W. Peeling, J. Alvar, and M. Boelaert. 2007. 'Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?', *Nat Rev Microbiol*, 5: 873-82.
- Chaudhuri, G., M. Chaudhuri, A. Pan, and K. P. Chang. 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: 7483-9.
- Chen, A. L., K. A. Johnson, J. K. Lee, C. Sutterlin, and M. Tan. 2012. 'CPAF: a Chlamydial protease in search of an authentic substrate', *PLoS Pathog*, 8: e1002842.

- Contreras, I., M. A. Gomez, O. Nguyen, M. T. Shio, R. W. McMaster, and M. Olivier. 2010. 'Leishmania-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63', *PLoS Pathog*, 6: e1001148.
- Corradin, S., J. Mauel, A. Ransijn, C. Sturzinger, and G. Vergeres. 1999. 'Down-regulation of MARCKS-related protein (MRP) in macrophages infected with Leishmania', *J Biol Chem*, 274: 16782-7.
- Corradin, S., A. Ransijn, G. Corradin, M. A. Roggero, A. A. Schmitz, P. Schneider, J. Mauel, and G. Vergeres. 1999. 'MARCKS-related protein (MRP) is a substrate for the Leishmania major surface protease leishmanolysin (gp63)', *J Biol Chem*, 274: 25411-8.
- Cote, J. F., P. L. Chung, J. F. Theberge, M. Halle, S. Spencer, L. A. Lasky, and M. L. Tremblay. 2002. 'PSTPIP is a substrate of PTP-PEST and serves as a scaffold guiding PTP-PEST toward a specific dephosphorylation of WASP', *J Biol Chem*, 277: 2973-86.
- da Silva Vieira, T., G. Arango Duque, K. Ory, C. M. Gontijo, R. P. Soares, and A. Descoteaux. 2019. 'Leishmania braziliensis: Strain-Specific Modulation of Phagosome Maturation', *Front Cell Infect Microbiol*, 9: 319.
- de Chaumont, F., S. Dallongeville, N. Chenouard, N. Herve, S. Pop, T. Provoost, V. Meas-Yedid, P. Pankajakshan, T. Lecomte, Y. Le Montagner, T. Lagache, A. Dufour, and J. C. Olivo-Marin. 2012. 'Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research', *Nat Methods*, 9: 690-6.
- de Jesus, J. R., A. Z. B. Aragao, M. A. Z. Arruda, and C. H. I. Ramos. 2019. 'Optimization of a Methodology for Quantification and Removal of Zinc Gives Insights Into the Effect of This Metal on the Stability and Function of the Zinc-Binding Co-chaperone Ydj1', *Front Chem*, 7: 416.
- Descoteaux, A., N. Moradin, and G. Arango Duque. 2013. 'Leishmania dices away cholesterol for survival', *Cell Host Microbe*, 13: 245-7.
- Dingjan, I., L. M. Paardekooper, D. R. J. Verboogen, G. F. von Mollard, M. Ter Beest, and G. van den Bogaart. 2017. 'VAMP8-mediated NOX2 recruitment to endosomes is necessary for antigen release', *Eur J Cell Biol*, 96: 705-14.
- Eiras, D. P., L. A. Kirkman, and H. W. Murray. 2015. 'Cutaneous Leishmaniasis: Current Treatment Practices in the USA for Returning Travelers', *Curr Treat Options Infect Dis*, 7: 52-62.
- Ellis, M., D. K. Sharma, J. D. Hilley, G. H. Coombs, and J. C. Mottram. 2002. 'Processing and trafficking of Leishmania mexicana GP63. Analysis using GP18 mutants deficient in glycosylphosphatidylinositol protein anchoring', *J Biol Chem*, 277: 27968-74.
- Felber, J. P., T. L. Coombs, and B. L. Vallee. 1962. 'The mechanism of inhibition of carboxypeptidase A by 1,10-phenanthroline', *Biochemistry*, 1: 231-8.
- Garton, A. J., A. J. Flint, and N. K. Tonks. 1996. 'Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST', *Mol Cell Biol*, 16: 6408-18.
- Ghosh, J., M. Bose, S. Roy, and S. N. Bhattacharyya. 2013. 'Leishmania donovani targets Dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection', *Cell Host Microbe*, 13: 277-88.
- Gomez, C. P., M. Tiemi Shio, P. Duplay, M. Olivier, and A. Descoteaux. 2012. 'The protein tyrosine phosphatase SHP-1 regulates phagolysosome biogenesis', *J Immunol*, 189: 2203-10.

- Gomez, M. A., I. Contreras, M. Halle, M. L. Tremblay, R. W. McMaster, and M. Olivier. 2009. 'Leishmania GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases', *Sci Signal*, 2: ra58.
- Gomez, M. A., and M. Olivier. 2010. 'Proteases and phosphatases during Leishmania-macrophage interaction: paving the road for pathogenesis', *Virulence*, 1: 314-8.
- Gregory, D. J., M. Godbout, I. Contreras, G. Forget, and M. Olivier. 2008. 'A novel form of NF-kappaB is induced by Leishmania infection: involvement in macrophage gene expression', *Eur J Immunol*, 38: 1071-81.
- Guy, R. A., and M. Belosevic. 1993. 'Comparison of receptors required for entry of Leishmania major amastigotes into macrophages', *Infect Immun*, 61: 1553-8.
- Halle, M., M. A. Gomez, M. Stuiblé, H. Shimizu, W. R. McMaster, M. Olivier, and M. L. Tremblay. 2009. 'The Leishmania surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation', *J Biol Chem*, 284: 6893-908.
- Halle, M., Y. C. Liu, S. Hardy, J. F. Theberge, C. Blanchetot, A. Bourdeau, T. C. Meng, and M. L. Tremblay. 2007. 'Caspase-3 regulates catalytic activity and scaffolding functions of the protein tyrosine phosphatase PEST, a novel modulator of the apoptotic response', *Mol Cell Biol*, 27: 1172-90.
- Hui, N., N. Nakamura, B. Sonnichsen, D. T. Shima, T. Nilsson, and G. Warren. 1997. 'An isoform of the Golgi t-SNARE, syntaxin 5, with an endoplasmic reticulum retrieval signal', *Mol Biol Cell*, 8: 1777-87.
- Inbar, E., V. K. Hughitt, L. A. Dillon, K. Ghosh, N. M. El-Sayed, and D. L. Sacks. 2017. 'The Transcriptome of Leishmania major Developmental Stages in Their Natural Sand Fly Vector', *mBio*, 8.
- Inceboz, Tonay. 2019. 'Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis, Current Topics in Neglected Tropical Diseases.' in Alfonso J. Rodriguez-Morales (ed.), *Current Topics in Neglected Tropical Diseases*.
- Isnard, A., M. T. Shio, and M. Olivier. 2012. 'Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling', *Front Cell Infect Microbiol*, 2: 72.
- Jaramillo, M., M. A. Gomez, O. Larsson, M. T. Shio, I. Topisirovic, I. Contreras, R. Luxenburg, A. Rosenfeld, R. Colina, R. W. McMaster, M. Olivier, M. Costa-Mattioli, and N. Sonenberg. 2011. 'Leishmania repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection', *Cell Host Microbe*, 9: 331-41.
- Joshi, P. B., B. L. Kelly, S. Kamhawi, D. L. Sacks, and W. R. McMaster. 2002. 'Targeted gene deletion in Leishmania major identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor', *Mol Biochem Parasitol*, 120: 33-40.
- Joshi, P. B., D. L. Sacks, G. Modi, and W. R. McMaster. 1998. 'Targeted gene deletion of Leishmania major genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63)', *Mol Microbiol*, 27: 519-30.
- Joshi, P. B., J. R. Webb, J. E. Davies, and W. R. McMaster. 1995. 'The gene encoding streptothricin acetyltransferase (sat) as a selectable marker for Leishmania expression vectors', *Gene*, 156: 145-9.
- Kima, P. E., S. L. Constant, L. Hannum, M. Colmenares, K. S. Lee, A. M. Haberman, M. J. Shlomchik, and D. McMahon-Pratt. 2000. 'Internalization of Leishmania mexicana

- complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis', *J Exp Med*, 191: 1063-8.
- Linders, P. T., C. V. Horst, M. T. Beest, and G. van den Bogaart. 2019. 'Stx5-Mediated ER-Golgi Transport in Mammals and Yeast', *Cells*, 8.
- Macdonald, M. H., C. J. Morrison, and W. R. McMaster. 1995. 'Analysis of the active site and activation mechanism of the Leishmania surface metalloproteinase GP63', *Biochim Biophys Acta*, 1253: 199-207.
- Matheoud, D., N. Moradin, A. Bellemare-Pelletier, M. T. Shio, W. J. Hong, M. Olivier, E. Gagnon, M. Desjardins, and A. Descoteaux. 2013. 'Leishmania evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8', *Cell Host Microbe*, 14: 15-25.
- Matte, C., P. A. Casgrain, O. Seguin, N. Moradin, W. J. Hong, and A. Descoteaux. 2016. 'Leishmania major Promastigotes Evade LC3-Associated Phagocytosis through the Action of GP63', *PLoS Pathog*, 12: e1005690.
- Matte, C., and A. Descoteaux. 2016. 'Exploitation of the Host Cell Membrane Fusion Machinery by Leishmania Is Part of the Infection Process', *PLoS Pathog*, 12: e1005962.
- Matte, Christine, Pierre André Casgrain, Olivier Séguin, Neda Moradin, Wan Jin Hong, and Albert Descoteaux. 2016. 'Leishmania major Promastigotes Evade LC3-Associated Phagocytosis through the Action of GP63', *PLoS Pathogens*, 12: 1-17.
- McGwire, B. S., and K. P. Chang. 1996. 'Posttranslational regulation of a Leishmania HEXXH metalloprotease (gp63). The effects of site-specific mutagenesis of catalytic, zinc binding, N-glycosylation, and glycosyl phosphatidylinositol addition sites on N-terminal end cleavage, intracellular stability, and extracellular exit', *J Biol Chem*, 271: 7903-9.
- McGwire, B. S., W. A. O'Connell, K. P. Chang, and D. M. Engman. 2002. 'Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked Leishmania surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence', *J Biol Chem*, 277: 8802-9.
- Medina-Acosta, E., S. M. Beverley, and D. G. Russell. 1993. 'Evolution and expression of the Leishmania surface proteinase (gp63) gene locus', *Infect Agents Dis*, 2: 25-34.
- Merck. 1989. *Phenanthrene - The Merck Index An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals* (Rahway, Merck and Co).
- Mosser, D. M., and P. J. Edelson. 1985. 'The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of Leishmania promastigotes', *J Immunol*, 135: 2785-9.
- Olivier, M., V. D. Atayde, A. Isnard, K. Hassani, and M. T. Shio. 2012. 'Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63', *Microbes Infect*, 14: 1377-89.
- Podinovskaia, M., and A. Descoteaux. 2015. 'Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction', *Future Microbiol*, 10: 111-29.
- Rogers, M. E., T. Ilg, A. V. Nikolaev, M. A. Ferguson, and P. A. Bates. 2004. 'Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG', *Nature*, 430: 463-7.
- Roque, A. L., and A. M. Jansen. 2014. 'Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas', *Int J Parasitol Parasites Wildl*, 3: 251-62.

- Rosenzweig, D., D. Smith, F. Opperdoes, S. Stern, R. W. Olafson, and D. Zilberstein. 2008. 'Retooling Leishmania metabolism: from sand fly gut to human macrophage', *FASEB J*, 22: 590-602.
- Russell, D. G., and S. D. Wright. 1988. 'Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of Leishmania promastigotes', *J Exp Med*, 168: 279-92.
- Sacks, D., and S. Kamhawi. 2001. 'Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis', *Annu Rev Microbiol*, 55: 453-83.
- Sammes, Peter G., and Gokhan Yahioglu. 1994. '1,10-Phenanthroline: a versatile ligand', *Chemical Society Reviews*.
- Schlagenhauf, E., R. Etges, and P. Metcalf. 1998. 'The crystal structure of the Leishmania major surface proteinase leishmanolysin (gp63)', *Structure*, 6: 1035-46.
- Shio, M. T., J. G. Christian, J. Y. Jung, K. P. Chang, and M. Olivier. 2015. 'PKC/ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation Is Attenuated by Leishmania Zinc-Metalloprotease during Infection', *PLoS Negl Trop Dis*, 9: e0003868.
- Silverman, J. M., J. Clos, C. C. de'Oliveira, O. Shirvani, Y. Fang, C. Wang, L. J. Foster, and N. E. Reiner. 2010. 'An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from Leishmania and communication with macrophages', *J Cell Sci*, 123: 842-52.
- Steinkraus, H. B., J. M. Greer, D. C. Stephenson, and P. J. Langer. 1993. 'Sequence heterogeneity and polymorphic gene arrangements of the Leishmania guyanensis gp63 genes', *Mol Biochem Parasitol*, 62: 173-85.
- Torres-Guerrero, E., M. R. Quintanilla-Cedillo, J. Ruiz-Esmenjaud, and R. Arenas. 2017. 'Leishmaniasis: a review', *F1000Res*, 6: 750.
- Vallee, B. L., and D. S. Auld. 1990. 'Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins', *Biochemistry*, 29: 5647-59.
- Voth, B. R., B. L. Kelly, P. B. Joshi, A. C. Ivens, and W. R. McMaster. 1998. 'Differentially expressed Leishmania major gp63 genes encode cell surface leishmanolysin with distinct signals for glycosylphosphatidylinositol attachment', *Mol Biochem Parasitol*, 93: 31-41.
- Webb, J. R., L. L. Button, and W. R. McMaster. 1991. 'Heterogeneity of the genes encoding the major surface glycoprotein of Leishmania donovani', *Mol Biochem Parasitol*, 48: 173-84.
- WHO. 2021. 'Leishmaniasis', World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
- Yao, C., K. G. Leidal, A. Brittingham, D. E. Tarr, J. E. Donelson, and M. E. Wilson. 2002. 'Biosynthesis of the major surface protease GP63 of Leishmania chagasi', *Mol Biochem Parasitol*, 121: 119-28.
- Yao, Chaoqun, John E. Donelson, and Mary E. Wilson. 2003. 'The major surface protease (MSP or GP63) of Leishmania sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 132: 1-16.