

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

21/02/2020

Impact de la cystéine peptidase B sur la présentation antigénique croisée de *Leishmania mexicana* par les cellules dendritiques

Par :

Kevin Otis

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

Jury d'évaluation

Président du Jury : M. Alain Lamarre, Ph. D.
INRS-Armand Frappier Santé et Biotechnologie

Examineur externe : M. Jérôme Estaquier, Ph. D.
Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL)

Directeur de recherche : M. Albert Descoteaux, Ph. D.
INRS-Armand Frappier Santé et Biotechnologie

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

21/02/2020

**Impact de la cystéine peptidase B sur la présentation antigénique
croisée de *Leishmania mexicana* par les cellules dendritiques**

Par :

Kevin Otis

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

Jury d'évaluation

<u>Président du Jury :</u>	M. Alain Lamarre, Ph. D. INRS-Armand Frappier Santé et Biotechnologie
<u>Examineur externe :</u>	M. Jérôme Estaquier, Ph. D. Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL)
<u>Directeur de recherche :</u>	M. Albert Descoteaux, Ph. D. INRS-Armand Frappier Santé et Biotechnologie

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur Albert Descoteaux qui m'a donné l'occasion d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire. Cette expérience m'a permis d'apprendre de nombreuses techniques, approfondir mes connaissances sur le système immunitaire, mais aussi de faire l'expérience de multiples congrès dont un à l'international. En plus de cela, je tiens à le remercier de m'avoir fait confiance pour gérer l'inventaire du laboratoire pendant plus de deux ans, ce fut une expérience très enrichissante.

Je tiens bien sûr à remercier Linh, Jessy, Aymeric, Annie, Diana Matheoud et la professeure Simona Stäger sans qui je n'aurais pas pu accomplir toutes les expériences que j'ai eu à faire durant ma maîtrise.

La maîtrise c'est beaucoup de travail personnel et solitaire à faire nos expériences, mais c'est aussi essentiel d'être bien entouré. J'ai eu la chance d'être entouré de merveilleuses personnes comme Christine avec qui j'ai passé d'innombrables moments inoubliables et qui répondait à toutes mes questions même si je n'écoutais pas toujours les réponses qu'elle me donnait et Anne-Marie qui a été malheureusement présente peu de temps mais avec qui j'ai passé plusieurs longues journées d'infection à parler, abuser de nourriture et répondre à ses questions farfelues. Il y a aussi eu Renaud, Olivier et Roman avec qui j'ai pu partager ma passion des jeux, animes et pleins d'autres sujets « geek » pur et dur. Sans oublier toutes les autres personnes avec qui j'ai eu la chance de partager de nombreux moments pendant le temps que j'ai passé au laboratoire.

Effectuer une maîtrise est un long processus qui débute longtemps avant l'arrivée dans un laboratoire et qui n'aurait pas été possible sans le soutien de ma famille dont ma mère qui se mélange à chaque fois qu'elle essaie de décrire ce que je fais dans la vie, en passant par la physique à travailler avec des « bibittes ». Merci de m'avoir encouragé alors que tu n'avais aucun intérêt en science, tu savais que c'était ce que je voulais faire et tu as continué à me pousser à continuer.

RÉSUMÉ

Le parasite *Leishmania*, l'agent causal de la leishmaniose, est capable de survivre et proliférer à l'intérieur des phagocytes comme les macrophages en modifiant le phagosome initial en vacuole parasitophore. Celles-ci peuvent être individuelles ou communales. Les mécanismes causant ces modifications varient selon l'espèce et affectent plusieurs fonctions de la cellule comme la présentation antigénique croisée. En effet, il a été démontré que les souches individuelles étaient capables de l'inhiber. Nous voulions donc savoir si les espèces communales inhibaient aussi cette fonction et si la cystéine peptidase B (CPB) était impliquée. Les résultats obtenus nous ont permis de déterminer que *L. mexicana* était capable d'inhiber cette fonction, mais seulement après 48h d'infection contrairement à *L. major* qui est capable de l'inhiber dès 6h post-infection. Nous avons aussi démontré que la réduction de la présentation n'était pas causée par une diminution de la présence du CMH à la surface. Finalement, nous avons pu démontrer que CPB n'était pas impliquée dans l'inhibition de la présentation puisqu'en absence de la cystéine peptidase B, les mêmes effets étaient observables au niveau de la cellule entière et au niveau des protéines du parasite. Il serait donc intéressant de poursuivre les expériences afin de trouver quel mécanisme est impliqué.

ABSTRACT :

The parasite *Leishmania*, the causal agent of leishmaniasis, can survive and proliferate inside phagocytes such as macrophages by modifying the initial phagosome into a parasitophorous vacuole. These can be individual or communal. The mechanisms causing those changes vary with the strain involved and affect several cell functions such as antigen cross-presentation. Indeed, it has been shown that individual strains were able to inhibit it. We wanted to know if the communal strains were also able to inhibit this function and whether cysteine peptidase B (CPB) was involved. The results obtained allowed us to determine that *L. mexicana* was able to inhibit this function, but only after 48h of infection unlike *L. major* which can inhibit it as early as 6h post-infection. We also demonstrated that the reduction in presentation was not caused by a decrease in the presence of MHC at the surface. Finally, we were able to demonstrate that CPB was not involved in the inhibition of the presentation since in the absence of the cysteine peptidase B, the same effects were observable in the experience with the whole cell and at the level of parasite proteins. It would be interesting to continue the experiments to find out what mechanism is involved.

TABLE DES MATIÈRES :

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	IV
ABSTRACT :	V
TABLE DES MATIÈRES :	VII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS :	XI
INTRODUCTION	1
SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	3
CHAPITRE 1 : LA RÉPONSE IMMUNITAIRE	5
1.1 LE SYSTÈME IMMUNITAIRE	5
1.2 LES CELLULES DENDRITIQUES	6
1.3 LA PHAGOCYTOSE	10
1.4 LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE	15
1.5 LES LYMPHOCYTES T	20
CHAPITRE 2 : <i>LEISHMANIA</i>	25
2.1 LA LEISHMANIOSE	25
2.2 LE CYCLE DE VIE DU PARASITE	26
2.3 LES DIVERSES FORMES DU PARASITE	28
2.4 LES FACTEURS DE VIRULENCE PRINCIPAUX DU PARASITE	28
2.4.1 <i>LPG</i>	28
2.4.2 <i>GP63</i> :	29
2.4.3 <i>CPB</i> :	31
CHAPITRE 3 : INTERACTIONS HÔTE – AGENT PATHOGÈNE.....	33
3.1 L'ENTRÉE DU PARASITE DANS L'HÔTE.....	33
3.2 LA FORMATION DE LA VACUOLE PARASITOPHORE	35
3.3 MODIFICATION DES CYTOKINES	37

3.4 MODIFICATION DE LA RÉPONSE ADAPTATIVE	37
SECTION 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	39
ÉTHIQUE DE PRATIQUE	41
ANTICORPS.....	41
CONSTRUCTION ET PURIFICATION DE PLASMIDE	41
CULTURE CELLULAIRE	42
ISOLATION DE CELLULES T CD8+	43
ÉLECTROPORATION.....	43
SURVIE CELLULAIRE	44
MARQUAGE GIEMSA	45
PRÉPARATION DE BILLES DE POLYSTYRÈNE	45
PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE CROISÉE PAR COLORIMÉTRIE	46
PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE CROISÉE AVEC CELLULES OT-I	47
MARQUAGE POUR CYTOMÉTRIE EN FLUX.....	48
LYSE CELLULAIRE ET DOSAGE DE PROTÉINE.....	48
ÉLECTROPHORÈSE ET WESTERN BLOT	49
ANALYSES STATISTIQUES :	49
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS	51
4- DISCUSSION	63
5- CONCLUSION.....	69
RÉFÉRENCES	71

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1: DIFFÉRENCIATION DES CELLULES PHAGOCYTAIRES MONONUCLÉAIRES	6
FIGURE 1.2: LA PHAGOCYTOSE D'UN MICROORGANISME.....	14
FIGURE 1.3: PRÉSENTATION D'ANTIGÈNE PAR LE CMH-I.....	16
FIGURE 1.4: PRÉSENTATION D'ANTIGÈNE PAR LE CMH-II.....	17
FIGURE 1.5: LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE CROISÉE PEUT UTILISER DEUX VOIES POSSIBLES	19
FIGURE 1.6: DIFFÉRENCIATION DES CELLULES T DANS LE THYMUS.....	21
FIGURE 1.7: CYCLES CELLULAIRES DU PARASITE <i>LEISHMANIA</i>	27
FIGURE 1.8: LE PROMASTIGOTE MODIFIE L'ENVIRONNEMENT DU PHAGOSOME.....	36
FIGURE 1.9: TABLEAU RÉSUMÉ DES DIFFÉRENTES FONCTIONS DES FACTEURS DE VIRULENCE DU PARASITE	38
FIGURE 2.2: MODÈLE D'INFECTION <i>IN-VITRO</i> POUR LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE CROISÉE.....	47
FIGURE 3.1 : SURVIE DES DIFFÉRENTES SOUCHES DE <i>LEISHMANIA MEXICANA</i> DANS LES CELLULES DENDRITIQUES	53
FIGURE 3.2 : FORMATION DES VACUOLES PAR LES PARASITES DANS LES CELLULES DENDRITIQUES.....	55
FIGURE 3.3 : L'INHIBITION DE LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE CROISÉE PAR <i>L. MEXICANA</i> N'EST PAS CPB DÉPENDANTE	56
FIGURE 3.4 : <i>LEISHMANIA</i> NE DIMINUE PAS LA PRÉSENCE DU CMH-I À LA SURFACE DE LA CELLULE.....	58
FIGURE 3.5 : CONFIRMATION DE L'EXPRESSION D'OVALBUMINE PAR LES DIFFÉRENTS MUTANTS DE <i>LEISHMANIA</i>	60
FIGURE 3.6 : CPB N'A PAS D'EFFET SUR LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE CROISÉE DES PROTÉINES DU PARASITE	61

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 2.1: CONCENTRATION D'ANTIBIOTIQUE UTILISÉE LORS DE LA CULTURE DES PARASITES	42
TABLEAU 2.2: CONCENTRATION D'ANTIBIOTIQUE UTILISÉE POUR SÉLECTIONNER LES PARASITES OVA.....	44

LISTE DES ABRÉVIATIONS :

4E-BP1: Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) -binding protein 1

ABC: ATP-Binding Cassette transporter

ADN : acide désoxyribonucléique

AP-1 : Activator protein 1

APC : cellules présentatrices d'antigènes

ARF: tumor suppressor alternative reading frame

ARN : acide ribonucléique

BMDC : cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse

CAM : complexe d'attaque membranaire

Cat S: cathepsin S

CCPA: Conseil Canadien de Protection des Animaux

CD: cluster of differentiation

cDC : cellules dendritiques conventionnelles

CDC : progéniteur commun de cellules dendritiques

Cdc42: Cell division control protein 42 homolog

CLIP: Class II-associated invariant chain peptide

CLP: progéniteur des lymphoïdes communs

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CO₂: dioxyde de carbone

COP1: Coat protein 1

CP: Cystéine protéase

CPA : Cystéine protéase A

CPB: Cystéine protéase B

CPC: Cystéine protéase C

CPRG: Chlorophenol Red- β -D-galactopyranoside

CR : récepteur du complément

DN : doubles négatives

DNGR-1: dendritic cell NK lectin group receptor-1

DP: doubles positives

DTT: Dithiothréitol

ECL: Enhanced chemiluminescence

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EEA1 : early endosome antigen 1

ER : réticulum endoplasmique

ERAP : ER Aminopeptidase-1

ETP : progéniteurs thymiques précoces

FACS : fluorescence-activated cell sorting

FcR: récepteur de la fraction constante des anticorps

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GP63: Glycoprotéine 63

GPI: Glycosylphosphatidylinositol

GTP: Guanosine triphosphate

HLA: human leucocyte antigen

HRP: Horeseradish peroxidase

HSC: cellules souches hématopoïétiques

ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1

IFN : interféron

Ig: immunoglobuline

IL : interleukine

ISP : inhibiteur de la sérine peptidase

ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motifs

iTreg: cellules T régulatrice induites

JAK : Janus kinase

KMP-11: protéine membranaire kinetoplastide 11

L. major: *Leishmania major*

L. mexicana: *Leishmania mexicana*

LAMP: lysosome-associated membrane proteins

LAT: linker for activation of T cell

LCK: lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

LPG: lipophosphoglycan

LPS: lipopolysaccharide

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MDP : progéniteur macrophage/dendritique

MFI : intensité moyenne de fluorescence

MIIC: MHC class II compartment

MR: récepteur au mannose

MSPC: Major surface protein constitutively

MSPL: Major surface protein Logarithmique

MSPS: Major surface protein Stationary

mTEC : cellules épithéliales de la médulla du thymus

mTOR: Mammalian target of rapamycin

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NETs: neutrophil extracellular traps

NFAT: Nuclear factor of activated T-cells

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

NK: cellules Natural Killer

NOX2: NAPDH oxydase 2

PAC : présentation antigénique croisée

PAMPs: pathogen associated molecular patterns

PBS: Phosphate-buffered salin

PCR: réaction de polymérase en chaîne

PD-1: Programmed cell death protein 1

pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes

PFA: paraformaldéhyde

PI3P: phosphatidylinositol 3-phosphate

PLC: complexe de chargement peptidique

PS: phosphatidylsérine

PTP : protéines tyrosines phosphatases

PV: vacuole parasitophore

RAG: Recombination activating gene

RILP: Rab-interacting lysosomal protein

RNS : réactifs dérivés de l'azote

ROS: réactifs dérivés de l'oxygène

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SEM: Standard error of the mean

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

SIDA: syndrome d'immunodéficience acquise

SLAM: Signaling lymphocytic activation molecule

SNAREs: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor

SP: single positive

SRA-1: class A macrophage scavenger receptor

STAT: Signal transducer and activator of transcription

SVF: sérum de veau foetal

TAP: Transporter associated with Antigen Processing

TBS: Tris-buffered saline

TcR: T cells receptor

TGF- β : Transforming growth factor beta

Th: T helper

TLR: Toll-like receptors

TNF: tumor necrosis factor

Treg: cellules T régulatrices

UTR: Untranslated region

VAMP: Vesicle-associated membrane protein

V-ATPase: ATP-dependent vacuolar proton pump

VIH: virus d'immunodéficience humaine

INTRODUCTION

La Leishmaniose est une maladie endémique dans plus de 97 pays et causant de 20 000 à 30 000 morts à chaque année, principalement dans les pays en développement. Cette maladie, causée par le parasite *Leishmania spp*, peut être présente sous différentes formes selon l'espèce de parasite impliquée. En effet, les symptômes peuvent être présents sous forme de lésions cutanées, de destruction des muqueuses ou sous forme viscérale affectant le foie, la rate, les ganglions et la moelle osseuse. C'est principalement cette dernière forme qui est mortelle. Le parasite, suite à son inoculation par la mouche des sables, va infecter diverses cellules dans son hôte mammifère, mais principalement les phagocytes tels que les macrophages. Une fois entré dans ces cellules, certaines espèces de parasite comme *L. major* et *L. donovani* vont former des vacuoles parasitophores dites étroites et individuelles en modifiant la structure du phagosome principalement grâce à leur LPG et GP63, ce qui va empêcher la fusion du phagosome avec les endosomes et les lysosomes permettant au parasite de survivre et se multiplier. D'autres parasites, au lieu de former de petites vacuoles, vont plutôt activement fusionner leur phagosome avec les différents endosomes, lysosomes et membranes provenant du golgi et du RE de la cellule en modifiant l'action des SNAREs. Ces vacuoles sont dites vastes et communales. C'est le cas des parasites *L. mexicana* et *L. amazonensis*. Contrairement aux mécanismes impliqués dans la formation des vacuoles individuelles, ceux des vacuoles communales sont beaucoup moins bien compris, mais nécessiteraient aussi la présence de GP63 et du LPG. Dans le cas de *L. mexicana*, il a été démontré que la présence de CPB était aussi essentielle afin d'établir une infection efficace *in vivo* puisque lorsqu'une souche déficiente pour cette cystéine était utilisée, les lésions formées étaient plus petites et perduraient moins longtemps avant de se résorber. D'autres études ont démontré que la présentation antigénique croisée lors d'une infection avec les parasites *L. major* et *L. donovani* était inhibée, et ce, de manière GP63-dépendante. Ce mécanisme est important afin d'induire une réponse T cytotoxique efficace lors d'une infection puisqu'elle permet aux phagocytes de préparer les cellules T CD8 naïves et leur permet de reconnaître les cellules infectées. Cependant, aucune étude sur la présentation antigénique croisée n'a été effectuée avec des espèces de parasite formant des vacuoles communales. Nous voulions donc observer si les parasites formant ces vacuoles étaient capables d'inhiber la présentation antigénique croisée comme les espèces individuelles. En plus de cela, nous voulions savoir si la cystéine peptidase B était impliquée dans cette possible inhibition.

SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE 1 : LA RÉPONSE IMMUNITAIRE

1.1 Le système immunitaire

Le système immunitaire humain est un système très complexe avec des implications multiples entre autres dans le développement tissulaire normal, la défense contre les agents pathogènes (virus, bactéries, parasites, mycètes) ainsi que la protection contre les cellules cancéreuses. Il s'est développé tranquillement au cours de l'évolution jusqu'à former le système complexe que nous connaissons aujourd'hui. Il peut se séparer en deux grandes catégories : l'immunité innée et l'immunité adaptative.(Yatim & Lakkis, 2015)

La première est composée de mécanismes actifs et passifs comme les cellules épithéliales, le mucus, les cellules phagocytaires (macrophages, monocytes, cellules dendritiques), les cellules NK (Natural Killer), les granulocytes (basophile, éosinophile et neutrophile), le système du complément ainsi que certains anticorps naturels.(Hato & Dagher, 2015) Cette réponse est rapidement activée en présence de signaux de dangers ou d'agents pathogènes et est considérée comme étant non-spécifique puisqu'elle dépend du genre du microorganisme (viral, bactérie Gram positive ou négative, helminthe ...), mais n'est pas spécifique à l'espèce.

La deuxième catégorie du système immunitaire est composée principalement des cellules B et des cellules T ainsi que leurs effecteurs tels que les anticorps produits par les premières. Cette réponse est beaucoup plus précise puisqu'elle est spécifique à un antigène donné. Cette spécificité dépend des différents récepteurs présents à la surface des cellules B et T qui sont acquis aléatoirement durant la maturation de ces cellules. Cependant, afin que la réponse adaptative s'active, celle-ci doit d'abord être induite par la réponse innée dans la majorité des situations ce qui se fait entre autres grâce à la présentation antigénique par les cellules dendritiques.(Iwasaki & Medzhitov, 2015) Suite à cette activation, les cellules possédant les bons récepteurs vont proliférer afin d'induire une réponse assez forte puisque seulement quelques cellules ont les bons récepteurs pour l'antigène ciblé. Suite à la période de prolifération, la majorité des cellules effectrices vont mourir, mais une partie de ces cellules vont plutôt devenir des cellules mémoires. Ces dernières vont permettre d'avoir une réponse plus rapide et plus efficace lors d'une infection subséquente. (Chaplin, 2010)

1.2 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules possédant un rôle essentiel dans la tolérance immunitaire, dans la reconnaissance des agents pathogènes ainsi que dans la transition entre l'immunité innée et acquise entre autres grâce à leur capacité à effectuer la présentation antigénique (Waisman *et al.*, 2017). Ces cellules ont été découvertes par Ralph Steinman en 1973 et font partie de la famille des phagocytes mononucléaires. Cette famille de cellules découle des progéniteurs macrophages/dendritiques (MDP) qui sont localisés dans la moelle osseuse. (Geissmann *et al.*, 2010) Ces MDP se différencient ensuite en progéniteur commun de cellules dendritiques (CDP) qui vont pouvoir former les dendritiques plasmacytoides (pDC) et les progéniteurs pré dendritiques. Ces derniers vont migrer vers les tissus et organes lymphoïdes où ils vont terminer leur différenciation et former les cellules dendritiques conventionnelles (cDC). Les pDC vont plutôt compléter leur maturation dans la moelle osseuse avant d'aller dans la circulation sanguine où ils vont pouvoir effectuer leur rôle. Les cellules dendritiques sont séparées en nombreux sous-groupes selon leur localisation, leurs rôles et les différents marqueurs à leur surface. Elles sont présentes dans la majorité des tissus et il est estimé qu'environ 2 à 4% des leucocytes totaux sont des cellules dendritiques. (Waisman *et al.*, 2017)

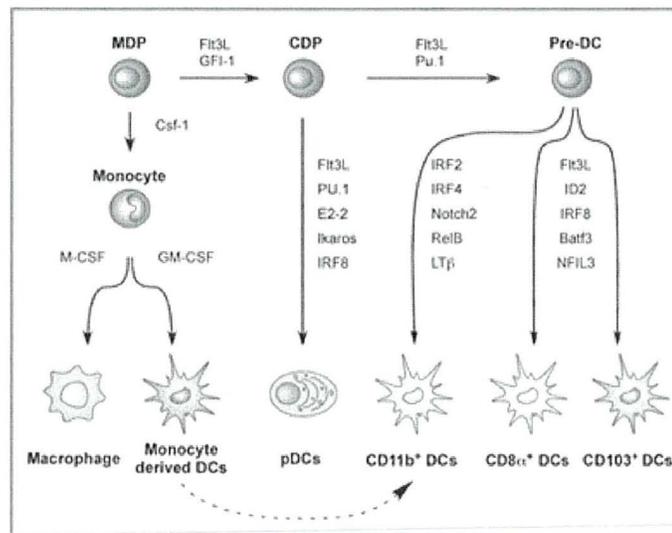


Figure 1.1: Différenciation des cellules phagocytaires mononucléaires

Les progéniteurs macrophages/dendritiques se différencient en différents sous-groupes de cellules dendritiques selon les récepteurs et les molécules de différenciations présentes (Waisman *et al.*, 2017)

Comme mentionné, les cellules dendritiques sont séparées en deux groupes principaux, les conventionnelles et les plasmacytoïdes. Dans le cas des pDC, elles sont définies par les marqueurs de surface CD11c^{low} MHC-II^{low} B220+ PDCA-1⁺ Siglec-H⁺. Elles ne sont pas très efficaces pour effectuer la présentation antigénique et sont plutôt spécialisées dans la sécrétion d'interféron de type 1 (IFN type 1) lors des infections virales. Cependant, une fois activée par la présence de microorganismes, ces cellules peuvent induire l'activation des cellules T naïves entraînant la production de cellules T régulatrices (Treg) chez la souris et chez l'humain. (Waisman *et al.*, 2017)

Dans le cas des cDC, trois sous-groupes principaux sont présents selon les marqueurs de surface : les CD8α⁺, les CD103⁺ et les CD11b⁺. Les cellules faisant partie de ces groupes sont toutes considérées comme des cellules présentatrices d'antigènes (APC) très efficaces pour activer les cellules T naïves. Les deux premiers groupes sont surtout impliqués lors d'infection avec des agents pathogènes intracellulaires tandis que le dernier est plus impliqué lors d'infections par des agents pathogènes extracellulaires. La principale différence entre les deux premiers sous-groupes est leur localisation. En effet, les CD8α⁺ sont surtout présentes dans les organes lymphoïdes, tout comme les CD11b⁺, alors que les CD103⁺ sont plus situées dans les tissus. (Waisman *et al.*, 2017)

En plus des pDC et des cDC, un troisième groupe de cellule dendritique a été découvert récemment. Ces cellules sont appelées les cellules dendritiques inflammatoires. Elles sont similaires aux cDC d'un point de vue morphologique, leur capacité migratoire ainsi que dans leur habilité à activer les cellules T. Cependant, elles sont seulement produites en période d'inflammation contrairement aux cDC qui sont produites constitutivement. (Segura & Amigorena, 2013) Ces cellules inflammatoires jouent un rôle important dans l'élimination de certains microorganismes tels que *Listeria monocytogenes*, *Brucella melitenis*, *Leishmania major* et *Trypanosoma brucei* grâce à leur production d'oxyde nitrique et de TNF-α (tumor necrosis factor). (Serbina *et al.*, 2003)

Comme mentionné un peu plus haut, un des rôles principaux des cellules dendritiques est de patrouiller dans les tissus afin de phagocyter les antigènes et les présenter aux cellules T afin d'entraîner leur activation et prolifération. Ce mécanisme est appelé la présentation antigénique et sera expliqué en profondeur un peu plus loin. Afin d'accomplir ce rôle, les cellules dendritiques

passent par deux stades morphologiquement et fonctionnellement différents: immature et mature. Les premières expriment peu les CMH de classe I et II ainsi que les molécules de costimulation telle CD86 à leur surface. Cependant, les molécules de CMH II sont grandement synthétisées pendant ce stade, mais sont séquestrées dans la cellule. Les cellules immatures ont des capacités de phagocytose, micropinocytose et endocytose très élevées ce qui leur permet d'acquérir les antigènes lorsqu'elles sont dans les tissus. Cependant, elles sont peu efficaces pour activer les cellules T naïves. Lorsque ces cellules immatures sont activées par la présence de cytokine inflammatoire (comme l'interleukine-1 et le TNF- α), par la présence de produit provenant de microbes (lipopolysaccharide, ARN double brin, séquence d'ADN CpG non méthylée) activant les TLRs, (Kaisho & Akira, 2001) ou par la liaison du CD40, elles entrent dans un processus de maturation causant plusieurs changements fonctionnels et morphologiques découlant entre autres de l'activation du facteur de transcription NF- κ B et qui se termine par les cellules se dirigeant vers les organelles lymphoïdes afin de présenter ces antigènes aux cellules T.

Cette maturation est caractérisée par une augmentation majeure de la présence de CMH II et des molécules de costimulation à la surface des cellules (Inaba *et al.*, 2000). En effet, dans le cas du CMH II, le nombre de molécules peut augmenter de 20 fois et celles de CD86 de 100 fois. Cependant, cette augmentation n'est pas due à une augmentation dans la synthèse, mais plutôt dans le transport des molécules qui étaient séquestrées vers la membrane. (Mellman & Steinman, 2001) Un des mécanismes proposés implique la régulation de la cystéine protéase cathepsine S (cat S) par l'inhibiteur de protéase cystatine C. Lorsque la cellule est immature, la présence de l'inhibiteur est suffisante pour bloquer l'action de cat S dont le rôle consiste à cliver le fragment lip10, qui contient le signal restreignant le complexe dans les lysosomes, de la chaîne invariable (Ii) du complexe CMH II en CLIP, séquence permettant le transport à la surface de la cellule. Cependant, lors de la maturation, la quantité de l'inhibiteur diminue ce qui permet un meilleur clivage de lip10 en CLIP entraînant l'augmentation de la quantité de complexes du CMH II à la surface de la cellule. (Pierre & Mellman, 1998)

Un autre mécanisme modifié par la maturation des cellules dendritiques est la capacité d'endocytose. Afin de restreindre l'import d'antigène durant le trajet vers les organes lymphoïdes et ainsi limiter les antigènes présentés à ceux se retrouvant dans le lieu où elles ont entamé leur maturation, les cellules dendritiques matures ont une capacité de phagocytose et macropinocytose réduite par rapport aux cellules immatures. Cette diminution serait causée par deux principaux mécanismes. Le premier serait une diminution de l'expression des récepteurs

aux antigènes tels que les FcRs (récepteur de la fraction constante des anticorps), MR (récepteur au mannose), DEC205 et les récepteurs des corps apoptotiques. Le deuxième mécanisme implique Cdc42 qui serait sous-exprimé dans les cellules matures. Il a été démontré qu'en absence de cette petite GTPase, la macropinocytose était inhibée et que lorsqu'on réinjectait cette GTPase dans les cellules matures, il était possible de récupérer les capacités de phagocytose. Il est cependant important de préciser que les cellules matures sont encore capable d'endocytose, mais à des niveaux beaucoup plus faibles que chez les cellules immatures. (Garrett *et al.*, 2000)

Comme mentionné au début de la section, les cellules dendritiques ont aussi un rôle important dans l'établissement de la tolérance immunitaire contre les antigènes du soi. La tolérance consiste à empêcher les cellules T de réagir aux antigènes du soi et ainsi éviter les maladies auto-immunes. Ce processus est divisé en deux, la tolérance centrale et la tolérance périphérique. La première a lieu dans le thymus durant la maturation des cellules T et comprend les sélections positive et négative, qui seront explorées un peu plus loin. Cependant, de nombreux antigènes ne sont pas présents dans le thymus, ces antigènes doivent donc être apportés dans les organes lymphoïdes afin d'être présentés aux cellules. C'est la tolérance périphérique. Ce mécanisme est entre autres dépendant des cellules dendritiques afin de transporter et présenter ces antigènes. Cependant, contrairement à la présentation antigénique normale, le mécanisme de tolérance n'implique pas de cellules dendritiques matures puisqu'il n'y a pas de facteurs d'inflammation ni de «PAMPs» (pathogen associated molecular patterns) qui sont présents. (Waisman *et al.*, 2017) Ces antigènes du soi ou provenant de corps étrangers non pathogènes sont présentés en continu dans les nœuds lymphatiques grâce à l'interaction entre le CMH et le TcR (T cell receptor) en absence de molécule de costimulation. (Scheinecker *et al.*, 2002) Cependant, des études ont démontré que l'ablation des cellules dendritiques ne cause pas une réaction auto-immune instantanée, mais plutôt une dérégulation dans la prolifération des cellules myéloïdes. (Birnberg *et al.*, 2008) Ces résultats indiquent que les cellules dendritiques peuvent induire la tolérance périphérique, mais n'auraient pas un rôle direct essentiel. Cependant, elles seraient essentielles pour induire la génération de cellules T régulatrices induites (iTreg) spécifiques à certains antigènes. (Waisman *et al.*, 2017)

1.3 La phagocytose

La phagocytose est un mécanisme essentiel de l'immunité innée et est effectuée par certaines cellules afin d'ingérer des particules de plus de 0,5µm de diamètre. Ce mécanisme a été découvert vers les années 1880 par Élie Metchnikoff lorsqu'il a observé des cellules spécialisées dans les larves d'étoiles de mer qui attaquaient les débris se trouvant à l'intérieur de ces larves. La phagocytose possède de multiples rôles. Chez les organismes unicellulaires, elle est utilisée entre autres afin de capturer les nutriments dans l'environnement. Pour les organismes multicellulaires, la phagocytose est effectuée par les cellules spécialisées appelées phagocytes. Ces cellules sont importantes pour l'élimination des agents pathogènes, mais aussi pour l'élimination des cellules apoptotiques et nécrotiques, l'inflammation ainsi que dans la réparation et le remodelage des tissus. (Gordon, 2016) Les cellules phagocytaires peuvent être divisées en deux groupes : les phagocytes professionnels et non professionnels. Le premier comprend les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les éosinophiles, les cellules dendritiques ainsi que les ostéoclastes. Elles sont responsables des différents rôles de la phagocytose, c.-à-d. la capture et l'élimination des agents pathogènes ainsi que leur présentation au système immunitaire adaptatif et l'élimination des cellules apoptotiques. Le deuxième groupe est composé des fibroblastes, des cellules épithéliales ainsi que des cellules endothéliales. Ces phagocytes non professionnels ne peuvent pas phagocyter les microorganismes, mais sont importants pour l'élimination des corps apoptotiques. (Rosales & Uribe-Querol, 2017)

La phagocytose peut être divisée en quatre étapes majeures : la reconnaissance des particules à phagocyter, l'internalisation de ces particules, la formation et la maturation du phagosome et l'élimination de la particule ingérée. Ces étapes sont présentes autant dans l'élimination des agents pathogènes que dans l'élimination de cellules apoptotiques et nécrotiques, mais des différences sont présentes, surtout durant l'étape de la reconnaissance des particules.

Afin d'initier la phagocytose, les phagocytes doivent tout d'abord reconnaître les particules à ingérer et être capable de différencier entre les cellules saines et apoptotiques, les bactéries pathogènes et commensales ainsi que les cellules infectées ou non. Cette reconnaissance des particules étrangères dépend principalement de deux familles de récepteurs qui peuvent être chacune divisées en plusieurs classes. La première famille est composée des récepteurs non

opsoniques qui sont capables de reconnaître les motifs sur les cellules et les microorganismes directement. Cette famille comprend CD169 et CD33 qui reconnaissent les lectines, DNGR-1, Dectin-1 qui reconnaît les bêta-glucanes des mycètes ainsi que SR-A qui est capable de reconnaître des ligands polyanioniques présents sur les cellules apoptotiques et sur les microbes. (Canton *et al.*, 2013; Dambuza & Brown, 2015) Les toll-like receptor (TLRs) sont aussi des récepteurs capables de reconnaître directement différents ligands tels que le lipopolysaccharide (LPS), les motifs CpG non méthylés, l'ARN double brin et la flagelline. Cependant, ils ne sont pas considérés comme des récepteurs pour la phagocytose, mais plutôt comme des détecteurs de ces ligands. Ils permettent une meilleure phagocytose lorsqu'ils sont utilisés de concert avec les autres récepteurs non opsoniques. (Kawai & Akira, 2011)

La deuxième famille est composée des récepteurs opsoniques qui reconnaissent les opsonines provenant de l'hôte se liant aux particules étrangères. Plusieurs types d'opsonines sont présents tels que les anticorps, le complément, la fibronectine, les lectines liant le mannose ainsi que les lactadherines. Les deux classes les plus connues et étudiées sont les récepteurs reconnaissant les fractions constantes des anticorps (FcR), plus particulièrement la partie constante des IgG et des IgA, ainsi que les récepteurs reconnaissant le complément (CR), plus particulièrement le CR3 qui reconnaît la fraction iC3b se liant aux particules après l'activation du complément. (Flannagan *et al.*, 2012; van Lookeren Campagne *et al.*, 2007)

Dans le cas des cellules apoptotiques, deux signaux sont utilisés par les cellules afin d'activer la phagocytose. Il y a tout d'abord des molécules solubles qui sont sécrétées telles que les lysophosphatidylcholines et les sphingosine 1-phosphates. Ces molécules agissent en tant qu'agents chimiotactiques pour les phagocytes. (Gordon, 2016) Afin d'identifier les cellules à phagocyter, une fois arrivés au site d'où le signal « find me » était sécrété, les phagocytes vont pouvoir reconnaître les molécules de phosphatidylsérine (PS) à la surface de la cellule directement à l'aide de certains récepteurs comme TIM-1 et BAI-1. (Park *et al.*, 2007) D'autres récepteurs peuvent reconnaître d'autres molécules ou des molécules oxydées de PS comme SR-A et CD36 respectivement. Les PS sont aussi présentes à la surface des cellules saines, cependant, lors de l'apoptose, le nombre de molécules de PS augmente jusqu'à 300 fois, permettant aux phagocytes de cibler les cellules en train de mourir. En plus de cela, afin d'éviter que les phagocytes éliminent les cellules saines, celles-ci expriment un signal inhibant la phagocytose. CD31 et CD47 sont deux molécules ayant ce rôle. La première promeut

le détachement cellulaire alors que la deuxième induit un signal inhibant les changements impliquant l'actine. (Brown *et al.*, 2002; Tsai & Discher, 2008)

Une fois la particule reconnue, celle-ci est endocytée et le phagosome initial est formé. La formation de celui-ci dépend d'une cascade de réactions qui varie selon le récepteur activé. Les deux qui sont les mieux connues sont celles dépendantes des FcR et du CR3. Dans le cas du FcR, l'activation du récepteur cause une agglomération des récepteurs ce qui initie la phosphorylation d'un motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) par des kinases de la famille des Src. La phosphorylation des ITAMs permet de recruter et d'activer la tyrosine kinase SYR qui à son tour va phosphoryler plusieurs substrats.(Daeron, 1997) Cependant, la cascade de réactions exacte n'est pas bien connue. Les protéines Rac sembleraient être impliquées dans la polarisation des filaments d'actine, mais ce sujet est encore source de débat. (Patel *et al.*, 2002)

Une fois la particule ingérée, le phagosome ainsi nouvellement formé entre alors dans l'étape de maturation. Celle-ci peut être divisée en quatre phases où le nouveau phagosome fusionnera avec différents compartiments cellulaires. Ces quatre phases sont la phase précoce, intermédiaire, tardive et le phagolysosome. Durant la phase précoce, le phagosome fusionne activement avec les endosomes précoces, mais pas avec les lysosomes.(Flanagan *et al.*, 2009) Cette fusion est médiée entre autres par la GTPase Rab5a par le recrutement de EEA1 (early endosome antigen 1). Rab5 recrute aussi hvPS34 qui va générer des phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) à la surface du phagosome. Ces lipides vont permettre le recrutement et l'ancrage de plusieurs protéines nécessaires à la maturation du phagosome.(Gutierrez, 2013) Cependant, malgré la fusion du phagosome avec de nombreux endosomes, la taille de la vacuole ne change pas significativement. Ce processus serait dépendant de la capacité du phagosome à recycler des molécules à la surface de la cellule, processus médié par COP1, Arf et les GTPase Rab similaire au mécanisme utilisé par les endosomes précoces.(Botelho *et al.*, 2000) Durant cette étape, l'intérieur du phagosome devient un peu plus acide (pH de 6.1–6.5) grâce au recrutement de V-ATPases (ATP-dependent vacuolar proton pump), mais ce pH n'est pas destructeur.

Par la suite, durant la phase dite intermédiaire, Rab5 est remplacé par Rab7 qui est essentiel à la fusion du phagosome avec les endosomes tardifs.(Rink *et al.*, 2005) Durant cette étape, des vésicules sont formées dans le lumen du phagosome contenant du matériel à dégrader. La formation de ces vésicules est similaire à la formation des corps multivésiculaires.

Une fois les vésicules dans le lumen éliminées, le phagosome entre dans la phase tardive. Durant cette phase, il y a une accumulation de Rab7 à la surface ce qui permet le recrutement de RILP (Rab-interacting lysosomal protein) qui permet la liaison au complexe dynéine-dynactine offrant un meilleur contact avec les microtubules. Ce contact permet de faciliter la fusion avec les endosomes tardifs en rapprochant le phagosome de ceux-ci et permettant aux SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) de terminer la fusion entre les deux, plus particulièrement VAMP 7 et 8 (vesicle-associated membrane protein). (Harrison *et al.*, 2003) Cette phase est aussi caractérisée par une acidification plus grande de la vacuole due à l'accumulation des V-ATPases, le pH se situe donc entre 5,5 et 6,0. (Kinchen & Ravichandran, 2008) En plus de l'accumulation de Rab7 à la surface, la fusion avec les endosomes tardifs permet l'incorporation de LAMP 1 et 2 (lysosome-associated membrane proteins) à la surface de la membrane ainsi que la présence de cathepsines et hydrolases. (Fairn & Grinstein, 2012)

La dernière étape de la maturation du phagosome consiste à sa fusion avec les lysosomes ce qui lui permet d'acquérir la majorité de ces facteurs permettant de dégrader les particules ingérées et de former le phagolysosome. Cette fusion est une fois de plus dépendante de Rab7, mais VAMP 7, VAMP 8, Syntaxine 7 et 8 seraient aussi importantes pour la formation du phagolysosome. (Luzio *et al.*, 2007) Cette phase de la maturation est caractérisée par un pH très acide pouvant être aussi bas que 4,5, une couche interne de la membrane riche en PI3P et une absence du récepteur mannose-6-phosphate. (Griffiths *et al.*, 1988; Kobayashi *et al.*, 1998)

Une fois le phagolysosome formé, il possède de multiples moyens d'éliminer les particules ingérées. Le pH acide est le premier, il permet d'inhiber la croissance bactérienne, d'inhiber certains métabolismes et d'activer certaines enzymes dont le pH optimal est acide. Le phagolysosome contient aussi des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) ainsi que des dérivés réactifs de l'azote (RNS). Ces deux réactifs permettent d'éliminer directement les microorganismes ingérés. En plus de ces composés réactifs, le phagolysosome limite la croissance en utilisant diverses molécules telles que le chélateur lactoferrine qui séquestre le fer utilisé par certaines bactéries. (Flannagan *et al.*, 2009) L'ensemble de ces facteurs permettent d'éliminer la majorité des particules qui sont ingérées par les phagocytes, mais les ratios de chaque molécule varient selon les cellules ce qui fait en sorte que certains phagocytes sont plus efficaces pour éliminer certaines particules.

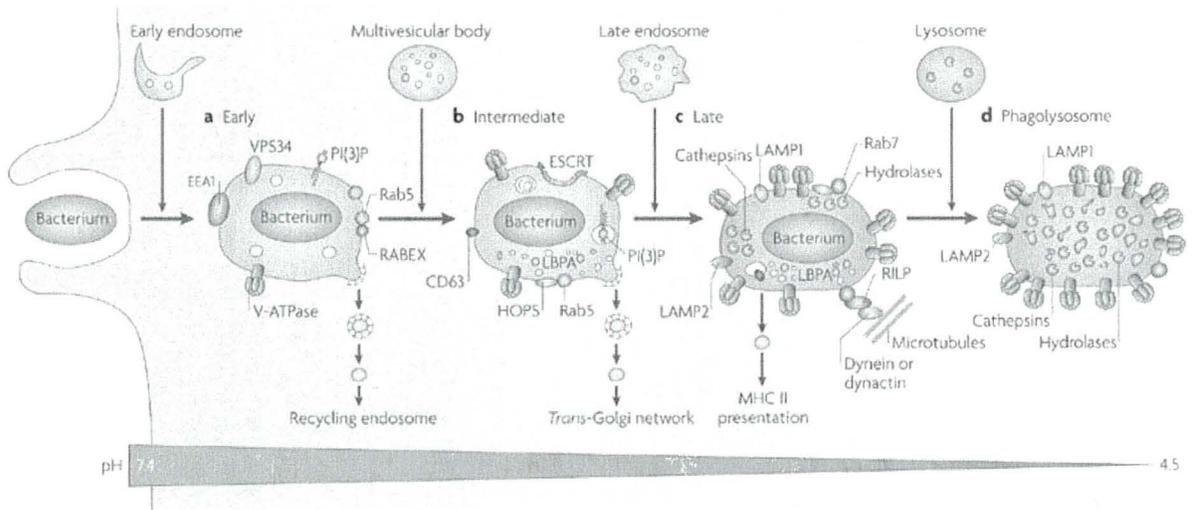


Figure 1.2: La phagocytose d'un microorganisme

Le phagosome initial passe par de nombreuses phases avant d'être apte à éliminer le microorganisme ingéré. (Flanagan et al., 2009)

1.4 La présentation antigénique

La présentation antigénique est le mécanisme permettant aux cellules de digérer des antigènes du soi et du non-soi et de les exprimer à la surface de leur membrane sous forme de peptides liés aux complexes majeurs d'histocompatibilités (CMH) afin de déclencher une réaction immunitaire provenant des lymphocytes T. Ce mécanisme est essentiel pour la transition de l'immunité innée vers l'immunité acquise et peut être séparé en trois classes différentes : celle dépendante du CMH-I, celle dépendante du CMH-II et la présentation antigénique croisée.

Les molécules de CMH-I sont exprimées chez toutes les cellules nucléées et permettent de présenter des peptides de 8-9 acides aminés provenant de molécules endogènes. Ces molécules peuvent être du soi, provenir de mutation ou suivant une infection virale. Lorsque le complexe CMH-I – peptide présente des antigènes mutants ou provenant de virus, le récepteur des cellules T (TcR) pourra reconnaître le complexe ce qui activera les lymphocytes T CD8⁺ qui pourront éliminer les cellules anormales ou infectées.(Blander, 2016) Afin de présenter les antigènes à la surface, les molécules sont tout d'abord dégradées dans le cytosol par le protéasome et les peptides ainsi obtenus sont transférés dans le réticulum endoplasmique (ER) à l'aide du «Transporter associated with Antigen Processing» (TAP) qui est un transporteur hétérodimerique faisant partie de la famille des «ATP-Binding Cassette transporter» (ABC). (Hinz & Tampe, 2012) TAP, en combinaison avec deux conjugués tapasin-Erp57 et des chaperonnes, forment le complexe de chargement peptidique (PLC). Ce complexe permet de charger les peptides sur les molécules de CMH-I. Une autre molécule importante dans le chargement du peptide est la ER Aminopeptidase-1 (ERAP-1 chez l'humain, ERAAP chez la souris) qui permet de réduire la longueur des peptides qui sont internalisés dans le ER afin qu'il soit de seulement 8-9 acides aminés et puissent être chargés sur le CMH. Afin que le complexe CMH-I – peptide soit complété, l'affinité entre le peptide et la molécule de CMH-I doit être assez élevée afin de dissocier le PLC du CMH. Si l'affinité n'est pas assez grande, le peptide est retiré du complexe et un nouveau peptide est présenté. Une fois que le complexe CMH-I – peptide est stable, il est transporté dans l'appareil de Golgi puis à la surface de la membrane.(Blum *et al.*, 2013) Chez l'humain, trois gènes sont responsables de la synthèse des CMH-I, HLA-A, HLA-B et HLA –C. Ces gènes possèdent un polymorphisme très élevé, en moyenne plus de 2800 allèles pour les trois gènes, et la majorité de ces allèles sont fonctionnels. C'est cette grande diversité de HLA qui fait en sorte que chaque CMH produit reconnaît certains peptides avec une plus grande affinité que d'autres.(Goldberg & Rizzo, 2015a)

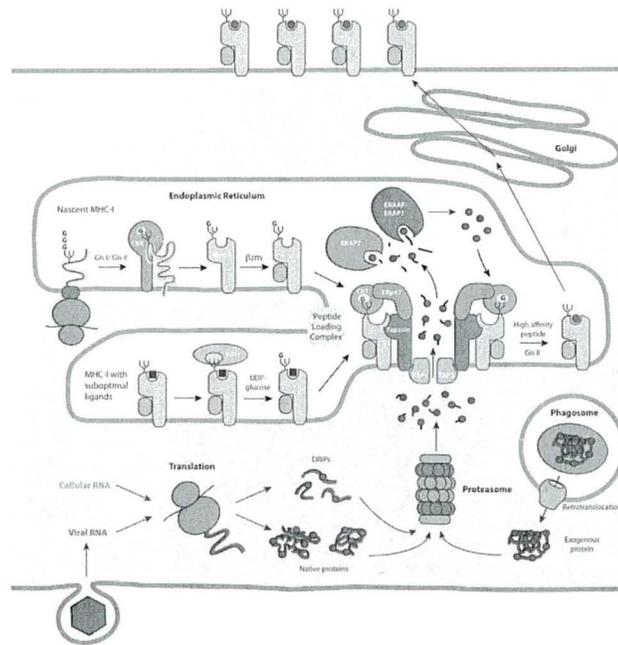


Figure 1.3: Présentation d'antigène par le CMH-I

Les antigènes capturés sont dégradés dans le cytosol avant d'être lié au complexe du CMH-1 dans le réticulum endoplasmique (Blum et al., 2013)

Les molécules de CMH-II ne sont pas exprimées sur toutes les cellules comme celles du CMH-I. En effet, leur expression est limitée principalement aux cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, cellules dendritiques, cellules de Langerhans, cellule de Kupffer) et aux cellules B. Cette voie de présentation antigénique est utilisée afin de présenter des molécules exogènes, telles que des protéines bactériennes, ou bien des protéines provenant de cellules en apoptose ou nécrosées d'une longueur de 14-15 résidus. (Goldberg & Rizzo, 2015b)

Tout comme les CMH-I, les CMH-II sont assemblés dans le ER, mais ils terminent leur maturation dans un endosome tardif riche en antigènes nommé MIIC (MHC class II compartment). Lors de l'assemblage dans le ER, les deux sous-unités vont s'associer avec la chaîne invariable (ou CD74) qui est une chaperonne. Cette chaperonne bloque la liaison des peptides et du CMH-II lorsque celui-ci se trouve dans le réticulum endoplasmique. En plus de cela, elle permet de diriger le CMH-II vers les MIICs. Cette chaperonne peut se retrouver sous plusieurs formes de différentes longueurs selon l'épissage alternatif et la présence de plusieurs codons initiateurs. (Landsverk *et al.*, 2009) La présence de ces nombreuses formes est essentielle au bon fonctionnement du CMH-II, puisque les différents allèles possèdent différentes affinités avec les

chaines invariables et qu'en absence des chaines, le complexe est instable et incapable d'atteindre la surface de la cellule, donc s'accumule dans le réticulum endoplasmique.(van Lith *et al.*, 2010)

Une fois que le complexe a atteint le MIICs, la chaperonne est dégradée en un fragment CLIP (Class II – associated Invariant chain Peptide) par la cathepsine B présente dans ces endosomes.(Roche & Cresswell, 2011) Ce fragment situé sur le site de reconnaissance des peptides sera retiré lorsqu'un peptide compatible sera présenté au complexe. Cet échange est effectué sous le contrôle d'une seconde chaperonne, la glycoprotéine HLA-DM (chez l'humain, H2-DM chez la souris). (Denzin & Cresswell, 1995) Le rôle de cette seconde chaperonne est similaire à la tapasine dans le CMH-I, c'est-à-dire qu'elle induit un changement de conformation du CMH ce qui cause la dissociation de CLIP et permet la liaison avec les peptides. Cette capacité de changer la conformation permet aussi de dissocier les peptides ayant une faible affinité avec le CMH auquel il est lié. Il a été démontré qu'en absence de HLA-DM, CLIP se dissocie quand même du CMH, mais beaucoup plus lentement. Cependant, la liaison avec les peptides n'est pas efficace.(Blum *et al.*, 2013) Une fois le complexe CMH-II lié à un peptide avec une forte affinité, il peut être transporté à la membrane où il sera reconnu par le TcR des lymphocytes T CD4⁺.

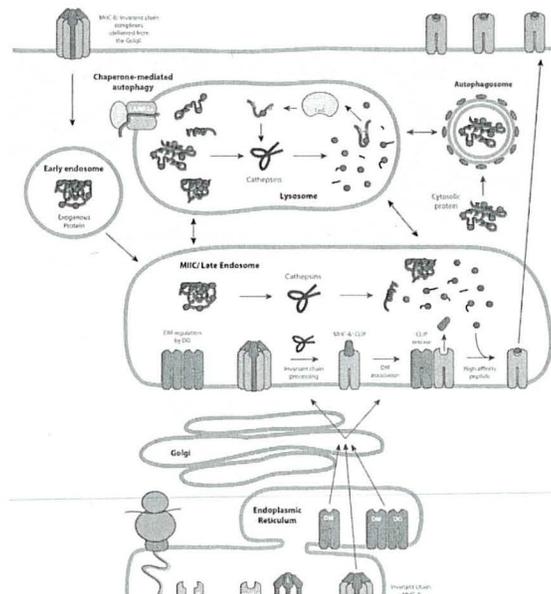


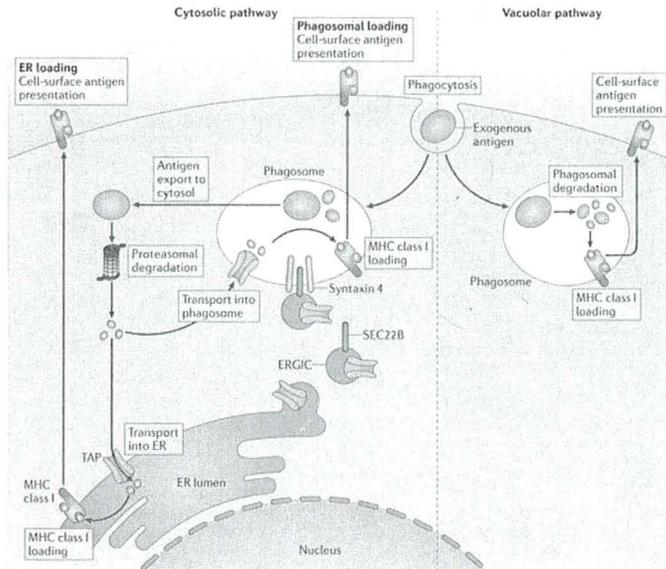
Figure 1.4: Présentation d'antigène par le CMH-II

Les antigènes sont dégradés dans les endosomes tardifs ou dans les lysosomes avant d'être lié au complexe du CMH-II dans les MIICs (Blum *et al.*, 2013)

La réponse CD8⁺ est essentielle afin d'éliminer les agents pathogènes intracellulaires. Cependant, les cellules naïves doivent être activées avant de devenir des cellules effectrices et pouvoir reconnaître le complexe peptide-CMH-I et éliminer la cellule infectée. Cette activation est effectuée par les APC, particulièrement par les cellules dendritiques, grâce à la présentation antigénique croisée qui permet à ces cellules de présenter des antigènes exogènes sur leur CMH-I et ainsi activer les CD8⁺ naïves. Deux voies intracellulaires peuvent être utilisées afin de préparer et présenter les antigènes : la voie cytosolique et la voie vacuolaire. Lors de la première, les antigènes sont phagocytés puis transportés dans le cytosol où ils sont dégradés par le protéasome comme lors de la présentation classique par le CMH-I. Par la suite, les antigènes dégradés peuvent être transportés dans les phagosomes initiaux à l'aide de TAP où ils sont mis en contact avec les CMH ou bien transportés dans le réticulum endoplasmique où ils sont présentés aux CMH avant d'être envoyés à la surface de la cellule. Lorsque la voie vacuolaire est impliquée, l'antigène est phagocyté puis est dégradé et est mis en contact avec le CMH-I dans le phagosome sans passer par le cytosol. Cette deuxième voie est considérée TAP-indépendante. Réussir à déterminer la voie principale utilisée pour la présentation antigénique croisée est une tâche difficile, mais les résultats obtenus jusqu'à maintenant semblent indiquer que la voie cytosolique est la voie principale. (Joffre *et al.*, 2012)

Une des raisons principales pourquoi les cellules dendritiques sont les cellules avec la plus grande capacité à effectuer la présentation antigénique est qu'elles ont une capacité protéolytique plus faible en comparaison avec les autres phagocytes tels que les macrophages. En effet, le pH dans les phagosomes et les endosomes est plus élevé que dans celui des mêmes organelles chez les macrophages. Ceci est dû à une diminution de l'activité de la V-ATPase ainsi qu'une augmentation de l'activité de la NAPDH oxydase 2 (NOX2). Cette augmentation permet une diminution de la production de ROS ce qui permet de maintenir un niveau plus alcalin et en absence de NOX2, la capacité à faire la présentation antigénique croisée était diminuée. (Savina *et al.*, 2006)

Une fois activées par la présentation antigénique croisée, les cellules T CD8⁺ entameront leur maturation et pourront reconnaître le complexe CMH-I – peptide sur les cellules infectées et les éliminer.



Nature Reviews | Immunology

Figure 1.5: La présentation antigénique croisée peut utiliser deux voies possibles

L'antigène capturé peut être dégradé dans le phagosome et lié au CMH-I dans ce phagosome ou être dégradé dans le cytosol avant d'être lié au CMH-I dans le RE ou le phagosome. (Joffre et al., 2012)

1.5 Les lymphocytes T

Comme mentionné précédemment, les lymphocytes T sont des cellules essentielles de l'immunité adaptative du système immunitaire et sont séparés en trois grandes catégories : les cellules CD4⁺ (T-helper), les CD8⁺ (cytotoxique) et les cellules T régulatrices (Treg). Ces catégories sont dépendantes des marqueurs à la surface des cellules et déterminent leur rôle.

Pour commencer, les cellules souches hématopoïétiques (HSC) présentes dans la moelle osseuse se divisent en progéniteur des lymphoïdes communs (CLP) suite à l'activation des gènes RAG1 et RAG2. Par la suite, une partie des CLP vont migrer vers le thymus où ils vont se différencier en progéniteurs thymiques précoces (ETP). Ces progéniteurs sont capables de se différencier en cellules T et B, mais aussi en cellules NK, cellules dendritiques ainsi qu'en cellule myéloïde. Cependant, une fois dans le stroma du thymus, la présence de ligand pour le récepteur Notch-1 ainsi que la présence d'IL-7 permettent de promouvoir la différenciation de ces cellules en cellules T ainsi que d'inhiber le développement des autres voies de différenciation. (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2010) Par la suite, les ETP se différencient en cellules doubles négatives (DN), qui n'expriment pas CD4 ni CD8, puis en cellules (DN3) commençant à exprimer certaines protéines essentielles pour l'assemblage du TCR tel que CD3, LCK, Zap70 et LAT. Ces DN3 deviennent ensuite doubles positives (DP) pour CD4 et CD8. Ces cellules passent ensuite par la phase de sélection positive avant de devenir positives uniquement pour un des deux marqueurs (SP). Durant la sélection positive, les cellules épithéliales du thymus présentent certaines de leurs protéines sur leur CMH-I et II et seules les cellules DP capables de lier un des deux CMH avec une affinité intermédiaire ou plus pourra poursuivre son développement, les autres sont éliminées par apoptose. Seulement 1 à 5% des DP deviennent des SP. Afin d'éviter que les lymphocytes nouvellement synthétisés réagissent aux antigènes du soi et causent des réactions auto-immunes, les SP, en atteignant la médulla du thymus, sont exposés à divers antigènes du soi par l'intermédiaire des cellules épithéliales de la médulla du thymus (mTEC). Si les SP démontrent une forte affinité pour ces antigènes, ils sont éliminés par apoptose. Celles qui n'auront pas réagi pourront devenir des cellules T naïves et migrer vers les organes lymphoïdes secondaires. (Anderson & Takahama, 2012; Cano & Lopera, 2013)

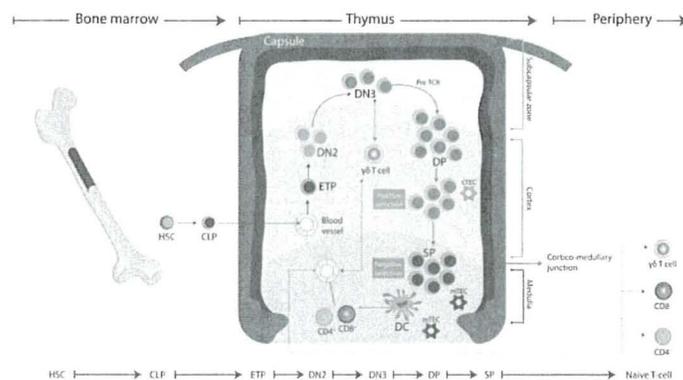


Figure 1.6: Différenciation des cellules T dans le thymus

Les cellules T doivent passer par plusieurs étapes de différenciation avant de devenir des cellules naïves (Cano et Lopera, 2013)

Afin que les cellules naïves deviennent des cellules effectrices et se multiplient, trois facteurs sont essentiels : l'interaction entre le TCR et le complexe CMH-peptide, la présence de molécules co-stimulatrices et la présence de cytokines favorisant l'expansion clonale.

Une fois dans les organes lymphoïdes secondaires, les cellules T établissent des contacts avec de nombreuses cellules dendritiques pouvant durer quelques minutes ou quelques heures selon l'affinité entre le TCR et le complexe du CMH. Une fois que le lymphocyte reconnaît un antigène qui est compatible avec son TCR, une synapse immunologique se forme qui consiste en trois zones concentriques : la zone centrale, périphérique et distale. La première est composée du TCR ainsi que des molécules et récepteurs de costimulation. La zone périphérique est plutôt composée de molécules d'adhésion telle que ICAM-1 permettant de maintenir le contact alors que la zone distale est composée de F-actine et la phosphatase CD45. (Dustin & Depoil, 2011) Une fois la synapse établie, une cascade de réactions permet l'activation de trois possibles facteurs de transcription selon la voie impliquée : NFAT, AP-1 ou NF- κ B. Ces facteurs de transcription permettent l'induction de gènes initiant la sécrétion d'IL-2, l'expression d'adhésine favorisant l'adhésion cellulaire, l'expression de molécule anti-apoptotique ainsi que l'expression de molécules de costimulation telles que CD40L. (Siebenlist *et al.*, 2005)

Ces dernières sont des molécules de surface qui ne peuvent pas induire l'activation des cellules T lorsqu'elles sont exprimées en absence du complexe CMH-TCR, cependant, elles permettent d'amplifier ou de réduire le signal d'activation. Ces molécules peuvent être exprimées de manière constitutionnelle, telle que CD27 et CD28, ou bien suite à l'activation des cellules T, telle que

CD30, SLAM ou PD-1. La majorité font partie de la deuxième catégorie et favorise l'activation sauf PD-1 et CD152 qui inhibent l'activation.(Chen & Flies, 2013)

Afin que les cellules activées puissent se multiplier et induire une réaction immune, la présence de différentes interleukines est requise. La principale est IL-2. Elle possède un rôle autocrine et paracrine afin d'activer l'expansion clonale des cellules T reconnaissant l'antigène qui induit l'activation initiale ce qui permet d'avoir de multiples cellules capables de reconnaître l'antigène envers lequel une réponse immune est nécessaire. Les interleukines 15 et 21 sont aussi impliquées dans cette expansion clonale ainsi que plusieurs autres selon quel sous-groupe des cellules T est stimulé.(Boyman & Sprent, 2012)

Cette prolifération clonale n'est pas permanente, en effet, suite à l'expansion initiale, 90% des cellules effectrices vont mourir par apoptose afin d'éviter une réaction immunitaire constante qui serait nocive pour le système. Les cellules effectrices qui ne seront pas éliminées vont pouvoir devenir des cellules mémoires permettant d'avoir une réponse plus rapide lors d'une seconde infection.(Malek & Bayer, 2004)

Comme mentionné un peu plus haut, les cellules T sont séparées en trois groupes majeurs qui eux-mêmes comprennent plusieurs sous-groupes. Les cellules composant le premier de ces groupes sont les lymphocytes CD4⁺. Ces cellules possèdent deux rôles principaux : produire des cytokines et stimuler les cellules B afin qu'elles produisent des anticorps. Ces CD4⁺ peuvent être séparées en 6 sous-groupes (Th1, Th2, Th9, Th17 Th22 et Tfh) selon les interleukines impliquées dans leur différenciation ainsi que leur rôle. Par exemple, les Th1 nécessitent la présence d'IL-12 et 18 et sont principalement impliqués dans la réponse contre les agents pathogènes intracellulaires alors que les Th2 ont entre autres besoin d'IL-4 et jouent plus un rôle dans la protection contre les agents pathogènes extracellulaires.(Kaiko *et al.*, 2008; Paul & Zhu, 2010)

Pour ce qui est des cellules Treg, elles expriment aussi le CD4⁺, mais expriment en plus de cela FOXP3 ainsi que CD25. Ces cellules peuvent être divisées en deux sous-groupes, les Treg naturelles provenant du thymus et les Treg inductibles qui deviennent des Treg suite à leur activation dans le système périphérique. Les deux groupes ont des rôles pratiquement identiques qui consistent majoritairement à limiter la réponse immunitaire. En effet, elles sont essentielles afin de prévenir les maladies auto-immunes ainsi que pour limiter les réponses immunitaires suite

à l'infection par un agent pathogène et les réactions d'allergies. Elles peuvent limiter l'action et la prolifération des autres groupes de cellules T, particulièrement les cellules réagissant aux antigènes du soi, ainsi que les cellules NK et les lymphocytes B. (Sakaguchi *et al.*, 2010) Pour ce faire, ces cellules ont plusieurs fonctions. Elles peuvent libérer des molécules telles IL-10 inhibant la sécrétion de cytokines par les autres sous-groupes CD4⁺, elles sont aussi capables d'induire l'apoptose des cellules effectrices à l'aide de perforines et de granzymes ainsi qu'agir comme compétiteur pour l'IL-2, ce qui limite la prolifération clonale. (Shevach, 2009)

Le troisième groupe de cellules T est formé de cellules qui, contrairement aux deux groupes précédents, n'expriment pas le CD4, mais qui expriment plutôt CD8 à leur surface. Une autre différence avec les autres groupes est que ce groupe n'est pas séparé en sous-groupe, l'ensemble des CD8⁺ font partie du même groupe. Ces cellules cytotoxiques sont capables d'attaquer directement les cellules cancérigènes et les cellules infectées par un virus en induisant l'apoptose de celles-ci. Pour ce faire, les CD8⁺ possèdent deux mécanismes principaux. Elles peuvent libérer des granules contenant des perforines, des granzymes, des granulolysines ainsi que des inhibiteurs de perforines afin d'éviter que la cellule T se lyse elle-même comme la calréticuline et cathepsine G. Les perforines causent des pores dans la membrane cellulaire de la cellule cible aidées par les granulolysines ce qui cause une entrée de liquide dans la cellule causant un déséquilibre osmotique alors que les granzymes vont lyser les mitochondries et fragmenter l'ADN. Ces cellules peuvent aussi induire directement l'apoptose à l'aide de ligand de mort tel FasL. Elles sécrètent aussi des cytokines importantes dans le contrôle de la prolifération de cellules tumorale ainsi que dans la défense contre les infections virales : l'IFN- γ et TNF- α . (Cox *et al.*, 2013; Lieberman, 2003)

CHAPITRE 2 : LEISHMANIA

2.1 La leishmaniose

La Leishmaniose est une condition regroupant plusieurs maladies causées par le parasite protozoaire intracellulaire obligatoire *Leishmania* sp. (David & Craft, 2009) et est considérée comme une maladie tropicale négligée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). En date de 2017, cette maladie endémique dans 97 pays causait de 20 000 à 30 000 décès par année et environ 700 000 à 1 million de nouveaux cas sont répertoriés tous les ans. (WHO, 2018) Cette maladie se retrouve principalement en Amérique latine, Afrique et Asie dans les régions où les déplacements de population, les cas de malnutrition et de mauvaises conditions de vie sont communs puisque ces conditions favorisent la transmission de la maladie. (Machado-Coelho *et al.*, 2005)

La leishmaniose peut causer plusieurs symptômes selon l'espèce de parasite impliquée et l'interaction avec le système immunitaire de l'hôte. (Paredes *et al.*, 2003) Ceux-ci sont séparés en trois grandes catégories : cutanée, muco-cutanée et viscérale. La leishmaniose cutanée est la forme la plus commune et la moins dangereuse qui est caractérisée par la présence de nodules ou d'ulcères sur la peau, principalement aux endroits exposés comme le visage, les bras et les jambes. (Dowlati, 1996) Elle est causée principalement par les espèces *Leishmania mexicana*, *L. major* et *L. braziliensis*. Dans la majorité des cas, les lésions de petite taille guérissent par elles-mêmes 2 à 15 mois après l'apparition de la lésion, donc ne nécessitent pas l'utilisation de traitement. (David & Craft, 2009) Dans certains cas, surtout si la maladie est causée par *L. braziliensis*, la forme cutanée peut dégénérer vers la forme muco-cutanée qui affecte et détruit les muqueuses du nez et de la bouche. Cette forme d'infection est beaucoup plus rare et est surtout présente en Amérique latine (Strazzulla *et al.*, 2013). La troisième catégorie de Leishmaniose est mortelle dans la majorité des cas lorsque laissée sans traitement. Cette forme de maladie est principalement causée par les souches *L. infantum* et *L. donovani*. Elle affecte le foie, les ganglions, la rate et la moelle osseuse et se caractérise entre autres par une fièvre prolongée, une anémie progressive, une hépatosplénomégalie, une hypergammaglobulinémie et une perte de poids (Sundar, 2015).

Afin de pouvoir détecter et identifier la présence du parasite, plusieurs techniques sont disponibles de nos jours. Cependant, nombre de ces techniques nécessitent des instruments de pointes qui ne sont pas accessibles dans toutes les régions. Parmi les différentes méthodes utilisées, les plus communes sont les examens par microscopie, la culture *in vitro* des parasites et l'amplification de gènes spécifiques par polymérase en chaîne (PCR). Cette dernière est la plus efficace puisqu'elle permet de distinguer les différentes souches du parasite à l'aide de multiples marqueurs (Akhoundi *et al.*, 2017), mais n'est pas disponible dans toutes les régions.

Afin de traiter la maladie, la méthode principale consiste à donner des composés à base d'antimoine, cependant, de plus en plus de cas de résistance font leur apparition et ce type de traitement induit de nombreux effets secondaires. (Handler *et al.*, 2015) En addition au fait que les traitements sont moins efficaces qu'auparavant à cause des résistances, il n'y a toujours pas de vaccin efficace qui est disponible afin de prévenir cette maladie. (Rezvan & Moafi, 2015)

Une des complications possibles découlant de l'infection par le parasite sont les cas de co-infections VIH/*leishmania*. En effet, depuis le milieu des années 1990, de nombreux cas ont été répertoriés. Cette co-infection serait entre autres causée par la proximité géographique des régions endémiques des deux maladies et du fait que l'infection par le VIH favorise la multiplication du parasite et l'activation du système immunitaire par le parasite facilite la dissémination du virus et induit un développement plus rapide vers le SIDA. (Okwor & Uzonna, 2013)

2.2 Le cycle de vie du parasite

Le parasite *Leishmania sp* est un protozoaire intracellulaire obligatoire transmis lors du repas sanguin de la mouche des sables femelle. Les deux genres de phlébotomes qui sont les vecteurs principaux sont *Phlebotomus* et *Lutzomyia* selon la région où le parasite se retrouve, le Nouveau Monde (Amérique) ou l'Ancien Monde (Europe et Afrique) respectivement. (Rogers, 2012) Le parasite possède un cycle de vie complexe se séparant en deux cycles principaux, un chez le mammifère hôte et le second chez le phlébotome.

Lorsqu'un phlébotome infecté prélève son repas sanguin, elle injecte des parasites sous forme de promastigotes métacycliques dans la peau. La salive du phlébotome contient de nombreuses substances qui activent le recrutement de neutrophiles et macrophages. Ces cellules, une fois

arrivées au site de morsure, vont pouvoir phagocyter les parasites. Une fois à l'intérieur de ces cellules, le parasite va former une vacuole parasitophore (PV) dans laquelle les promastigotes vont se transformer en amastigotes ce qui va leur permettre de se multiplier dans la cellule. Lorsqu'une cellule est trop infectée, elle va se lyser et libérer les amastigotes qui vont être phagocytés par d'autres cellules ce qui permet la propagation de l'infection dans l'hôte.

Lorsqu'un phlébotome se nourrit sur un hôte infecté, elle ingère des macrophages ayant phagocyté les amastigotes et le deuxième cycle de vie du parasite peut commencer. Une fois les cellules ingérées, elles vont être lysées ce qui va libérer les parasites dans le système digestif de la mouche des sables. Une fois qu'ils vont atteindre l'intestin moyen, les amastigotes vont se multiplier et se transformer en promastigote en passant par quatre phases : procyclique, nectomonade, leptomonade et métacyclique où la dernière est considérée comme la phase infectieuse du parasite. Ce processus est appelé la métacyclogénèse. (Gossage *et al.*, 2003) Ils vont ensuite se rendre dans l'œsophage où ils seront prêts à se faire inoculer dans un nouvel hôte et recommencer le cycle. (Teixeira *et al.*, 2013)

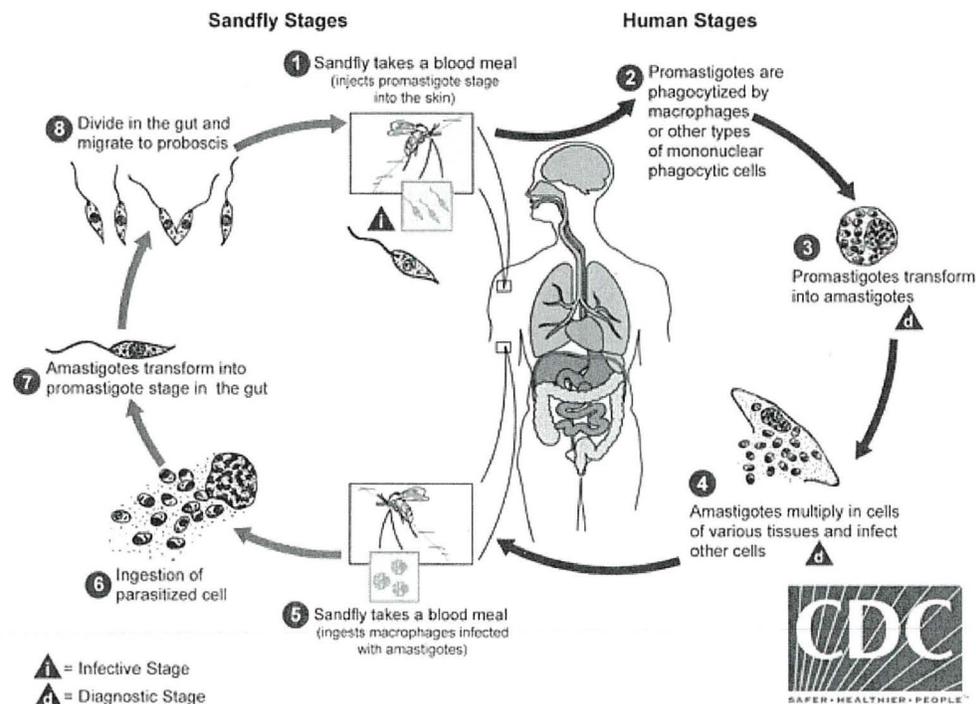


Figure 1.7: Cycles cellulaires du parasite *Leishmania*

Le parasite possède un cycle complexe de réplication se produisant en partie dans l'hôte mammifère et en partie dans le vecteur (CDC, 2019 courtesy of DPDx)

2.3 Les diverses formes du parasite

Comme mentionné plus haut, le parasite possède deux stades de vie principaux, le stade promastigote dans la mouche des sables et le stade d'amastigote dans les cellules de mammifères. Le premier stade est considéré comme la forme infectieuse du parasite et est caractérisé par la présence d'un flagelle et d'une forme effilée. C'est aussi lors de ce stade que les facteurs de virulence tels que GP63 et LPG sont exprimés à la hausse. La deuxième forme, quant à elle, est considérée comme la forme répliquative du parasite et est caractérisée par une forme arrondie et l'absence de flagelle, donc immobile et une expression des facteurs de virulences plus basse comparée à la phase infectieuse. Les mécanismes de transition d'une forme à l'autre ne sont pas encore très bien compris, cependant la variation de pH et de température serait un facteur important et se produirait environ 24 à 48h après l'infection. (Sunter & Gull, 2017)

2.4 Les facteurs de virulence principaux du parasite

2.4.1 LPG

Le parasite produit de nombreux glycoconjugués dont les plus communs font partie des phosphoglycans. Une des caractéristiques principales de ces phosphoglycans est la présence d'unités de disaccharide-phosphate $\text{Gal}(\beta 1,4)\text{Man}(\alpha 1-\text{PO}_4 \rightarrow 6)$ qui ne sont pas présentes chez les mammifères. Ces phosphoglycans peuvent être soit sécrétés, soit liés à la membrane du parasite comme c'est le cas du lipophosphoglycan (LPG). (Descoteaux *et al.*, 1995) Le LPG est le lipoconjugué le plus commun avec plus de 5 millions de copies par cellule, couvrant toute la surface de la membrane. Cette molécule est principalement exprimée au stade promastigote et est peu ou pas exprimée durant la phase amastigote selon l'espèce du parasite. (McConville & Blackwell, 1991) Ce lipophosphoglycan est composé d'une chaîne de 16-30 unités de $\text{Gal}(\beta 1,4)\text{Man}(\alpha 1-\text{PO}_4 \rightarrow 6)$ répétées qui est liée à la membrane grâce à une ancre 1-O-alkyl-2-lyso-phosphatidyl(*myo*)inositol (PI), aussi appelé GPI. Un noyau de glycans permet la liaison entre les deux parties de la molécule. L'ancre et le corps de glycans sont conservés parmi les différentes espèces, cependant la longueur de la chaîne change selon l'espèce. (McConville *et al.*, 1990)

Grâce à la génération de divers mutants, il a été démontré que la présence et la longueur des chaînes d'unités répétées jouent un rôle important dans l'établissement du parasite à l'intérieur des cellules de mammifères. En effet, lorsque la synthèse du LPG est défectueuse chez *L. donovani*, le promastigote est incapable d'inhiber la biogenèse du phagolysosome. (Desjardins & Descoteaux, 1997)

2.4.2 GP63 :

Un deuxième facteur de virulence d'importance du parasite est la métalloprotéase ancrée par une ancre GPI dépendante du zinc, la GP63. Cette protéase, aussi appelée leishmanolysin, a été découverte en 1980 et est considérée comme un antigène de surface majeur du parasite. C'est une glycoprotéine faisant partie de la classe des metzincins. Cette classe de protéases est caractérisée par une séquence HEXXHXXGXXH (Schlagenhauf *et al.*, 1998) et possède un propeptide à l'extrémité N-terminale qui rend l'enzyme inactive lors de la translation et qui est retiré lors de l'activation (Yiallourous *et al.*, 2002). GP63 est la glycoprotéine la plus abondante sur la surface du parasite, environ 0,5 million de molécules sont présentes à la surface de chaque promastigote de *L. mexicana*. Tout comme LPG, la glycoprotéine est exprimée en plus grande quantité lors de la phase promastigote que lors de la phase amastigote. (Olivier *et al.*, 2012) En effet, dans le cas de *Leishmania mexicana*, les gènes codant la protéase sont présents en 10 copies regroupées en tandem et sont séparés en trois catégories : C1, C2 et C3. Lors du stade promastigote, le parasite exprime l'ensemble des copies du gène alors que durant le stade d'amastigote, seul le groupe C1, contenant 4 des 10 copies, est exprimé. Dans le cas de *L. chagasi*, 18 tandems sont présents séparés encore une fois en trois classes : MSPL, MSPS et MSPC selon les différences dans leurs régions 3' UTR et à quelle étape du cycle cellulaire ils sont exprimés. La première classe est exprimée principalement durant la phase logarithmique alors que la seconde est exprimée exclusivement lors de la phase stationnaire du parasite. Dans le cas de la troisième classe, elle contient seulement une copie du gène et est exprimée dans les deux phases mentionnées précédemment. (Roberts *et al.*, 1993) Cette métalloprotéase est présente chez toutes les espèces de *Leishmania* étudiées, mais des protéases homologues sont aussi présentes chez certaines espèces de *Trypanosoma sp.* et *Crithidia fasciculata* (Yao *et al.*, 2003)

La métalloprotéase se retrouve principalement à la surface du parasite, mais une petite proportion se retrouve dans le réticulum endoplasmique (RE). En effet, elle possède une séquence signal à l'extrémité N-terminale qui cible le RE afin de se faire synthétiser. Cependant, seulement moins

de 1,5% du total des protéines se retrouve dans le RE à tout moment alors que 75% se retrouvent à la membrane du parasite.(Weise *et al.*, 2000) Chez les levures et de nombreux eucaryotes, le transport des protéines liées à des ancrés GPI du RE au Golgi nécessite la synthèse de sphingolipide et la formation de radeaux lipidiques. Cependant, ce n'est pas le cas pour le parasite puisqu'en présence d'inhibiteur de la synthèse des sphingolipides, le transport à la membrane de GP63 n'est pas modifié, mais il est inhibé par les basses températures (4 et 10°C) indiquant un mécanisme vésiculaire. (Ralton *et al.*, 2002)

Plusieurs études ont démontré que malgré le fait que GP63 était normalement liée à la membrane par une ancre GPI, le parasite relâche aussi la protéase dans le milieu extracellulaire.(Ellis *et al.*, 2002; McGwire *et al.*, 2002) Cette relâche serait dépendante de deux mécanismes différents, un pour les protéases liées à des ancrés GPI et un deuxième pour celles qui ne sont pas liées aux ancrés. Dans le premier cas, l'autoprotéolyse permettrait le clivage de l'ancre et le relargage des protéases dans le milieu. En effet, en présence d'un chélateur du zinc, la 1-10 phénantroline, inhibant l'activité enzymatique des protéases dépendantes du zinc, la présence de GP63 dans le milieu est grandement diminuée.(McGwire *et al.*, 2002) Dans le cas des protéases non liées aux ancrés, le transport dans le milieu extracellulaire serait plutôt directement dépendant de la glycosylation. En effet, lorsque le parasite est mis en culture dans un milieu contenant de la tunicamycine, un inhibiteur de la glycosylation, il y a une inhibition de la sécrétion des métalloprotéases non liées aux ancrés GPI dans le milieu extracellulaire, mais cet inhibiteur n'affecte pas celles liées aux ancrés GPI, puisque celles-ci étaient encore retrouvées dans le milieu.(Ellis *et al.*, 2002)

Cette protéase est capable de dégrader de nombreux substrats tels que la caséine, la gélatine, l'albumine et l'hémoglobine.(Bouvier *et al.*, 1990) Une des caractéristiques de GP63 est qu'elle fonctionne à un pH optimal différent en fonction de la souche de *Leishmania*. En effet, celle de *L. major* fonctionne mieux à un pH alcalin ou neutre alors que celle de *L. mexicana* est plus active à un pH acide.(Tzinia & Soteriadou, 1991) Il a été démontré que la métalloprotéase ne requière pas de résidu aminé spécifique, cependant elle clive souvent le résidu tyrosine des substrats à l'exception de *L. mexicana* qui clive plus souvent des sérines ou des thréonines. (Bouvier *et al.*, 1990). En plus des substrats mentionnés plus haut, GP63 peut aussi dégrader le collagène IV ainsi que la fibronectine formant la matrice extracellulaire. La dégradation de ces protéines permettrait au parasite de se déplacer plus facilement dans la matrice extracellulaire *in vivo*. (McGwire *et al.*, 2003)

GP63 possède des rôles différents selon le stade de vie du parasite. Lorsque le parasite est injecté dans l'hôte sous forme de promastigote, la protéase se lie à la composante C3 du complément et inactive la fraction C3b en la convertissant en sa forme inactive C3bi ce qui permet au parasite d'éviter la lyse dépendante du complément. (Brittingham *et al.*, 1995) Cette transformation du C3b en C3bi agirait aussi en tant qu'opsonine qui faciliterait l'entrée du parasite dans les macrophages en permettant la liaison au récepteur du complément 1 et 3. (Mosser & Edelson, 1985)

Une fois à l'intérieur du phagosome, GP63 permettrait de protéger l'amastigote de la dégradation par le phagolysosome. En effet, lorsque la métalloprotéase est dénaturée par la chaleur ou bien sous-exprimée à l'aide d'ARN anti-sens, la survie du parasite dans les cellules est grandement diminuée. (Chen *et al.*, 2000)

2.4.3 CPB :

Un autre facteur de virulence important pour le parasite, surtout dans le cas du parasite *Leishmania mexicana*, est la cystéine peptidase B aussi appelée CPB. Cette enzyme est une des 65 cystéines peptidases (CP) codées par *Leishmania*. Ces CPs sont séparées en quatre clans et 13 familles. Plusieurs de ces peptidases semblent jouer un rôle essentiel dans les interactions hôtes-pathogènes, mais les études effectuées actuellement se concentrent surtout sur trois peptidases particulières CPA, CPB et CPC. Ces trois CPs font partie de la famille C1 et sont toutes similaires à la papaïne. Les deux premières enzymes possèdent une séquence d'acides aminés similaire aux cathepsines-L alors que CPC ressemble plus aux cathepsines-B. (Mottram *et al.*, 1998)

CPB possède certaines particularités que les autres CPs ne possèdent pas soit une extension de 100 acides aminés à l'extrémité C-terminale ainsi que le fait que la cystéine est présente sous forme de plusieurs isomères et que les gènes codant ces isomères sont présents en tandem dans un seul locus. Dans le cas de *L. mexicana* le locus comprend 19 gènes alors que chez *L. major*, le locus en comprend seulement huit. Pour ce qui est de CPA et CPC, il y a une seule copie du gène qui est présente et non pas de multiples copies. Dans le cas de *L. mexicana*, les différents isoformes possèdent des substrats et des activités catalytiques variables selon l'isoforme et leur expression est dépendante du stade du parasite. (Brooks *et al.*, 2001)

Contrairement aux autres facteurs de virulence, la plupart des CPs sont plus fortement exprimées durant la phase amastigote du parasite (Souza *et al.*, 1992) à l'exception de CPC qui est plus exprimé lors du stage de promastigote procyclique. (Bart *et al.*, 1995) ainsi que CPB1 et CPB2 qui sont plus exprimés durant le stade promastigote métacyclique. Cependant, le reste des copies de CPB, donc CPB3 à CPB19, sont exprimées durant le stade amastigote. (Mottram *et al.*, 1997)

Étant donné que les cystéines peptidases sont exprimées à plusieurs stades du parasite, leurs fonctions sont nombreuses et jouent un rôle dans plusieurs interactions hôtes-pathogènes. En utilisant des mutants de *L. infantum* déficients en CPA, il a été démontré que le parasite était moins infectieux *in vivo* et *in vitro*. (Denise *et al.*, 2006) Il a aussi été démontré que lorsque CPB est inhibé chez *L. mexicana* une diminution dans l'activité infectieuse était observée ainsi qu'une diminution du développement des lésions *in vivo* dans les souris BALB/C. (Mottram *et al.*, 1996) Il a aussi été observé que l'ajout d'une seule copie de CPB n'était pas suffisant afin de retrouver le phénotype normal, mais que l'ajout de plusieurs copies l'était, indiquant une activité complémentaire entre les diverses copies du gène chez le parasite. (Denise *et al.*, 2003) Lorsqu'un double mutant pour CPA et CPB était utilisé, la diminution de l'infectiosité était encore plus prononcée dans les BALB/C que lorsque seulement CPB était inhibé, indiquant une possible redondance dans le rôle des deux cystéines. (Mottram *et al.*, 2004) Dans le cas de CPC, elle serait impliquée dans le remaniement du secrétome ainsi que dans la capacité d'infecter les macrophages *in vitro*, mais n'aurait pas d'effet sur la capacité du parasite à causer des lésions *in vivo* comme démontré à l'aide de mutant CPC chez *L. mexicana*. (Bart *et al.*, 1997)

En plus des nombreux rôles décrits plus haut que les cystéines peptidases possèdent, elles ont aussi des implications dans la réponse Th1 et Th2 lors de l'infection ainsi que dans la présentation antigénique par le CMH-II. Ces rôles seront plus approfondis un peu plus tard dans une autre section.

CHAPITRE 3 : INTERACTIONS HÔTE – AGENT PATHOGÈNE

Le système immunitaire est un système hautement régulé et efficace qui permet d'éliminer la majorité des agents pathogènes et des cellules qui deviennent tumorales ainsi que de maintenir l'homéostasie dans le corps. Cependant, de nombreux microorganismes sont capables d'altérer différents mécanismes du système immunitaire afin de promouvoir leur entrée, leur réplication ou leur propagation. Par exemple, le virus de l'herpès simplex est capable de bloquer le site de liaison au peptide de la protéine TAP du complexe du CMH-1 ce qui permet de limiter l'activation des cellules T CD8⁺ et ainsi réduire l'élimination des cellules que le virus a infectées. (Hill *et al.*, 1995) Un autre exemple est la bactérie *Staphylococcus aureus* qui sécrète des protéines d'adhérence (Eap) liant ICAM-1 ce qui permet d'inhiber le recrutement des neutrophiles au site d'infection et ainsi permettre à la bactérie d'établir l'infection. (Chavakis *et al.*, 2002) Le parasite *Leishmania spp.* fait aussi parti de ces organismes modifiant le système immunitaire. En effet, ses facteurs de virulence modifient de nombreuses fonctions, que ce soit lors de l'entrée dans l'hôte, la formation de sa vacuole parasitophore et durant la persistance de l'infection où les actions sont très souvent reliées à une diminution de l'inflammation dans l'hôte.

3.1 L'entrée du parasite dans l'hôte

Pour commencer, lorsque le parasite est inoculé par la mouche des sables, il doit survivre au premier contact à l'intérieur de l'hôte et atteindre le derme. Dans les deux cas, la métalloprotéase GP63 joue un grand rôle. En effet, elle permet de dégrader la matrice extracellulaire dans la peau permettant au parasite de migrer de l'épiderme vers le derme.(McGwire *et al.*, 2003) Un autre rôle majeur de la métalloprotéase au début de l'infection est d'inhiber la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM) du complément en liant la fraction C3b et en induisant sa conversion en C3bi empêchant la liaison entre le C3b et la fraction C5. Cette liaison du parasite au C3bi, en plus d'éviter que le parasite ne soit éliminé, permet aussi une meilleure phagocytose grâce à la reconnaissance par les récepteurs du complément 3 de la fraction C3bi liée au parasite.(Brittingham *et al.*, 1995) Le complément agit normalement en tant que cascade de réactions dont le clivage de la première molécule va induire l'activation de la 2^e par clivage de celle-ci, ce qui va induire l'activation de la 3^e ainsi de suite. Il est composé de 9 protéines faisant partie de la voie classique du complément. La protéine C3 est une des plus importante puisqu'elle

permet l'opsonisation des agents pathogènes, l'induction de l'inflammation par le fragment C3a et l'activation du CAM composé des protéines C5 à C9. Le fragment C3b a un rôle important dans l'amplification de l'activation du complément par les différentes voies d'activation. (Rus *et al.*, 2005) Donc une inhibition de ce fragment par le parasite permet de diminuer l'inflammation et réduire l'élimination du parasite initialement.

Une autre particularité de l'initiation d'une infection par le parasite est la présence de parasites morts exprimant des phosphatidylsérines (PS) à leur surface imitant des cellules apoptotiques. En effet, la présence de ces parasites permet d'induire une réponse anti-inflammatoire caractérisée par la sécrétion de TGF- β_1 et IL-10. (Wanderley *et al.*, 2013) Il a été démontré qu'en absence de ces parasites morts, des souris qui étaient normalement sensibles à l'infection, devenaient résistantes à celle-ci. (van Zandbergen *et al.*, 2006) Ce mécanisme est utilisé par plusieurs microorganismes tels que *Trypanosoma cruzi* et le virus de la vaccine afin d'infecter les cellules sans induire une réponse inflammatoire. (Damatta *et al.*, 2007; Mercer & Helenius, 2008)

Une fois que le parasite est entré dans l'hôte, il entre en contact avec de multiples cellules et phagocytes qui arrivent pour réparer les tissus endommagés par la morsure de la mouche des sables. Selon l'espèce du parasite impliqué et la présence de salive du phlébotome, les proportions des cellules se rendant à la lésion varient. Par exemple, lors de l'infection par *L. chagasi*, il y a un ratio plus élevé de neutrophiles lorsque comparé aux macrophages. (Vasconcelos *et al.*, 2014) Les premières cellules qui arrivent sur le site d'infection sont les neutrophiles suivis par les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques. Lorsque les parasites entrent en contact avec les neutrophiles, ils sont rapidement phagocytés et pourront survivre à l'intérieur de ceux-ci, mais ne se différencieront pas en amastigotes. Les neutrophiles infectés vont ensuite entrer en apoptose et être capturés par les macrophages et les cellules dendritiques. Ces neutrophiles expriment de hauts niveaux de molécules apoptotiques induits par la présence du parasite, ce qui permet de promouvoir une réponse immunosuppressive au début de l'infection ralentissant l'acquisition d'une résistance au parasite par l'hôte. (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2012) Une particularité des neutrophiles est leur capacité à sécréter rapidement des filaments d'ADN et de granules dans l'environnement. Ces filaments, aussi appelés NETs (neutrophil extracellular traps), permettent de capturer et tuer certains microorganismes. Dans le cas de *Leishmania*, selon l'espèce impliquée, les effets ne seront pas les mêmes. En effet, dans le cas de *Leishmania amazonensis*, le parasite est tué par les NETs alors que *Leishmania donovani* est capturé par les NETs, mais n'est pas éliminé, au contraire, la présence des NETs permettrait de

faciliter leur phagocytose par certains phagocytes. Cette variation dans la résistance ou non aux NETs serait dû à la présence du LPG à la surface du parasite puisqu'il a été démontré qu'en absence de LPG, les parasites étaient plus sensibles à l'élimination par les NETs. (Gabriel *et al.*, 2010)

Un autre exemple de cellule avec lesquelles le parasite entre en contact au début de l'infection sont les cellules NK. Ces cellules ne phagocytent pas le parasite, mais libèrent plutôt de nombreuses cytokines, comme l'INF- γ et TNF α , permettant d'induire une réponse Th1 favorable à l'élimination du parasite. Ces cellules sont aussi capables d'éliminer directement les cellules infectées sans avoir besoin d'une activation par les APC. Pour ce faire, les NK libèrent des granules cytotoxiques contenant des perforines et des granzymes induisant la lyse de la cellule cible. (Vivier *et al.*, 2008) Lors de l'infection par *Leishmania*, les NK induisent normalement une réponse Th1 par la sécrétion de INF- γ , cependant, il a été démontré que le parasite était capable d'inhiber la prolifération des cellules NK qui ont été activées par l'IL-2 ainsi que de modifier les niveaux d'expression des récepteurs à la surface des cellules. Ces effets ont été démontrés comme étant GP63 dépendant, puisqu'en absence de la métalloprotéase l'inhibition était moindre sans être totalement absente. (Lieke *et al.*, 2008) Cette inhibition des cellules NK permet donc au parasite de guider la réponse immunitaire vers une réponse Th2 qui est plus permissive à *Leishmania spp.*

3.2 La formation de la vacuole parasitophore

Afin d'être phagocyté par les macrophages, le parasite peut être reconnu par plusieurs récepteurs en plus de rentrer suite à la phagocytose des neutrophiles infectés. En effet, différentes espèces utilisent différents récepteurs tels que les récepteurs au complément, les récepteurs mannoses, les récepteurs de fibronectine et les FcR γ . Ces différents récepteurs utilisent des voies de signalisation intracellulaires plus ou moins inflammatoires. La voie dépendante du CR serait celle qui serait la moins inflammatoire et permettrait une meilleure survie du parasite. (Ueno & Wilson, 2012) Une fois que le parasite se retrouve à l'intérieur des macrophages, il doit modifier de nombreuses fonctions cellulaires afin de survivre, pouvoir se différencier en amastigote et proliférer. Une des modifications importantes que le parasite doit effectuer est la modification du phagosome en PV. Les vacuoles individuelles et communales ne causent pas les mêmes modifications, cependant la formation des vacuoles individuelles est mieux comprise. Durant la

formation des vacuoles étroites, le parasite empêche la maturation du phagosome. Pour ce faire, le parasite introduit des molécules de LPG dans la membrane du phagosome causant un déséquilibre dans les microdomaines lipidiques. Ce déséquilibre permet entre autres d'empêcher l'assemblage du complexe de la NADPH oxydase au phagosome et donc de réduire la production de ROS. (Lodge *et al.*, 2006) Ce dérèglement de la membrane permet aussi d'inhiber l'apport de la pompe à proton-ATPase à la vacuole en bloquant le recrutement de la Synaptotagmine V ce qui permet de maintenir le pH de la vacuole à une valeur plus neutre permettant la survie du parasite sous forme de promastigote. (Vinet *et al.*, 2009) Une autre caractéristique de l'arrêt de la maturation du phagosome est la présence d'une accumulation de filament de F-actine autour du phagosome. Cet anneau d'actine permettrait d'inhiber les contacts avec les différents endosomes tardif et lysosomes et bloquer le recrutement de certaines molécules impliquées dans la progression de la maturation. (Holm *et al.*, 2001) (Moradin & Descoteaux, 2012) Cependant, l'actine accumulée autour des phagosomes contenant les parasites *L. amazonensis* est rapidement dégradée contrairement à l'actine autour des phagosomes contenant *L. donovani*. Cette différence de mécanisme pourrait être liée à la différence de taille entre les deux types de vacuoles, mais ce n'est pas encore confirmé. (Courret *et al.*, 2002)

Comme mentionné précédemment, les niveaux de LPG diminuent drastiquement lorsque le parasite devient un amastigote et donc ces effets dépendants du LPG sont transitoires et lorsque les niveaux de LPG diminuent, le phagosome retrouve certaines de ces fonctions normales et le pH de la vacuole peut devenir acide puisque la v-ATPase peut s'assembler à la membrane. Cependant, cette diminution de pH n'est pas mortelle pour l'amastigote puisque son pH optimal se situe entre 4.0 et 5.5. (Mukkada *et al.*, 1985)

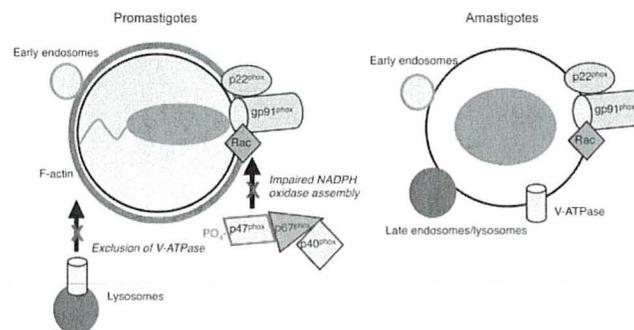


Figure 1.8: Le promastigote modifie l'environnement du phagosome

Lors de son entrée dans le macrophage, le parasite modifie de nombreuses fonctions du phagosome afin de promouvoir sa survie et se différencier en amastigote (Moradin & Descoteaux, 2012)

3.3 Modification des cytokines

En plus de modifier l'environnement du phagosome afin d'établir sa vacuole parasitophore, le parasite doit diminuer l'apoptose des macrophages infectés afin d'avoir le temps de se répliquer et aussi diminuer les signaux inflammatoires afin que le système immunitaire ne puisse pas établir une défense efficace contre l'agent pathogène. Pour ce faire, de nombreuses protéines du parasite sont impliquées tels que l'inhibiteur de la sérine peptidase (ISP), la protéine membranaire kinetoplastide 11 (KMP-11) et la cystéine peptidase B (CPB). Cependant, une des molécules importantes dans la modulation des cytokines est la métalloprotéase GP63. En effet, cette protéase peut cliver de nombreuses protéines tyrosines phosphatases (PTPs) telles que PTP1B et SHP-1 ce qui permet d'induire leur activation inhibant les voies MAPK et JAK/STAT ce qui permet de réduire la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme l'INF- γ , TNF- α et IL-12 par le macrophage. (Gomez *et al.*, 2009) En plus de cela, des études ont démontré que GP63 pouvait agir directement sur certains facteurs de transcription comme NF- κ B et AP-1 induisant une réduction dans la production de diverses molécules microbicides telles que l'oxyde nitrique. (Contreras *et al.*, 2010; Isnard *et al.*, 2012) Une autre fonction de la protéase dans la modulation de l'environnement du macrophage est la régulation à la baisse de la synthèse de certaines protéines par le clivage de mTOR ce qui permet l'activation du répresseur de la translation 4E-BP1 et donc l'inhibition du complexe mTORc. Cette activation de 4E-BP1 permet de réduire l'induction de la synthèse d'IFN de type 1. (Jaramillo *et al.*, 2011)

Dans le cas du parasite *L. mexicana*, la cystéine peptidase B serait impliquée dans les modifications des PTPs et leurs effecteurs autant au stade promastigote qu'amastigote. (Abu-Dayyeh *et al.*, 2010) Cependant, une étude a démontré que CPB aurait un rôle dans la modulation de l'expression de GP63 chez *L. mexicana* et donc que les effets attribués à la cystéine seraient plutôt un effet indirect de CPB impliquant la métalloprotéase. (Casgrain *et al.*, 2016)

3.4 Modification de la réponse adaptative

Pour que le parasite puisse survivre dans son hôte, des modifications des cellules infectées sont nécessaires, mais le parasite doit aussi modifier la réponse adaptative afin d'éviter de se faire éliminer. Pour ce faire, le parasite utilise plusieurs moyens, dont le clivage du récepteur CD4 sur les cellules T. En effet, il a été démontré que les parasites *L. major* et *L. donovani* étaient capables de cliver directement le récepteur CD4 sur les cellules T humaines de manière GP63 dépendante. Ce clivage permettrait de diminuer l'activation de ces cellules suite à la présentation antigénique

puisque ce récepteur est essentiel durant cette activation. (Hey *et al.*, 1994) D'autres études sur ces deux parasites ont démontré qu'ils étaient capables d'inhiber la présentation antigénique croisée grâce au clivage de la SNARE VAMP8 par la métalloprotéase GP63. Ce clivage réduirait l'apport de la NADPH à la PV ce qui diminuerait l'acidification de celle-ci. Cette inhibition permettrait donc de réduire l'activation des cellules T cytotoxiques et protégerait les cellules infectées. (Matheoud *et al.*, 2013) Il a aussi été démontré que l'infection par le parasite diminuerait la présentation antigénique dépendante du CMH-II, mais cette fois-ci de manière VAMP8 indépendante. (Podinovskaia & Descoteaux, 2015)

En plus de cliver directement le CD4 et de réduire la présentation antigénique ce qui diminue l'activation des cellules T, *Leishmania* est capable de moduler les niveaux d'expression de certaines molécules de costimulation présentes sur les cellules infectées comme B7 ce qui a pour effet d'inhiber l'activation optimale des cellules T. D'autres études ont démontré que *L. major* pouvait moduler à la baisse les niveaux de CD40 ce qui avait pour effet de favoriser la différenciation des cellules T naïves en cellules Treg limitant l'infection et donc favorisant la progression de l'infection. (Campbell *et al.*, 1996; Kaye *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 2010)

Table 2. <i>Leishmania</i> intracellular survival factors and their role in <i>Leishmania</i> -macrophage interactions.		
Name	Description	Role in host-parasite interactions
LPG	Lipophosphoglycan	Activates MAPK, disrupts lipid rafts, ↑ TNF, ↑ IL-1β, ↑ IL-6, ↓ TLR9, ↓ recruitment of Syntaptotagmin V, NADPH oxidase and V-ATPase to PV, scavenges ROS, ↑ HO-1
GP63	Zinc-dependent metalloprotease	Activates PTPs, p130Cas, Cortactin, Caspase 3 ↓ miRNA-122, ↓ TNF, ↓ IL-12, ↓ NO, ↓ mTOR, ↓ AP-1
ISP	Inhibitor of serine peptidase	↓ Neutrophil elastase, ↓ trypsin, ↓ chymotrypsin, ↓ TLR4 activation, ↓ Protein kinase R activation
Prohibitin	Prohibitin ortholog	Interacts with host HSP70, ↑ parasite uptake
PKC-like	Protein Kinase C ortholog	↑ Parasite phagocytosis
ISCL	Inositol phosphosphingolipid phospholipase C-like	↑ Survival and replication
Aldolase	Fructose-bisphosphate aldolase	Activates SHP-1, ↓ acidification
MsrA	Methionine sulfoxide reductase A	↑ Resistance to ROS/RNI
ALO	Arabino-1,4-lactone oxidase/vitamin C biosynthesis	↑ Resistance to ROS/RNI, ↓ IL-12, ↓ TNF
TXNPx	Tryparedoxin peroxidase	Detoxifies ROS/RNI, ↓ NRAMP-1, Fe redistribution
Thioredoxin	ROS scavenging enzyme	Stabilizes PTPs, ↓ proinflammatory pathways
CPB	Cysteine protease	Activates PTPs, ↓ activation, ↓ NO
MIF	Macrophage migration inhibitory factor ortholog	Activates MAPK, ↓ apoptosis

Figure 1.9: Tableau résumé des différentes fonctions des facteurs de virulence du parasite

Le parasite possède de nombreux facteurs de virulence affectant différentes fonctions du macrophage et favorisant sa survie et sa différenciation (Podinovskaia & Descoteaux, 2015)

SECTION 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Éthique de pratique

La récupération de moelle osseuse des souris 129B6 a été effectuée en accord avec le protocole 1706-07 et l'isolation des cellules T CD8⁺ à partir des souris OT-I a été effectuée en respectant le protocole 1510-02, ces deux protocoles ont été autorisés par le *Comité Institutionnel de Protection des Animaux* de l'INRS-Centre Armand-Frappier Santé et Biotechnologie et respectent les recommandations de pratique sur les animaux du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA).

Anticorps

Pour le marquage des cellules T pour l'analyse par FACS, les anticorps CD3a-BV421 et CD8a-APC provenant de BD bioscience (#562600 et #553035 spécifiquement) et l'anticorps CD69-PE provenant de Thermofisher (#12-0691-82) ont été utilisés.

En ce qui a trait aux anticorps utilisés pour les immunobuvardage de type Western, l'anti-ovalbumine provient de Sigma (#C6534) et l'anticorps contre l'aldolase est un don du professeur Armando Jardim de l'Université McGill. Les anticorps secondaire anti-lapin et anti-souris, tant qu'à eux, proviennent de GE Healthcare (#NA934 et #NA9311).

Construction et purification de plasmide

Le plasmide pks Neo_SP.OVA, contenant les acides aminés 139 à 386 de l'ovalbumine, nous a été fourni par le laboratoire du professeur David L. Sacks. (Bertholet *et al.*, 2005)

Le plasmide purifié pks Neo_SP.OVA a été obtenu en isolant l'ADN extrachromosomal de bactérie contenant le plasmide à l'aide du QIAGEN plasmid maxi kit (#12163, Qiagen) en suivant les instructions du manufacturier.

Culture cellulaire

Les promastigotes de l'espèce sauvage *L. mexicana* (MNYC/BZ/62/M379) ont été mis en croissance à 26°C dans du milieu Leishmania (Medium 199 avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (SVF) (hyclone), 40 mM HEPES pH 7.4 (Bioshop), 100 µM hypoxanthine (Sigma), 5 µM hémimine, 3 µM biopéridine (Sigma), 1 µM biotin (Sigma), 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml streptomycine (Gibco)). Les différents mutants ont été cultivés en présence de la dose de sélection d'antibiotique comme indiqué dans le tableau 1. Les parasites *L. mexicana* Δ CPB et *L. mexicana* Δ CPB+CPB nous ont été offerts par le professeur Mottram. (Denise *et al.*, 2003)

Souche de parasite	Nom utilisé	Dose d'antibiotique utilisée
<i>L. mexicana</i> WT	<i>L. mex</i> WT	Ø
<i>L. mexicana</i> Δ CPB	<i>L. mex</i> KO	50 µg/ml Puromycine
<i>L. mexicana</i> Δ CPB+CPB	<i>L. mex</i> RE	50 µg/ml Hygromycine
<i>L. major</i> NIH WT	NIH WT	Ø

Tableau 2.1: concentration d'antibiotique utilisée lors de la culture des parasites

Les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDC) provenant des fémurs et tibias de souris 129XB6 âgées de 8 à 10 semaines ont été cultivées pendant 7 jours en pétri non-adhérent dans du milieu RPMI-1640 (Gibco) en présence de 10% v/v SVF, 10 % v/v de milieu conditionné par les cellules X63 (P3X63Ag8.653) utilisé comme source de GM-CSF, 10 mM HEPES (Bioshop) 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml streptomycine (Gibco). Au jour 3, du milieu frais a été ajouté puis, au jour 7, le surnageant contenant les cellules dendritiques a été récupéré et mis en plaque durant 16h dans un milieu de culture contenant seulement 5% v/v GM-CFS et 10% SVF avant de procéder aux infections.

Les hybridomes T CD8⁺ spécifiques à l'ovalbumine (B3Z) (provenant de W. Heath, Université de Melbourne, donnés par D. Matheoud, Université de Montréal) (Karttunen *et al.*, 1992; Matheoud *et al.*, 2013) ont été cultivées en milieu RPMI-1640 suppléé avec 10% v/v SVF, 3% v/v GM-CSF, 10 mM HEPES et les mêmes concentrations d'antibiotique que précédemment. Les cellules ont été mise en culture en suspension dans des flasques spécialisées à 37°C en présence de 5% CO₂ et utilisées à une concentration cellulaire entre 0,4 et 0,8 million/ml.

Isolation de cellules T CD8+

La rate d'une souris OT-I (Clarke *et al.*, 2000) a été homogénéisée dans 20 ml de PBS avant d'être centrifugée à 310g pendant 7 minutes à 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées avec 10 ml de tampon MACS (PBS 1x, SVF 1% v/v et EDTA 5mM) avant d'être remises en suspension dans 180 µL de tampon MACS froid. 30 µL du mélange d'anticorps provenant du kit CD8a+ T Cell Isolation Kit (Miltenyi) a ensuite été ajouté aux cellules avant de les laisser cinq minutes sur glace. 60 µL des microbilles anti-biotin ont ensuite été ajoutées, provenant du même kit, puis laissées sur glace 10 minutes. Par la suite, les cellules ont été lavées avec 10 ml de tampon MACS avant d'être remises en suspension dans 1mL de tampon MACS froid.

Afin de séparer les cellules T CD8⁺ des autres cellules, des colonnes LD (Miltenyi) ont été équilibrées avec le tampon MACS avant de rajouter les cellules. Puisque la méthode de séparation utilisée est considérée négative, les cellules d'intérêt sont celles qui n'adhèrent pas aux billes magnétiques. Les colonnes sont lavées deux fois avec le tampon et la fraction contenant les cellules T CD8⁺ est récupérée.

Les cellules sont utilisées immédiatement après l'isolation.

Électroporation

Afin d'effectuer l'électroporation des parasites, nous les avons mis en flasque à une concentration de 1×10^6 /ml et laissés en culture jusqu'à ce qu'ils atteignent une concentration entre $4-10 \times 10^6$ /ml. Ils ont ensuite été lavé une fois dans le tampon d'électroporation (21 mM HEPES pH=7.5, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na₂PO₄ et 6 mM Glucose) puis remis en suspension à une concentration de 1×10^8 promastigotes/ml dans le même tampon et laissés sur glace 10 minutes.

Pour l'électroporation en tant que tel, un Gene Pulser®II (Biorad) a été utilisé avec des cuvettes de 0.2cm (Biorad). 4×10^7 promastigotes ont été mélangés à 10 µg d'ADN pour chaque condition et électroporés à 0.45kV et 500 µF. Ils ont ensuite été mis sur glace 10 minutes avant d'être mis en culture sans antibiotique. (Kapler *et al.*, 1990) Vingt-quatre heures plus tard, nous avons ajouté les doses d'antibiotiques requises afin d'effectuer notre sélection. Elles sont représentées dans le tableau 2.

Nom du mutant	Parasite utilisée	Plasmide utilisé	Dose d'antibiotique utilisée
L. mex WT + OVA	<i>L. mexicana</i> WT	pksNeo_SP.OVA, clone# 610	50 µg/ml Néomycine
L. mex KO + OVA	<i>L. mexicana</i> Δ CPB	pksNeo_SP.OVA, clone# 610	50 µg/ml Néomycine + 50 µg/ml Puromycine
L. mex RE + OVA	<i>L. mexicana</i> Δ CPB+CPB	pksNeo_SP.OVA, clone# 610	50 µg/ml Néomycine + 50 µg/ml Hygromycine
L. major NIH + OVA	<i>L. major</i> NIH WT	pksNeo_SP.OVA, clone# 610	10 µg/ml Néomycine

Tableau 2.2: Concentration d'antibiotique utilisée pour sélectionner les parasites OVA

Survie cellulaire

Afin de vérifier la survie de nos différents parasites dans les cellules, nous avons infecté des BMDC avec les parasites pour une durée variant de 6h à 72h. Pour ce faire, nous avons préparées les cellules dendritiques comme mentionné précédemment, mais au moment de les mettre en plaque de 24 puits (Trueline) nous avons mis des lamelles de microscopie (#12-545-81, Fisherbrand) au fond des puits sur lesquels les cellules vont s'adhérer. Le jour de l'infection, nous avons commencé par préparer les parasites. Pour ce faire, nous avons récupérés les

parasites en fin de phase logarithmique puis nous les avons lavés deux fois avec du PBS avant de les opsoniser pendant 30 minutes à 37°C avec du sérum de souris DBA/2 (sérum de souris déficientes en protéine C5 du complément). Les parasites ont ensuite été lavés deux fois avec du PBS avant d'être remis en suspension dans du milieu RPMI-1640. Les parasites ont été ajoutés aux cellules à un ratio de 1 :10 (cellules : parasites). Afin de synchroniser l'infection, les plaques ont été mises à 4°C pendant 10 minutes avant d'être centrifugées à 1000 RPM pendant 1 minute. Nous avons ensuite mis les plaques à 34°C en présence de 5% CO₂. Au temps 2h, les plaques ont été lavées avec du milieu RPMI-1640 deux fois avant de remettre du milieu frais afin de retirer les parasites n'ayant pas été phagocytés par les cellules. Au temps 6h, 24h, 48h et 72h nous avons procédé à un marquage Giemsa afin d'évaluer la survie des parasites.

Marquage Giemsa

Afin de visualiser et compter les parasites à l'intérieur de nos cellules nous avons tout d'abord laver nos lamelles avec du PBS deux fois. Les lamelles ont ensuite été fixées avec une solution à base de méthanol puis marquées avec deux solutions de colorations successives afin de marquer le cytosol et les noyaux des cellules. Pour ce faire, le système de coloration Protocol™ Hema 3™ (Fisher) a été utilisé. Les lamelles ainsi marquées ont ensuite été déposées sur une goutte de Fluoromount G (Fisher) sur des lames de microscopie puis scellées avec du vernis. Les comptes ont été effectués à l'aide d'un microscope optique.

Préparation de billes de polystyrène

Des microbilles de polystyrène de 800 nm (Sigma) ont été lavées deux fois avec du PBS 1x avant d'être remises en suspension dans une solution de 10mg/ml d'albumine d'œuf de poulet (ovalbumine) (Sigma). Elles ont été laissées à 4°C sur rotor durant toute une nuit. Le lendemain, les billes ont été lavées deux fois avec du PBS 1x puis remises en suspension dans le milieu approprié.

Présentation antigénique croisée par colorimétrie

Les cellules ont été obtenues et préparées comme précédemment avant d'être mises en plaque de 96 puits à fond rond (Sarstedt) au nombre de 150 000 cellules/puit, puis laissées à 37°C durant toute une nuit en présence de 5% CO₂. Le jour de l'infection, les parasites Mex WT, Mex KO, Mex RE et NIH WT ont été récupérés durant leur phase fin logarithmique puis lavés deux fois dans du PBS 1x avant d'être opsonisés dans le sérum de souris DBA/2 10% v/v pendant 30 minutes à 37°C. Ils ont ensuite été lavés trois autres fois avec du PBS 1x avant d'être remis en suspension dans le milieu RPMI-1640 suppléé de 10% SVF et 5% GM-CSF. Les cellules ont ensuite été infectées avec les parasites à un ratio de 1 :10 (cellule : parasites) selon le schéma de la figure 2.1 puis les plaques ont été mises à 34°C pendant 2h.

Au temps 2h, les plaques ont été lavées deux fois avec du milieu RPMI-1640 avant de rajouter les billes recouvertes d'ovalbumine aux puits. Pour les puits sans billes, du milieu RPMI-1640 suppléé avec 10% v/v SVF et 5% GM-CSF frais a été ajouté au lieu des billes. Pour les plaques d'infection de plus longue durée, ici 48h, les puits ont été lavés deux fois avec le milieu puis du milieu frais a été ajouté, les billes ont été rajoutées 4h avant la fin du temps d'incubation. Les plaques ont été remises à 34°C pendant 4h.

Au temps 6h, les plaques ont été centrifugées à 1500 RPM pendant 5 minutes puis le surnageant a été retiré par inversion. Les cellules ont ensuite été fixées avec une solution de formaldéhyde (PFA) (ThermoFisher) 1% pendant 10 minutes à température ambiante. Les plaques ont été lavées trois fois avec une solution de RPMI-1640 suppléé de 10% v/v SVF et 0.1M glycine (Bioshop) afin d'inactiver le formaldéhyde. Par après, 0.1 million de cellules B3Z ont été ajoutées à chaque puit afin d'effectuer la présentation antigénique croisée en tant que telle. Comme contrôle positif, 50ng du peptide SIINFEKL (Anaspec) a été ajouté à certains puits en même temps que les cellules B3Z. Les plaques ont ensuite été mises à 37°C pendant 16h.

Après le temps d'incubation, les plaques ont été centrifugées à 1500 RPM pendant 5 minutes puis lysées avec un tampon de lyse à base de triton (0.5% v/v Triton (Sigma), 1.9mM DCTA (Sigma), 25mM Tris (Bioshop), 3mM DTT (Invitrogen) et 10% v/v glycérol (Bioshop)) pendant 15 minutes à température pièce. Afin de détecter la présence de β -galactosidase produite par les cellules B3Z, une solution de colorimétrie Chlorophenol Red- β -D-galactopyranoside (CPRG) a été utilisée. Cette solution est composée du tampon de détection (100mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 8.8mM KCl, 0.90mM MgSO₄) et de 0.43mM CPRG (Sigma). Les plaques ont été mise à 37°C pendant 3h avant d'être centrifugées 10 minutes à 3000 RPM puis le surnageant a été

transféré dans une nouvelle plaque de 96 puits à fond plat (TrueLine). Une lecture de la colorimétrie a été prise à l'aide d'un lecteur de plaque à la longueur d'onde de 570nm. Pour les infections à long terme, les billes ont été ajoutées 4h avant la fin de l'infection, c'est-à-dire à 44h post infection dans ce cas-ci. Le reste de l'expérience se déroule comme au temps 6h.

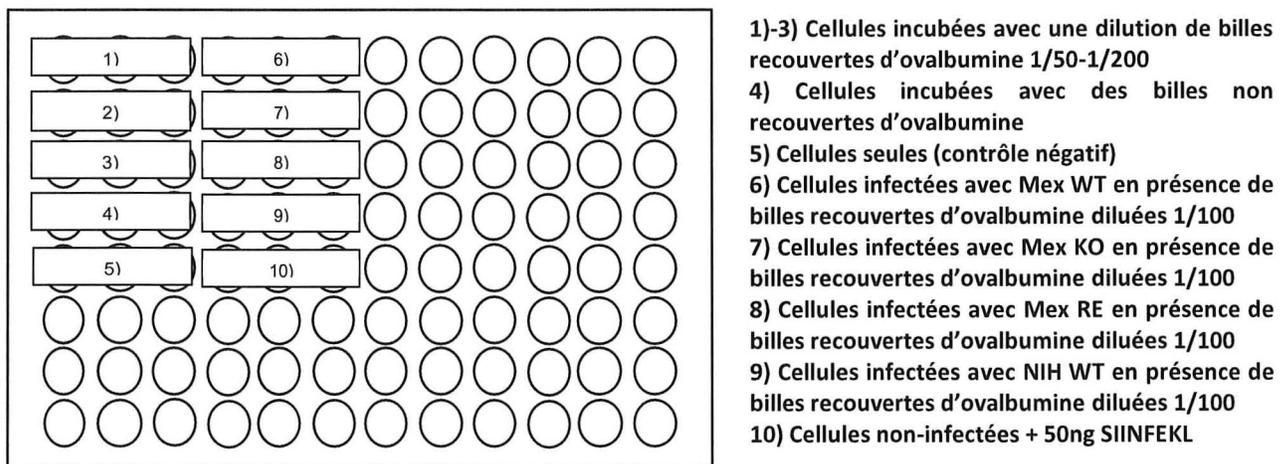


Figure 2.2: Modèle d'infection *in-vitro* pour la présentation antigénique croisée

Présentation antigénique croisée avec cellules OT-I

L'infection est identique à celle impliquant les cellules B3Z, cependant, les parasites utilisés possédaient le plasmide contenant l'ovalbumine et les cellules mises après la fixation sont des cellules T CD8⁺ provenant de souris OT-I qui au lieu des hybridomes B3Z. Après l'incubation de 16h, afin de voir l'activation des cellules T, celles-ci ne sont pas lysées, elles sont plutôt récupérées et marquées afin de pouvoir analyser leur activation par cytométrie en flux (FACS) à l'aide du marqueur CD69.

Marquage pour cytométrie en flux

Les cellules ont été transférées dans des tubes pour FACS avant d'être lavées avec le tampon de FACS (PBS 1x, EDTA 5mM, sodium azide 0.1% v/v et 1% v/v sérum de cheval (Sigma)) puis centrifugées à 310g pendant 7 minutes à 4°C. Le surnageant a ensuite été jeté puis les cellules ont été remises en suspension dans 10 µL du mélange d'anticorps (CD3-BV421, CD8-APC et CD69-PE, tous à une concentration de 1 :400) puis laissées 20 minutes sur glace. Les cellules ont été lavées une fois avec le tampon FACS puis fixées avec 2% PFA pendant 15 minutes sur glace. Pour terminer, les cellules ont été lavées une dernière fois avec le tampon de FACS avant d'être analysées par cytométrie en flux à l'aide d'un LSRFortessa™ (BD bioscience).

Lyse cellulaire et dosage de protéine

Les parasites en phase fin logarithmique ont d'abord été mis sur glace puis lavé deux fois avec du PBS contenant 1mM sodium orthovanadate (Sigma) et 5 mM 1,10-phenanthroline (Roche). Ils ont été ensuite remis en suspension dans le tampon de lyse contenant 1% Nonidet P-40 (Caledon), 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8 (bioshop), 5 mM 1,10-phenanthroline et des inhibiteurs de phosphatase et protéase (Roche). Les échantillons ont été laissés 10 minutes sur glace avant d'être « soniqués » 30 secondes à deux reprises afin d'améliorer la lyse. Ils ont été laissés à -80°C pour au moins 24h avant d'effectuer le dosage de protéine.

Afin de doser les échantillons, ils ont tout d'abord été décongelés sur glace puis centrifugés 15 minutes à 21 000G afin de se débarrasser des débris non solubles. Le surnageant a ensuite été mis dans de nouveaux tubes. Le dosage de protéine a été effectué en utilisant le Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Scientific™) et en analysant le résultat de colorimétrie obtenu en lisant la densité optique à 560 nm avec un lecteur de plaque.

Électrophorèse et Western blot

Afin de préparer les échantillons pour la migration, 15 µg de protéines ont été mis dans un tampon Laemmli contenant du SDS et DTT puis bouilli à 100°C durant 6 minutes. Nous les avons ensuite fait migrer dans un gel d'acrylamide SDS-PAGE de 10%. Les protéines ont été transférées sur des membranes Hybond-ECL de nitrocellulose (GE Healthcare) pendant 30 minutes à 16V à l'aide d'un appareil « Trans-Blot SD semi-dry transfer cell » (Biorad). Celles-ci ont été bloquées pendant 1h à l'aide de TBS-Tween 0.1% contenant 5 % de lait puis incubées avec l'anticorps primaire (soit anti-ovalbumine ou anti-aldolase) durant une nuit à 4°C sous agitation. Par la suite, les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire liée à HRP correspondant (soit anti-lapin ou anti-souris) pendant 1h à température ambiante. Les membranes ont ensuite été révélées par chimioluminescence à l'aide de films radiographiques. Les membranes ont été lavées 2 fois entre chaque étape dans du TBS-Tween 0.1%.

Analyses statistiques :

Les différences statistiques ont été calculées à l'aide du test « t test » en utilisant le programme Graphpad Prism version 5.0. Les résultats avec un $P < 0.05$ étaient considérés comme statistiquement significatifs. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

3.1 Survie des différentes souches de *Leishmania mexicana* dans les cellules dendritiques

Avant de commencer nos expériences sur la présentation antigénique, nous devions nous assurer que nos diverses souches de *Leishmania mexicana* étaient capables de survivre et proliférer dans les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDC). Pour ce faire, nous avons infecté des BMDC avec nos différents parasites qui avaient été opsonisés en présence de sérum de souris DBA/2. Après 2h d'infection, les cellules ont été lavées avec du milieu frais afin de retirer les parasites n'ayant pas été internalisés puis l'infection a été poursuivie jusqu'à différents temps, ici 6h, 24h, 48h, 72h post infection. Par la suite, nous avons fixé les cellules et les avons colorées par coloration Giemsa afin de pouvoir compter le nombre de parasites par cellule. Comme le montre la figure 3.1, tous les parasites survivent dans les cellules et, durant les temps courts, il n'y a pas de variation dans le nombre de parasite par cellule, mais plus on avance dans l'infection, plus la souche sauvage croît rapidement en comparaison aux mutants Δ CPB et Δ CPB+CPB.

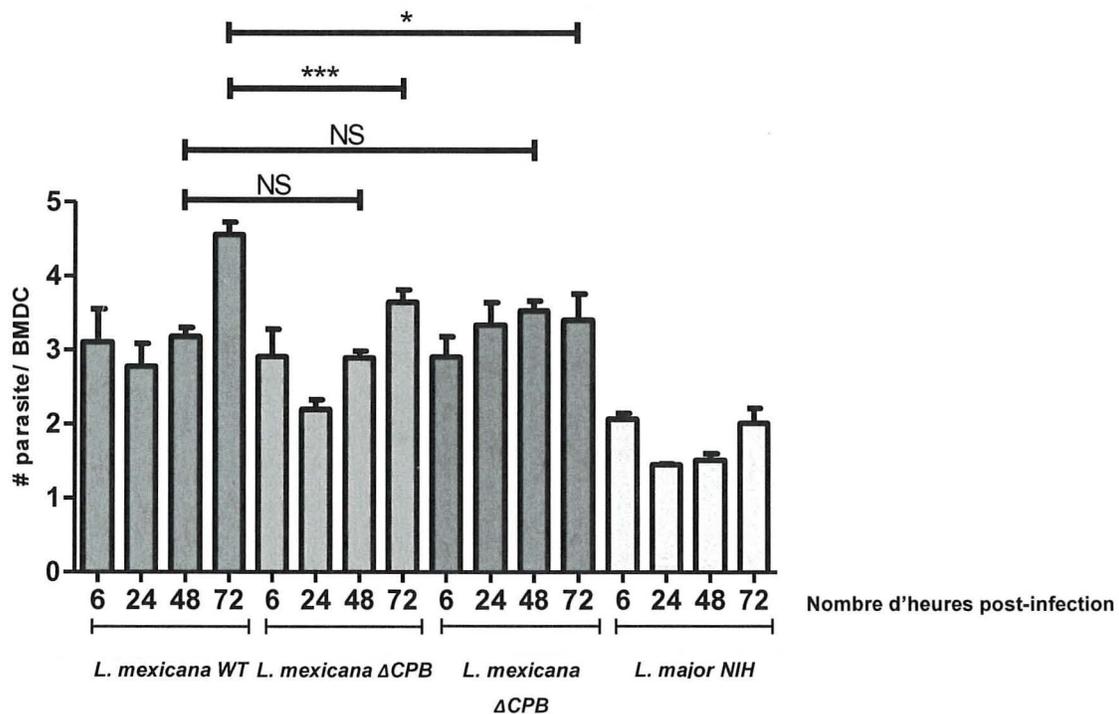


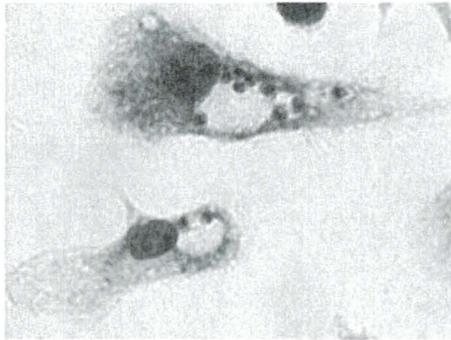
Figure 3.1 : Survie des différentes souches de *Leishmania mexicana* dans les cellules dendritiques

Des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse ont été infectées avec des parasites en phase stationnaire dans un ratio de 10 parasites par cellule pour différents temps d'incubation (6-24-48-72h). Les cellules ont ensuite été fixées et marquées par coloration de Giemsa. Les comptes de survie ont été effectués en comptant le nombre de parasite total dans 300 cellules réparties sur 3 lamelles à l'aide d'un microscope optique. L'expérience a été effectuée en triplicata. *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 NS : non significatif

3.2 Formation des vacuoles par les parasites dans les cellules dendritiques

Après avoir vérifié que nos parasites étaient capables de survivre dans les cellules dendritiques, nous voulions nous assurer qu'après 48h d'infection ils étaient capables de former des vacuoles communes. Pour ce faire, nous avons infecté nos cellules comme précédemment, puis, après le marquage, nous avons utilisé un microscope optique équipé d'une caméra afin de visualiser et capturer les images des vacuoles en utilisant le logiciel QCapture Pro™. Nous pouvons observer que toutes les souches de *L. mexicana* (figure 3.2 A-B-C) sont aptes à former des vacuoles communes et que *L. major* NIH forme des vacuoles individuelles comme prévu (figure 3.2 D).

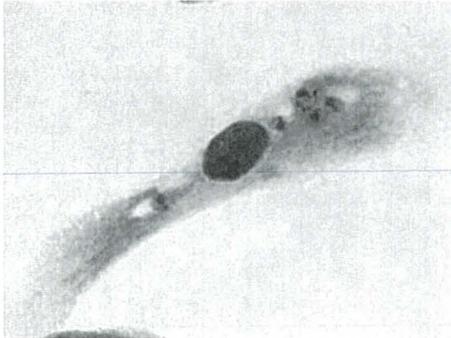
A)



B)



C)



D)



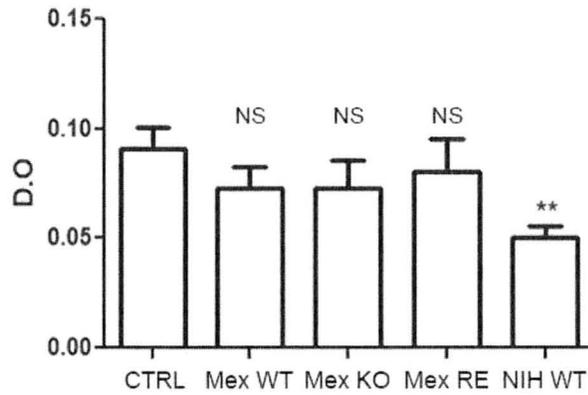
Figure 3.2 : Formation des vacuoles par les parasites dans les cellules dendritiques

Des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse ont été infectées avec les parasites *L. mexicana* WT (A), *L. mexicana* Δ CPB (B), *L. mexicana* Δ CPB + Δ CPB (C) ou *L. major* NIH (D) en phase stationnaire dans un ratio de 10 parasites par cellule pendant 48h. Les cellules ont ensuite été fixées et colorées à l'aide du système de coloration Protocol™ Hema 3™. Les images représentatives ont été prise à l'aide du logiciel QCapture Pro™.

3.3 L'inhibition de la présentation antigénique croisée par *Leishmania mexicana* n'est pas dépendante de la cystéine peptidase B

Après s'être assuré que nos parasites étaient viables et qu'ils formaient bel et bien des vacuoles communes aux conditions choisies, nous avons voulu regarder si *L. mexicana* était capable d'influencer la présentation antigénique croisée au niveau de la cellule entière. Pour ce faire, nous avons infecté des BMDC avec nos différentes souches de parasite puis 4h avant de fixer nos cellules, nous avons ajouté des billes recouvertes d'ovalbumine aux cellules afin qu'elles les phagocytent et qu'elles puissent dégrader et présenter le peptide de l'ovalbumine à leur surface. Une fois les cellules fixées, après 6 ou 48h post-infection, nous avons ajouté des hybridomes de cellules T appelée B3Z T cells. Ces cellules sont spécifiques au complexe du CMH-I lié au peptide SIINFEKL et lorsqu'elles sont activées en reconnaissant le complexe, elles produisent de la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur à l'IL-2. Par la suite, nous avons pu lyser ces cellules T et détecter la β -galactosidase à l'aide d'un produit de colorimétrie, le Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside. Ce produit change de couleur lorsque dégradé par la β -galactosidase et ce changement de coloration peut ensuite être quantifié par densité optique. Au temps 6h, seul le parasite *L. major* modifie à la baisse la présentation antigénique croisée alors les souches de *L. mexicana* n'ont pas d'effet sur celle-ci (Figure 3.3 A). Cependant, au temps 48h, une fois les vacuoles communes formées, nous pouvons observer que *L. mexicana* inhibe la PAC, mais la présence ou non de CPB ne semble pas avoir d'effet sur cette inhibition. Encore une fois, *L. major* est capable d'inhiber la présentation antigénique croisée de manière plus prononcée que *L. mexicana* dans notre système.

A)



B)

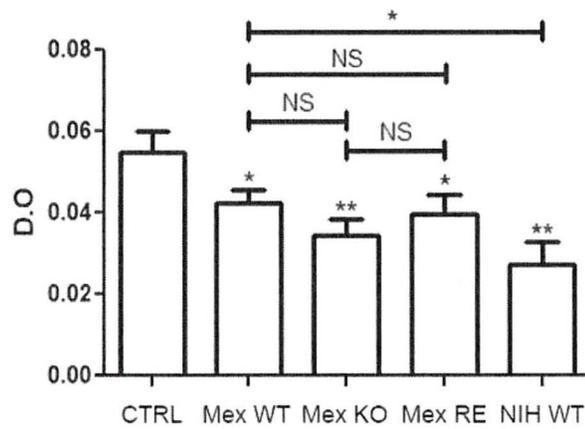


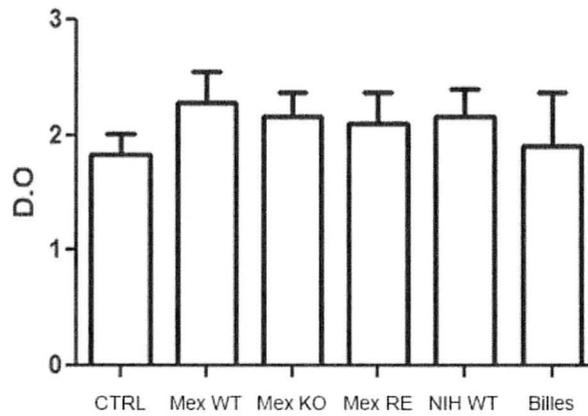
Figure 3.3 : L'inhibition de la présentation antigénique croisée par *L. mexicana* n'est pas CPB dépendante

Des cellules dendritiques ont été infectées avec les différentes souches de *L. mexicana* (WT, Δ CPB(KO) et Δ CPB + Δ CPB(RE)) ou *L. major* NIH (NIH WT) en présence de billes recouvertes d'ovalbumine pendant 6h (A) ou 48h (B). Les cellules ont ensuite été fixées par paraformaldéhyde et des hybridomes B3Z ont été ajoutés aux puits. Les cellules ont ensuite été lysées et le produit de coloration CPRG a été ajouté. La dégradation de CPRG a été analysée par densité optique à l'aide d'un lecteur de plaque à une longueur d'onde de 570nm. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ NS : Non significatif

3.4 *Leishmania* ne diminue pas la présence du CMH-I à la surface de la cellule

Après avoir observé que tous nos parasites pouvaient inhiber la présentation antigénique croisée, nous avons voulu vérifier si l'effet était dû à une diminution de la quantité de CMH-I à la surface de la cellule puisqu'un nombre plus faible de complexe peut causer une activation réduite. Pour ce faire, nous avons infecté nos cellules dendritiques avec nos différents parasites puis, à 6 ou 48h, nous les avons fixées. Une fois les cellules fixées, nous avons ajouté le peptide SIINFEKL purifié aux puits. Ce peptide est composé de 8 acides aminées formant la séquence qui est reconnu lorsque l'ovalbumine est dégradée puis présentée sur les CMH. Cependant, contrairement à l'ovalbumine, ce peptide peut se lier directement aux CMH à la surface de la cellule sans passer par tout le processus d'endocytose, dégradation et présentation. Nous pouvons ensuite étudier les niveaux de CMH grâce à l'activation des B3Z comme lors de l'expérience précédente. Comme l'indique la figure 3.4, à 6h et à 48h, les niveaux d'activations des cellules B3Z sont similaires indiquant une quantité de CMH-I à la surface semblable dans toutes les conditions. Ces données indiquaient donc que l'inhibition observée n'affectait pas la présence des complexes à la surface ni leur intégrité, mais affectait plutôt un ou plusieurs autres mécanismes intracellulaires.

A)



B)

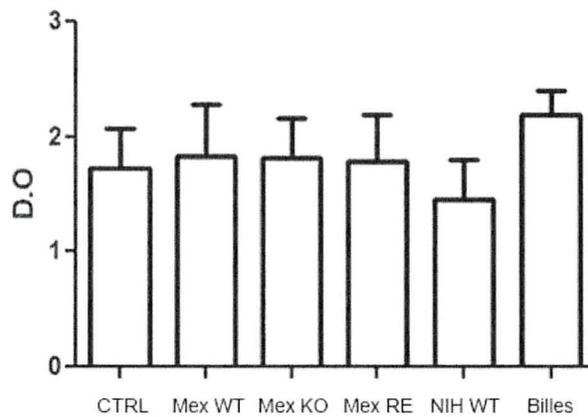


Figure 3.4 : *Leishmania* ne diminue pas la présence du CMH-I à la surface de la cellule

Des cellules dendritiques ont été infectées avec les différentes souches de *L. mexicana* (WT, Δ CPB(KO) et Δ CPB + Δ CPB(RE)), *L. major* NIH (NIH WT) ou incubées en présence de billes pendant 6h (A) ou 48h (B). Les cellules ont ensuite été fixées par paraformaldéhyde et des hybridomes B3Z ainsi que le peptide SIINFEKL ont été ajoutés aux puits. Les plaques ont été laissées à 37°C pendant 16h avant d'être lysées. Le produit de coloration CPRG a ensuite été ajouté, puis la densité optique a été lue à l'aide d'un lecteur de plaque à une longueur d'onde de 570nm. CTRL : cellules seulement incubées avec SIINFEKL + B3Z

3.5 Confirmation de l'expression d'ovalbumine par les différents mutants de *Leishmania*

Durant nos expériences précédentes, nous avons pu observer que l'absence de CPB n'avait pas d'influence sur les modifications induites au niveau de la PAC lorsqu'on observait la cellule entière après avoir ajouté des billes recouvertes d'ovalbumine durant une infection par *L. mexicana*. Nous voulions donc savoir si CPB pouvait avoir un rôle sur la présentation des protéines du parasite directement. Dans cette optique, nous avons transfecté nos parasites avec un plasmide contenant la séquence ovalbumine sous le promoteur du LPG afin qu'ils puissent produire la protéine constitutionnellement. Pour vérifier si nos parasites exprimaient bien l'ovalbumine et que les niveaux entre les souches étaient similaires, nous avons lysé nos parasites avant d'analyser les niveaux de protéine par immunobuvardage de type Western. Nous avons ainsi pu démontrer que tous nos parasites exprimaient la protéine désirée et que les niveaux étaient relativement similaires, à l'exception de la souche sauvage qui exprime un peu plus la protéine. Après avoir obtenu ces parasites, nous avons pu poursuivre nos expériences.

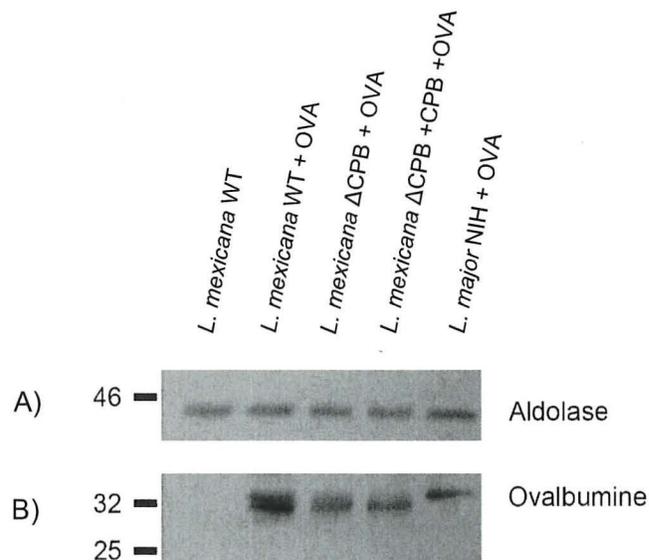


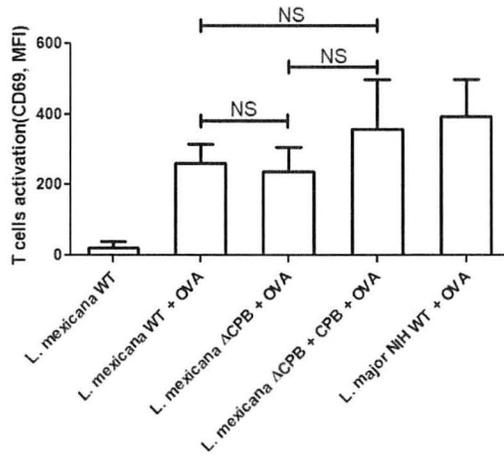
Figure 3.5 : Confirmation de l'expression d'ovalbumine par les différents mutants de *Leishmania*

100M de parasite en fin de phase logarithmique par souche ont été lysées, puis dosés avant d'être chargés dans un gel d'acrylamide 10% dénaturant. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose puis ces membranes ont été bloquées à l'aide d'une solution de lait 5%. Après le blocage, un anticorps anti-ovalbumine (B) ou anti-aldolase (A) a été mis durant la nuit puis un anticorps secondaire couplé à une peroxydase a été ajouté. Pour révéler les bandes des protéines d'intérêt, une solution de ECL a été utilisée en combinaison avec des films radiologiques.

3.6 La cystéine peptidase B n'a pas d'effet sur la présentation antigénique croisée des protéines du parasite

Après avoir obtenu nos parasites exprimant l'ovalbumine, nous avons pu vérifier si la présentation antigénique croisée des protéines du parasite était modifiée. Nous avons encore une fois infecté nos cellules dendritiques avec les parasites cette fois-ci exprimant ou non l'ovalbumine puis, après 6 ou 48h, nous avons fixé les cellules. Cependant, au lieu d'ajouter des cellules B3Z comme précédemment, nous avons ajouté des cellules T provenant de souris transgéniques OT-I (Clarke *et al.*, 2000). Ces cellules T sont aussi spécifiques au peptide SIINFEKL, mais avec une sensibilité plus grande que les B3Z. En effet, lorsque nous analysons la PAC des parasites avec les B3Z, nous ne pouvons détecter aucune expression (résultats non présentés) alors qu'avec les cellules OT-I, les niveaux d'activation étaient détectables. Les cellules sont laissées 16h en présence des cellules dendritiques infectées avant d'être récupérées. Elles sont ensuite marquées avec les marqueurs cellulaires CD3, CD8 et CD69 avant d'être fixées à leur tour. L'activation de ces cellules T est ensuite analysée par cytométrie en flux en observant le pourcentage de cellule positive pour le marqueur CD69, un marqueur d'activation de ces cellules. Nous pouvons observer autant à 6h qu'à 48h post-infection (figure 3.6 A et B respectivement) que le niveau d'activation des cellules T, évaluée par l'intensité moyenne de fluorescence, ne varie pas de manière significative entre les trois souches de *L. mexicana* ce qui nous indique que la cystéine peptidase B n'est pas impliquée dans la présentation antigénique croisée.

A)



B)

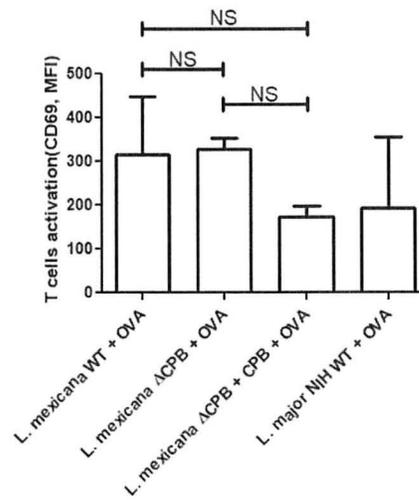


Figure 3.6 : CPB n'a pas d'effet sur la présentation antigénique croisée des protéines du parasite

Des cellules dendritiques ont été infectées avec les différents mutants de *L. mexicana* transfectés avec l'ovalbumine (WT, ΔCPB(KO) et ΔCPB + ΔCPB(RE)) ou *L. major* NIH WT à un ratio 10 parasites : cellule pendant 6h (A) ou 48h (B). Les cellules ont ensuite été fixées par paraformaldéhyde et des cellules T provenant de souris OT-I spécifiques à l'ovalbumine ont été ajoutées aux puits pendant 16h. Les cellules ont ensuite été récupérées, marquées avec des anticorps anti-CD8, anti-CD3 et anti-CD69 puis fixées. L'activation des cellules T a été analysée par les niveaux de CD69 à l'aide d'un appareil de cytométrie en flux. L'expérience a été reproduite en triplicata et chaque expérience était composée de trois échantillons par condition. * $p < 0.05$ NS : non significatif

4- DISCUSSION

La Leishmaniose est un ensemble de maladies caractérisée par de multiples symptômes variables selon l'espèce de parasite *Leishmania spp.* impliquée. En effet, cette maladie peut être présente sous forme de lésions cutanées se résorbant par elles-mêmes, ou bien sous forme viscérale où principalement le foie et la rate sont affectés et causant la mort dans la majorité des cas. Lorsque le parasite est inoculé à un hôte mammifère, il va infecter de nombreuses cellules dont les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques. Afin de survivre dans ces cellules, le parasite modifie le phagosome initial afin de former une vacuole parasitophore propice à sa survie et sa multiplication. Cette PV peut être étroite et individuelle ou bien vaste et communale selon l'espèce concernée. Les mécanismes impliqués dans la formation de ces deux types de vacuoles varient beaucoup, mais ne sont pas complètement compris à ce jour, surtout dans le cas des souches communales. Cependant, il est connu que plusieurs facteurs de virulence du parasite tels que LPG, GP63 ainsi que CPB sont impliqués à divers degrés selon l'espèce du parasite.

L'infection par le parasite ainsi que la formation des vacuoles induisent de nombreuses variations dans la réponse normale du système immunitaire afin que le parasite ne soit pas éliminé. Un des mécanismes affectés est la présentation antigénique croisée. Ce mécanisme permet normalement aux phagocytes, principalement les cellules dendritiques, de phagocyter des cellules infectées par des agents pathogènes, de dégrader les antigènes présents et de les présenter aux cellules T CD8⁺ grâce à leur CMH-I afin d'induire une activation de ces cellules naïves qui pourront par la suite reconnaître ces antigènes à la surface des cellules infectés et induire une réponse cytotoxique afin de les éliminer. Il a été démontré précédemment par Matheoud et al. que les parasites *Leishmania major* et *Leishmania donovani*, des espèces formant des vacuoles individuelles, étaient capables d'inhiber la présentation antigénique croisée et que cette inhibition résultait du clivage de la SNARE Vamp8 par la métalloprotéase GP63.(Matheoud *et al.*, 2013) Cependant, il n'y a pas d'étude observant si les espèces communales, telle que *Leishmania mexicana*, induisaient aussi cette inhibition. C'est donc ce que nous avons voulu explorer.

Il y a quelques années, le professeur Mottram a étudié divers effets que causait le retrait de CPB chez *L. mexicana*. Il a entre autres découverts qu'en absence de CPB, les lésions causées par le parasite *in vivo* étaient réduites en taille et guérissait plus rapidement que lorsque le parasite sauvage était utilisé.(Mottram *et al.*, 1996) Il a aussi observé que plusieurs copies du gène étaient

nécessaires afin de maintenir l'activité et qu'il était possible de récupérer un phénotype similaire à celui de la souche sauvage lorsqu'on introduisait un plasmide contenant plusieurs copies de CPB.(Denise *et al.*, 2003) Nous nous sommes donc demandé si cette protéase pouvait avoir un rôle dans la présentation antigénique croisée possiblement en la diminuant ce qui permettrait de réduire la réponse inflammatoire et donc permettrait au parasite de survivre plus longtemps.

Les travaux effectués dans le cadre de ce mémoire avaient donc deux objectifs principaux. Premièrement, nous voulions déterminer si les parasites formant des vacuoles communales, ici *Leishmania mexicana*, étaient capables d'inhiber la présentation antigénique croisée au même niveau que les parasites formant des vacuoles individuelles, ici *Leishmania major*, et si cette possible inhibition était contrôlée par la cystéine peptidase B.

Pour commencer, il a été démontré que les parasites *Leishmania mexicana* mutants pour CPB sont capables de survivre dans les macrophages, mais que les souches ne possédant pas CPB ne se multipliaient pas aussi rapidement que les souches sauvages et que les parasites dans lesquels CPB a été réinséré.(Mottram *et al.*, 1996) Cependant, ces études de survies n'ont pas été faites dans les cellules dendritiques, c'est donc la première chose que nous avons vérifié.

Comme indiqué à la figure 3.1, tous nos parasites survivent à l'intérieur des cellules dendritiques. Cependant, après 72h d'infection, la souche sauvage se multiplie plus rapidement que les autres souches. Afin d'éviter que les effets potentiels observés soient dû à un plus grand nombre de parasite dans les cellules et non un effet découlant de la présence ou non de CPB, nous avons décidé de limiter le temps d'infection à 48h. Comme démontré à la figure 3.2, ce temps d'infection est suffisant pour permettre la formation des vacuoles communales tout en maintenant un nombre de parasite par cellule ne variant pas d'une souche à l'autre. Nous avons donc décidé de poursuivre nos expériences avec des temps d'infection de 6h et de 48h afin d'observer l'effet en début d'infection lorsque le parasite commence à établir sa PV et est encore sous forme de promastigote ainsi que l'effet lorsque le parasite est sous forme d'amastigote et que, dans le cas des espèces communales, les PV sont rendus vastes et spacieuses.

Après s'être assuré que les conditions choisies étaient propices à l'établissement des vacuoles communes et que nos parasites étaient capables de bien survivre dans les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse, nous avons voulu étudier si nos parasites pouvaient inhiber la présentation antigénique croisée au niveau de la cellule en entier. En effet, lors de l'infection par le parasite, les effets immunomodulateurs ne se limitent pas à la PV, mais affectent la cellule au complet.

Lorsque nous étudions ce qui se produit après 6h d'infection (figure 3.3 A), nous pouvons observer que l'infection par *Leishmania major* induit une diminution de la PAC en comparaison avec les cellules seulement incubées avec les billes recouvertes d'ovalbumine. Ce résultat correspond à ce qui avait été obtenu précédemment (Matheoud *et al.*, 2013) indiquant que l'expérience fonctionne correctement et que les résultats sont reproductibles. Cependant, lorsque nous observons ce qui se produit durant les infections avec nos différentes souches de *Leishmania mexicana*, nous pouvons voir qu'il n'y a pas d'inhibition et ce en présence et en absence de CPB. Cette différence entre les deux souches de parasite pourrait être dépendante de la modification initiale du phagosome. En effet, les espèces individuelles comme *L. major* ont tendances à bloquer la liaison du phagosome avec les autres compartiments vésiculaires principalement en perturbant les membranes grâce au LPG et en formant un anneau d'actine (Moradin & Descoteaux, 2012) tandis que les espèces communes recrutent et fusionnent activement avec des endosomes et autres organelles provenant de multiples sources dans la cellule (Courret *et al.*, 2002) ce qui peut affecter la dégradation des peptides. Une autre possibilité expliquant cette variation serait dans les niveaux d'expression de GP63. En effet, il a été démontré que les différentes espèces de parasites n'expriment pas toutes les mêmes niveaux des divers facteurs de virulence. (Isnard *et al.*, 2012) Si GP63 est présente en moindre quantité, il serait possible que l'effet ne soit pas visible puisqu'il a été démontré que l'inhibition est principalement dû au clivage de VAMP8 par GP63 dans les parasites formant des vacuoles individuelles.

Lorsque nous observons ce qui se produit après 48h (figure 3.3 B), nous pouvons encore observer une inhibition de la présentation antigénique croisée par *Leishmania major*. Ce résultat est très intéressant puisque les effets, lors des infections à court terme, étaient dépendants d'un clivage effectué par GP63. Cependant, lorsque le parasite passe du stade de promastigote au stade d'amastigote, les niveaux de la métalloprotéase diminuent de beaucoup. Dans ce cas-ci, les effets à 6h et à 48h sont similaires puisque dans les deux cas, la densité optique diminue

environ de moitié. Ces résultats laisseraient supposés que la cellule n'est pas capable de renverser ou compenser les effets découlant du clivage de VAMP8 même lorsque les niveaux de GP63 diminuent. Pour ce qui est de *L. mexicana*, nous pouvons observer une diminution de la PAC à 48h, mais elle serait indépendante de la présence de CPB. Le fait que cette inhibition arrive seulement après 48h et non pas après 6h laisse suggérer qu'elle serait dépendante d'un mécanisme différent des parasites individuels, mais nous ne pouvons pas expliquer quel mécanisme exact pour le moment. Nous pouvons aussi voir que lors des deux temps d'infection, l'effet causé par *L. major* était significativement plus prononcé que l'effet causé par *L. mexicana*.

Après avoir obtenu les résultats précédents, nous avons voulu vérifier si l'inhibition était causée par une diminution de la présence du CHM à la surface. Nous avons donc utilisé le peptide SIINFEKL composé des 8 acides aminés formant la séquence reconnue par les CMH se liant à l'ovalbumine une fois dégradée (OVA₂₅₇₋₂₆₄). L'avantage d'utiliser ce peptide est qu'il ne nécessite pas d'être phagocyté puis dégradé avant de se lier au complexe du CMH, il peut se lier directement à celui-ci. La quantité de peptide utilisée, 50ng par puit, était la même que celle utilisée par Matheoud et al. (Matheoud *et al.*, 2013) afin de s'assurer que nous ne saturions pas les niveaux de détection du test de colorimétrie et que nous puissions comparer les résultats obtenus avec ce qui a été publié précédemment.

Comme le démontre la figure 3.4, à 6h et à 48h, les niveaux d'activation des hybridomes entre les cellules infectées par les différents parasites, celles incubées avec des billes non recouvertes d'ovalbumine et celui des cellules non infectées sont semblables indiquant que le niveau de CMH à la surface des cellules ne varie pas significativement. Ces résultats nous indiquent donc que l'inhibition observée ne découlerait pas d'un recyclage des molécules de CMH présentes à la surface des cellules, mais plutôt d'un mécanisme impliqué dans les processus intracellulaires de la présentation antigénique croisée. Il serait donc intéressant d'aller étudier ce qui se produit aux différentes étapes d'endocytose des billes ainsi que la dégradation de l'ovalbumine afin de découvrir quelles étapes sont modifiées en plus du clivage de VAMP8 puisque les mécanismes impliqués dans l'inhibition par *L. mexicana* ne semblent pas être les mêmes que ceux modifiés par *L. major*.

Après avoir observé que la cystéine peptidase B ne semblait pas impliquée dans l'inhibition de la PAC de l'ovalbumine provenant de bille durant l'infection par *L. mexicana*, nous voulions vérifier si cette peptidase avait un rôle à jouer dans la présentation des antigènes du parasite directement. Pour ce faire, nous avons commencé par introduire un plasmide contenant la

séquence de l'ovalbumine dans tous nos parasites afin qu'ils expriment constitutivement cette protéine. Nous utilisons cette méthode puisqu'il existe des cellules T spécifiques au peptide SIINFEKL de l'ovalbumine, mais pas pour des protéines spécifiques au parasite. Nous avons donc transfecté les parasites avec le plasmide *pks sp_Néo.ova* avant de les lyser et d'évaluer les niveaux d'ovalbumine de produit par chaque mutant par immunobuvardage de type Western. Comme le montre la figure 3.5, tous nos mutants expriment l'ovalbumine.

Après avoir confirmé que nos parasites exprimaient l'ovalbumine, nous avons pu étudier l'effet de la cystéine sur la présentation des protéines du parasite. Pour ce faire, nous avons encore une fois infecté nos cellules dendritiques avec les parasites, mais cette fois-ci exprimant l'ovalbumine puis, après 6 ou 48h, nous les avons fixées. Cependant, cette fois-ci, nous avons évalué la présentation antigénique croisée à l'aide de cellules T provenant de souris OT-I puisqu'avec les hybridomes B3Z, nous ne pouvions pas détecter leur activation (résultats non-montrés). Après avoir incubé les cellules T pendant 16h en présence des cellules dendritiques infectées, nous avons évalué leur activation par cytométrie en flux en observant le pourcentage de cellules positives pour le marqueur CD69, un marqueur d'activation de ces cellules

Lorsque nous analysons les données après 6h d'infection (figure 3.6 A), nous pouvons voir qu'il n'y a pas de variation dans le niveau d'activation des cellules T par les différentes souches du parasite. Donc encore une fois la cystéine peptidase B n'a pas de rôle à jouer à ce niveau. Cependant, lorsque nous avons observé l'inhibition au niveau de la cellule entière, *L. mexicana* était seulement capable d'inhiber la réponse après 48h d'infection, mais la réponse semblait CPB-indépendante. En observant les résultats obtenus après 48h d'infection (figure 3.6 B), la présence de CPB n'affecte pas, encore une fois, les niveaux d'activation des cellules T, donc n'aurait pas de rôle non plus dans la présentation antigénique croisée des protéines du parasite. Ces résultats nous permettent donc de confirmer que la cystéine peptidase B n'est pas impliquée dans l'effet qui était observé à la figure 3.3 B.

5- CONCLUSION

En conclusion, les résultats que nous avons obtenus dans le cadre de ce mémoire nous ont permis de répondre aux questions que nous nous posions initialement. En effet, nous avons pu démontrer que *L. mexicana* est capable d'inhiber la présentation antigénique croisée. Cependant, cette diminution n'est pas de la même amplitude que celle causée par *L. major*. En plus de cela, l'inhibition causée par le parasite formant des vacuoles communes était seulement présente après 48h d'infection contrairement aux parasites formant des vacuoles individuelles qui sont capable d'inhiber la PAC à 6h et à 48h post-infection. La différence dans la cinétique entre les deux souches de parasite nous indique aussi que les mécanismes impliqués ne sont probablement pas les mêmes puisque dans le cas de *L. major*, il a été démontré que le clivage de VAMP8 par GP63 était directement responsable de cette inhibition, mais lorsque le parasite passe du stade de promastigote au stade d'amastigote, donc après environ 24h d'infection, les niveaux de GP63 sont grandement diminués. Cependant, il serait possible que les niveaux plus faibles de GP63 seraient suffisants pour induire le clivage, mais d'autres études sont essentielles afin de confirmer le tout. Nous avons aussi pu démontrer que durant les infections à court et à long terme (6h et 48h), le parasite ne diminuait pas les niveaux de CMH-I présents à la surface des cellules dendritiques. Ce résultat nous indique que les effets causés par le parasite n'impliqueraient pas un recyclage des molécules de CMH à la surface, mais seraient plutôt impliqués dans des mécanismes intracellulaires, possiblement affectant la dégradation des protéines. Nos résultats nous ont aussi permis de déterminer que la cystéine peptidase B n'a pas de rôle dans la présentation antigénique croisée que ce soit lors de la présentation d'ovalbumine présente à la surface de billes ou bien lors de la présentation des protéines du parasite directement. Donc les effets que cette peptidase induits lors d'une infection *in vivo* ne seraient pas dépendants de la PAC.

Les résultats obtenus ont donc permis, encore une fois, de mettre en évidence la différence entre les différentes espèces de *Leishmania* démontrant l'importance d'effectuer les diverses expériences avec plusieurs espèces différentes afin de mieux comprendre comment le parasite survit dans les cellules et idéalement trouver un moyen pour traiter la maladie plus efficace que ce que nous avons actuellement. Il serait intéressant d'inhiber la métalloprotéase chez *L. mexicana* afin d'évaluer si, comme pour *L. major*, l'inhibition de la PAC serait directement dépendante de celle-ci. Il serait aussi intéressant de vérifier les niveaux de VAMP8 à 6h et 48h autant lors de l'infection avec *L. major* qu'avec *L. mexicana* afin de vérifier si l'effet à long terme est dépendant du même mécanisme que celui causant l'inhibition à court terme.

RÉFÉRENCES

- Abu-Dayyeh I, Hassani K, Westra ER, Mottram JC & Olivier M (2010) Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions. *Infect Immun* 78(6):2438-2445.
- Akhoundi M, Downing T, Votypka J, Kuhls K, Lukes J, Cannet A, Ravel C, Marty P, Delaunay P, Kasbari M, Granouillac B, Gradoni L & Sereno D (2017) *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular aspects of medicine* 57:1-29.
- Anderson G & Takahama Y (2012) Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends Immunol* 33(6):256-263.
- Bart G, Coombs GH & Mottram JC (1995) Isolation of *Imcpc*, a gene encoding a *Leishmania mexicana* cathepsin-B-like cysteine proteinase. *Mol Biochem Parasitol* 73(1-2):271-274.
- Bart G, Frame MJ, Carter R, Coombs GH & Mottram JC (1997) Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 88(1-2):53-61.
- Bertholet S, Debrabant A, Afrin F, Caler E, Mendez S, Tabbara KS, Belkaid Y & Sacks DL (2005) Antigen requirements for efficient priming of CD8+ T cells by *Leishmania* major-infected dendritic cells. *Infect Immun* 73(10):6620-6628.
- Birnberg T, Bar-On L, Sapozhnikov A, Caton ML, Cervantes-Barragan L, Makia D, Krauthgamer R, Brenner O, Ludewig B, Brockschnieder D, Riethmacher D, Reizis B & Jung S (2008) Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome. *Immunity* 29(6):986-997.
- Blander JM (2016) The comings and goings of MHC class I molecules herald a new dawn in cross-presentation. *Immunol Rev* 272(1):65-79.
- Blum JS, Wearsch PA & Cresswell P (2013) Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 31:443-473.
- Botelho RJ, Hackam DJ, Schreiber AD & Grinstein S (2000) Role of COPI in phagosome maturation. *The Journal of biological chemistry* 275(21):15717-15727.
- Bouvier J, Schneider P, Etges R & Bordier C (1990) Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*. *Biochemistry* 29(43):10113-10119.
- Boyman O & Sprent J (2012) The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 12(3):180-190.
- Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP & Mosser DM (1995) Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol* 155(6):3102-3111.
- Brooks DR, Denise H, Westrop GD, Coombs GH & Mottram JC (2001) The stage-regulated expression of *Leishmania mexicana* CPB cysteine proteases is mediated by an intercistronic sequence element. *The Journal of biological chemistry* 276(50):47061-47069.
- Brown S, Heinisch I, Ross E, Shaw K, Buckley CD & Savill J (2002) Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature* 418(6894):200-203.

- Campbell KA, Owendale PJ, Kennedy MK, Fanslow WC, Reed SG & Maliszewski CR (1996) CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. *Immunity* 4(3):283-289.
- Cano RLE & Lopera HDE (2013) Introduction to T and B lymphocytes. *Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]*, Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, Levy RA & Cervera R (Édit.) El Rosario University Press, Bogota.
- Canton J, Neculai D & Grinstein S (2013) Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol* 13(9):621-634.
- Casgrain PA, Martel C, McMaster WR, Mottram JC, Olivier M & Descoteaux A (2016) Cysteine Peptidase B Regulates *Leishmania mexicana* Virulence through the Modulation of GP63 Expression. *PLoS pathogens* 12(5):e1005658.
- Chaplin DD (2010) Overview of the immune response. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125(2 Suppl 2):S3-23.
- Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, Flock JI, Herrmann M & Preissner KT (2002) *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med* 8(7):687-693.
- Chen DQ, Kolli BK, Yadava N, Lu HG, Gilman-Sachs A, Peterson DA & Chang KP (2000) Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro. *Infect Immun* 68(1):80-86.
- Chen L & Flies DB (2013) Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13(4):227-242.
- Clarke SR, Barnden M, Kurts C, Carbone FR, Miller JF & Heath WR (2000) Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunol Cell Biol* 78(2):110-117.
- Contreras I, Gomez MA, Nguyen O, Shio MT, McMaster RW & Olivier M (2010) *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. *PLoS pathogens* 6(10):e1001148.
- Courret N, Frehel C, Gouhier N, Pouchelet M, Prina E, Roux P & Antoine JC (2002) Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci* 115(Pt 11):2303-2316.
- Cox MA, Kahan SM & Zajac AJ (2013) Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love. *Virology* 435(1):157-169.
- Daeron M (1997) Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 15:203-234.
- Damatta RA, Seabra SH, Deolindo P, Arnholdt AC, Manhaes L, Goldenberg S & de Souza W (2007) *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *FEMS Microbiol Lett* 266(1):29-33.
- Dambuza IM & Brown GD (2015) C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr Opin Immunol* 32:21-27.
- David CV & Craft N (2009) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic therapy* 22(6):491-502.

- Denise H, McNeil K, Brooks DR, Alexander J, Coombs GH & Mottram JC (2003) Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. *Infect Immun* 71(6):3190-3195.
- Denise H, Poot J, Jimenez M, Ambit A, Herrmann DC, Vermeulen AN, Coombs GH & Mottram JC (2006) Studies on the CPA cysteine peptidase in the *Leishmania infantum* genome strain JPCM5. *BMC Mol Biol* 7:42.
- Denzin LK & Cresswell P (1995) HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82(1):155-165.
- Descoteaux A, Luo Y, Turco SJ & Beverley SM (1995) A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. *Science* 269(5232):1869-1872.
- Desjardins M & Descoteaux A (1997) Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *The Journal of experimental medicine* 185(12):2061-2068.
- Dowlati Y (1996) Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. *Clinics in dermatology* 14(5):425-431.
- Dustin ML & Depoil D (2011) New insights into the T cell synapse from single molecule techniques. *Nat Rev Immunol* 11(10):672-684.
- Ellis M, Sharma DK, Hilley JD, Coombs GH & Mottram JC (2002) Processing and trafficking of *Leishmania mexicana* GP63. Analysis using GP18 mutants deficient in glycosylphosphatidylinositol protein anchoring. *The Journal of biological chemistry* 277(31):27968-27974.
- Fairn GD & Grinstein S (2012) How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol* 33(8):397-405.
- Flannagan RS, Cosio G & Grinstein S (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* 7(5):355-366.
- Flannagan RS, Jaumouille V & Grinstein S (2012) The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* 7:61-98.
- Gabriel C, McMaster WR, Girard D & Descoteaux A (2010) *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *J Immunol* 185(7):4319-4327.
- Garrett WS, Chen LM, Kroschewski R, Ebersold M, Turley S, Trombetta S, Galan JE & Mellman I (2000) Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* 102(3):325-334.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M & Ley K (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327(5966):656-661.
- Goldberg AC & Rizzo LV (2015a) MHC structure and function - antigen presentation. Part 1. *Einstein (Sao Paulo)* 13(1):153-156.
- Goldberg AC & Rizzo LV (2015b) MHC structure and function - antigen presentation. Part 2. *Einstein (Sao Paulo)* 13(1):157-162.
- Gomez MA, Contreras I, Halle M, Tremblay ML, McMaster RW & Olivier M (2009) *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Sci Signal* 2(90):ra58.
- Gonzalez-Garcia S, Garcia-Peydro M, Alcain J & Toribio ML (2012) Notch1 and IL-7 receptor signalling in early T-cell development and leukaemia. *Curr Top Microbiol Immunol* 360:47-73.
- Gordon S (2016) Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity* 44(3):463-475.

- Gossage SM, Rogers ME & Bates PA (2003) Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International journal for parasitology* 33(10):1027-1034.
- Griffiths G, Hoflack B, Simons K, Mellman I & Kornfeld S (1988) The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* 52(3):329-341.
- Gutierrez MG (2013) Functional role(s) of phagosomal Rab GTPases. *Small GTPases* 4(3):148-158.
- Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-Qubati Y & Schwartz RA (2015) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology* 73(6):911-926; 927-918.
- Harrison RE, Bucci C, Vieira OV, Schroer TA & Grinstein S (2003) Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. *Mol Cell Biol* 23(18):6494-6506.
- Hato T & Dagher PC (2015) How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 10(8):1459-1469.
- Hey AS, Theander TG, Hviid L, Hazrati SM, Kemp M & Kharazmi A (1994) The major surface glycoprotein (gp63) from Leishmania major and Leishmania donovani cleaves CD4 molecules on human T cells. *J Immunol* 152(9):4542-4548.
- Hill A, Jugovic P, York I, Russ G, Bennink J, Yewdell J, Ploegh H & Johnson D (1995) Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* 375(6530):411-415.
- Hinz A & Tampe R (2012) ABC transporters and immunity: mechanism of self-defense. *Biochemistry* 51(25):4981-4989.
- Holm A, Tejle K, Magnusson KE, Descoteaux A & Rasmussen B (2001) Leishmania donovani lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation. *Cell Microbiol* 3(7):439-447.
- Inaba K, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyama S, Reis e Sousa C, Germain RN, Mellman I & Steinman RM (2000) The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *The Journal of experimental medicine* 191(6):927-936.
- Isnard A, Shio MT & Olivier M (2012) Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2:72.
- Iwasaki A & Medzhitov R (2015) Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology* 16(4):343-353.
- Jaramillo M, Gomez MA, Larsson O, Shio MT, Topisirovic I, Contreras I, Luxenburg R, Rosenfeld A, Colina R, McMaster RW, Olivier M, Costa-Mattioli M & Sonenberg N (2011) Leishmania repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. *Cell Host Microbe* 9(4):331-341.
- Joffre OP, Segura E, Savina A & Amigorena S (2012) Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 12(8):557-569.
- Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW & Hansbro PM (2008) Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123(3):326-338.

- Kaisho T & Akira S (2001) Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol* 22(2):78-83.
- Kapler GM, Coburn CM & Beverley SM (1990) Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol Cell Biol* 10(3):1084-1094.
- Karttunen J, Sanderson S & Shastri N (1992) Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(13):6020-6024.
- Kawai T & Akira S (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34(5):637-650.
- Kaye PM, Rogers NJ, Curry AJ & Scott JC (1994) Deficient expression of co-stimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. *Eur J Immunol* 24(11):2850-2854.
- Kinchen JM & Ravichandran KS (2008) Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(10):781-795.
- Kobayashi T, Stang E, Fang KS, de Moerloose P, Parton RG & Gruenberg J (1998) A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 392(6672):193-197.
- Landsverk OJ, Bakke O & Gregers TF (2009) MHC II and the endocytic pathway: regulation by invariant chain. *Scand J Immunol* 70(3):184-193.
- Lieberman J (2003) The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3(5):361-370.
- Lieke T, Nylén S, Eidsmo L, McMaster WR, Mohammadi AM, Khamesipour A, Berg L & Akuffo H (2008) *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin Exp Immunol* 153(2):221-230.
- Lodge R, Diallo TO & Descoteaux A (2006) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol* 8(12):1922-1931.
- Luzio JP, Pryor PR & Bright NA (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(8):622-632.
- Machado-Coelho GL, Caiffa WT, Genaro O, Magalhaes PA & Mayrink W (2005) Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 99(1):55-61.
- Malek TR & Bayer AL (2004) Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol* 4(9):665-674.
- Martin S, Agarwal R, Murugaiyan G & Saha B (2010) CD40 expression levels modulate regulatory T cells in *Leishmania donovani* infection. *J Immunol* 185(1):551-559.
- Matheoud D, Moradin N, Bellemare-Pelletier A, Shio MT, Hong WJ, Olivier M, Gagnon E, Desjardins M & Descoteaux A (2013) *Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell Host Microbe* 14(1):15-25.
- McConville MJ & Blackwell JM (1991) Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *The Journal of biological chemistry* 266(23):15170-15179.

- McConville MJ, Thomas-Oates JE, Ferguson MA & Homans SW (1990) Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. *The Journal of biological chemistry* 265(32):19611-19623.
- McGwire BS, Chang KP & Engman DM (2003) Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infect Immun* 71(2):1008-1010.
- McGwire BS, O'Connell WA, Chang KP & Engman DM (2002) Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. *The Journal of biological chemistry* 277(11):8802-8809.
- Mellman I & Steinman RM (2001) Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106(3):255-258.
- Mercer J & Helenius A (2008) Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320(5875):531-535.
- Moradin N & Descoteaux A (2012) *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2:121.
- Mosser DM & Edelson PJ (1985) The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J Immunol* 135(4):2785-2789.
- Mottram JC, Brooks DR & Coombs GH (1998) Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol* 1(4):455-460.
- Mottram JC, Coombs GH & Alexander J (2004) Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr Opin Microbiol* 7(4):375-381.
- Mottram JC, Frame MJ, Brooks DR, Tetley L, Hutchison JE, Souza AE & Coombs GH (1997) The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. *The Journal of biological chemistry* 272(22):14285-14293.
- Mottram JC, Souza AE, Hutchison JE, Carter R, Frame MJ & Coombs GH (1996) Evidence from disruption of the *lmcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12):6008-6013.
- Mukkada AJ, Meade JC, Glaser TA & Bonventre PF (1985) Enhanced metabolism of *Leishmania donovani* amastigotes at acid pH: an adaptation for intracellular growth. *Science* 229(4718):1099-1101.
- Okwor I & Uzonna JE (2013) The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. *Immunologic research* 56(1):163-171.
- Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K & Shio MT (2012) *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes and infection* 14(15):1377-1389.
- Paredes R, Munoz J, Diaz I, Domingo P, Gurgui M & Clotet B (2003) Leishmaniasis in HIV infection. *Journal of postgraduate medicine* 49(1):39-49.
- Park D, Tosello-Trampont AC, Elliott MR, Lu M, Haney LB, Ma Z, Klivanov AL, Mandell JW & Ravichandran KS (2007) BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* 450(7168):430-434.
- Patel JC, Hall A & Caron E (2002) Vav regulates activation of Rac but not Cdc42 during FcγR-mediated phagocytosis. *Mol Biol Cell* 13(4):1215-1226.

- Paul WE & Zhu J (2010) How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* 10(4):225-235.
- Pierre P & Mellman I (1998) Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* 93(7):1135-1145.
- Podinovskaia M & Descoteaux A (2015) Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol* 10(1):111-129.
- Ralton JE, Mullin KA & McConville MJ (2002) Intracellular trafficking of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins and free GPIs in *Leishmania mexicana*. *Biochem J* 363(Pt 2):365-375.
- Rezvan H & Moafi M (2015) An overview on *Leishmania* vaccines: A narrative review article. *Veterinary research forum : an international quarterly journal* 6(1):1-7.
- Ribeiro-Gomes FL, Peters NC, Debrabant A & Sacks DL (2012) Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS pathogens* 8(2):e1002536.
- Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y & Zerial M (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122(5):735-749.
- Roberts SC, Swihart KG, Agey MW, Ramamoorthy R, Wilson ME & Donelson JE (1993) Sequence diversity and organization of the msp gene family encoding gp63 of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* 62(2):157-171.
- Roche PA & Cresswell P (2011) Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. 88: 3150-3154. *J Immunol* 187(3):1076-1080.
- Rogers ME (2012) The role of leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the Mammalian host. *Frontiers in microbiology* 3:223.
- Rosales C & Uribe-Querol E (2017) Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed research international* 2017:9042851.
- Rus H, Cudrici C & Niculescu F (2005) The role of the complement system in innate immunity. *Immunologic research* 33(2):103-112.
- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM & Hafler DA (2010) FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10(7):490-500.
- Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, Lennon-Dumenil AM, Seabra MC, Raposo G & Amigorena S (2006) NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 126(1):205-218.
- Scheinecker C, McHugh R, Shevach EM & Germain RN (2002) Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *The Journal of experimental medicine* 196(8):1079-1090.
- Schlagenhauf E, Etges R & Metcalf P (1998) The crystal structure of the *Leishmania* major surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure* 6(8):1035-1046.
- Segura E & Amigorena S (2013) Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol* 34(9):440-445.

- Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA & Pamer EG (2003) TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19(1):59-70.
- Shevach EM (2009) Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30(5):636-645.
- Siebenlist U, Brown K & Claudio E (2005) Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. *Nat Rev Immunol* 5(6):435-445.
- Souza AE, Waugh S, Coombs GH & Mottram JC (1992) Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. *FEBS Lett* 311(2):124-127.
- Strazzulla A, Cocuzza S, Pinzone MR, Postorino MC, Cosentino S, Serra A, Cacopardo B & Nunnari G (2013) Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease. *BioMed research international* 2013:805108.
- Sundar S (2015) Visceral leishmaniasis. *Tropical parasitology* 5(2):83-85.
- Sunter J & Gull K (2017) Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open biology* 7(9).
- Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JC, Crepaldi PH, Pimenta PF & de Souza W (2013) The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. *PLoS pathogens* 9(10):e1003594.
- Tsai RK & Discher DE (2008) Inhibition of "self" engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. *J Cell Biol* 180(5):989-1003.
- Tzinia AK & Soteriadou KP (1991) Substrate-dependent pH optima of gp63 purified from seven strains of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 47(1):83-89.
- Ueno N & Wilson ME (2012) Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol* 28(8):335-344.
- van Lith M, McEwen-Smith RM & Benham AM (2010) HLA-DP, HLA-DQ, and HLA-DR have different requirements for invariant chain and HLA-DM. *The Journal of biological chemistry* 285(52):40800-40808.
- van Lookeren Campagne M, Wiesmann C & Brown EJ (2007) Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol* 9(9):2095-2102.
- van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, Muller A, Holscher C, Herrmann M, Sacks D, Solbach W & Laskay T (2006) *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(37):13837-13842.
- Vasconcelos CO, Coelho ZC, Chaves Cde S, Teixeira CR, Pompeu MM & Teixeira MJ (2014) Distinct cellular migration induced by *Leishmania infantum chagasi* and saliva from *Lutzomyia longipalpis* in a hemorrhagic pool model. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 56(1):21-27.
- Vinet AF, Fukuda M, Turco SJ & Descoteaux A (2009) The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. *PLoS pathogens* 5(10):e1000628.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T & Ugolini S (2008) Functions of natural killer cells. *Nature immunology* 9(5):503-510.

- Waisman A, Lukas D, Clausen BE & Yogeve N (2017) Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. *Seminars in immunopathology* 39(2):153-163.
- Wanderley JLM, Thorpe PE, Barcinski MA & Soong L (2013) Phosphatidylserine exposure on the surface of *Leishmania amazonensis* amastigotes modulates in vivo infection and dendritic cell function. *Parasite Immunol* 35(3-4):109-119.
- Weise F, Stierhof YD, Kuhn C, Wiese M & Overath P (2000) Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells. *J Cell Sci* 113 Pt 24:4587-4603.
- Yang Q, Jeremiah Bell J & Bhandoola A (2010) T-cell lineage determination. *Immunol Rev* 238(1):12-22.
- Yao C, Donelson JE & Wilson ME (2003) The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* 132(1):1-16.
- Yatim KM & Lakkis FG (2015) A brief journey through the immune system. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 10(7):1274-1281.
- Yiallourous I, Kappelhoff R, Schilling O, Wegmann F, Helms MW, Auge A, Brachtendorf G, Berkhoff EG, Beermann B, Hinz HJ, Konig S, Peter-Katalinic J & Stocker W (2002) Activation mechanism of pro-astacin: role of the pro-peptide, tryptic and autoproteolytic cleavage and importance of precise amino-terminal processing. *J Mol Biol* 324(2):237-246.